

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

-UNESP- Faculdade de Ciências e Tecnologia

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de

Materiais - POSMAT

**Carbendazim e modelos de biomembrana via filmes de Langmuir e
Layer-by-Layer: mecanismos de interação e desenvolvimento de
sensores**

Tese de doutorado

Leonardo Negri Furini

Presidente Prudente

2016

Leonardo Negri Furini

**Carbendazim e modelos de biomembrana via filmes de Langmuir e
Layer-by-Layer: mecanismos de interação e desenvolvimento de
sensores**

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino

Universidade Estadual Paulista – UNESP - Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade

Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora – MG

Prof^a. Dr^a. Paola Corio

Universidade de São Paulo – USP – São Paulo - SP

Prof^a. Dr^a. Clarissa de Almeida Olivati

Universidade Estadual Paulista – UNESP – Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Sérgio Antonio Marques de Lima

Universidade Estadual Paulista – UNESP – Presidente Prudente – SP

Presidente Prudente, SP

2016

Ficha catalográfica

F983c Furini, Leonardo Negri.
Carbendazim e modelos de biomembrana via filmes de Langmuir e Layer-by-Layer : mecanismos de interação e desenvolvimento de sensores / Leonardo Negri Furini. - Presidente Prudente : [s.n], 2016
ix, 116 f. : il.

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Inclui bibliografia

1. Fungicida. 2. Filmes de Langmuir. 3. SERS. I. Furini, Leonardo Negri. II. Constantino, Carlos José Leopoldo. III. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. IV. Título.

Ata da defesa



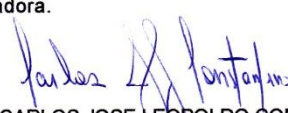
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



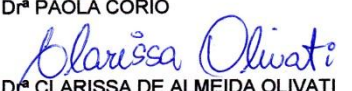
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LEONARDO NEGRI FURINI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

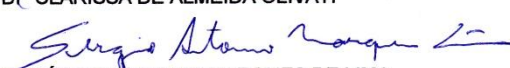
Aos 25 dias do mês de fevereiro do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Sala 6 - Fundact / Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSE LEOPOLDO CONSTANTINO do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. GUSTAVO FERNANDES SOUZA ANDRADE do(a) Departamento de Química / Universidade Federal de Juiz de Fora, Pro^{fa} Dr^a PAOLA CORIO do(a) Departamento de Química Fundamental / Universidade de São Paulo, Pro^{fa} Dr^a CLARISSA DE ALMEIDA OLIVATI do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. SÉRGIO ANTONIO MARQUES DE LIMA do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de LEONARDO NEGRI FURINI, intitulada **Carbendazim e modelos de biomembrana via filmes de Langmuir e Layer-by-Layer: mecanismos de interação e desenvolvimento de sensores**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. CARLOS JOSE LEOPOLDO CONSTANTINO


Prof. Dr. GUSTAVO FERNANDES SOUZA ANDRADE


Pro^{fa} Dr^a PAOLA CORIO


Pro^{fa} Dr^a CLARISSA DE ALMEIDA OLIVATI


Prof. Dr. SÉRGIO ANTONIO MARQUES DE LIMA

Faculdade de Ciências - Câmpus de Bauru -
Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, 17033360, Bauru - São Paulo

Dedicatória

à minha esposa, Fernanda.

Epígrafe

*De tanto ver triunfar as nulidades, de tanto ver
prosperar a desonra, de tanto ver crescer a injustiça,
de tanto ver agigantarem-se os poderes nas mãos dos
maus, o homem chega a desanimar da virtude, a rir-se
da honra, a ter vergonha de ser honesto.*

Rui Barbosa

Agradecimentos



Estou aqui hoje, terminando minha tese e nem posso acreditar que desde o início da graduação faz quase 10 anos que estou dentro da universidade. Não posso esconder a minha felicidade e agradecer, minimamente, algumas pessoas que fizeram parte desta jornada:

À minha família, meus pais Rose e Carlos e ao meu irmão Murilo. Também gostaria de agradecer aos meus avós que sempre estiveram ao meu lado. Obrigado de coração.

Ao meu orientador prof. Casé que me orientou ao longo destes 6 anos, confiando e me ensinando muito mais que poderia escrever neste trabalho. Se hoje estou aqui, é graças a você. Muito obrigado!!

Ao prof. Eloi do IBILCE/UNESP que gentilmente disponibilizou o seu laboratório para parte do meu trabalho e que muito contribui.

Ao meu orientador da Espanha Santiago com quem pude ter bons momentos ao longo do estágio. Também aos amigos do Instituto, José Vicente, José Antonio, Sagrário, Eduardo (que não mediu esforços para me ajudar), Adi, Elisa, Ramón, Rocio, Diego, Guillermo, Ana, Mikel...

Ao meu orientador prof. Alexandre Brolo durante a estadia na Universidade de Victoria e também aos amigos que lá fiz, Nick, Regie, Paquitão, Fernando e Collin.

Aos meus amigos do grupo “NOIX” Pedrera, Priscila, Joni, Bina, Cibely, Rafa, Diego, Mateusão, Matheus, Matheusinho, Luis. Com este grupo pude dividir bons momentos em churrascos, cafés, futebol, convivência diária. Também gostaria de agradecer ao Diogão.

Aos meus amigos do DFQB.

Também gostaria de agradecer minha esposa, Fernanda que pacientemente esteve ao meu lado durante todo o tempo.

Ao CNPQ, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro

Resumo

Nesta tese filmes de Langmuir foram empregados para estudar a interação entre lipídios e um fungicida denominado carbendazim (MBC) e espectroscopia de impedância e espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS, do inglês *surface-enhanced Raman scattering*) empregados na detecção deste fungicida. Os lipídios utilizados para formar os filmes de Langmuir foram brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), brometo de didodecildimetilamônio (DDAB), 1,2-dipalmitoil-sn-3-glicerofosfatidilcolina (DPPC) e 1,2-dipalmitoil-sn-3-glicerol-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (DPPG) e o estudo da interação foi realizado com e sem MBC na subfase aquosa. Os resultados mostraram que o MBC interage fortemente com o DODAB e DDAB, moderadamente com o DPPC e fracamente com o DPPG, indicando que a interação é de origem eletrostática. Unidades sensoriais compostas por eletrodos interdigitados recobertos com filmes LbL de DODAB/NiTsPc e perileno/DPPG compuseram uma língua eletrônica capaz de distinguir diferentes concentrações de MBC em solução via espectroscopia de impedância. Analisando individualmente cada unidade sensorial, a composta pelo filme LbL de DODAB/NiTsPc foi a que apresentou melhor desempenho frente ao MBC. Os estudos SERS foram realizados em três etapas. Na primeira, várias morfologias de nanopartículas foram sintetizadas e avaliadas quais apresentam melhor sinal SERS do MBC. Deste estudo ficou determinado que as nanopartículas esféricas de prata apresentaram o melhor sinal SERS do MBC. A interação do MBC com a superfície destas nanopartículas foi realizada a partir de espectros SERS do MBC em vários pHs. Cálculos teóricos foram utilizados para atribuição dos modos vibracionais do MBC e assim ajudar na interpretação dos resultados experimentais. De principal relevância, das espécies de MBC as formas neutra (MBC^0) e desprotonada (MBC^-) apresentam afinidade pela superfície de prata, originando assim sinal SERS. Por fim, o limite de detecção do MBC foi determinado via SERS utilizando um procedimento que garante a reprodutibilidade das medidas, uma vez que a técnica SERS não é, ainda, uma técnica analítica de rotina.

Abstract

This work Langmuir films were employed to study the interaction between lipids and a fungicide called carbendazim (MBC), impedance spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering (SERS) were used in the detection of this fungicide. The lipids employed to Langmuir films were dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB), didodecyldimethylammonium bromide (DDAB), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DPPG) with and without MBC in the subphase. The results show that the MBC interacts strongly with DODAB and DDAB, moderately with DPPC and weakly to DPPG, indicating that it is electrostatic interaction. Sensor units composed of interdigitated electrodes coated with LbL films DODAB/NiTsPc and perilene/DPPG composed an electronic tongue able to distinguish different MBC concentrations in solution, via impedance spectroscopy. Analyzing each sensory unit, the composed with LbL film DODAB/NiTsPc showed the best performance. The SERS studies were performed in three stages. The first one, several morphologies of nanoparticles were synthesized and evaluated which have better SERS signal of MBC. From this study it was concluded that the spherical nanoparticles of silver have better SERS signal of MBC and the subsequent results were obtained only with this nanoparticle. The interaction between MBC and surface of these nanoparticles was carried out by SERS spectra of MBC at several pHs. Here, theoretical calculations were used for assignment of vibrational modes of the MBC and thus help in the interpretation of experimental results. According to experimental and theoretical results neutrally (MBC^0) and deprotonated (MBC^-) species have affinity for the silver surface and then show SERS signal. Finally, the MBC limit of detection was determined via SERS using a procedure which ensures the reproducibility of the measurements, since SERS technique is not, yet, a routine analytical technique.

Sumário

APRESENTAÇÃO	3
CAPÍTULO 1	5
1.1. INTRODUÇÃO	5
1.2. MODELOS DE MEMBRANA BIOLÓGICA	6
1.2.1. Filmes de Langmuir	8
1.2.2. Filmes LbL	11
1.3. TÉCNICAS DE DETECÇÃO	12
1.3.1. Língua eletrônica	12
1.3.2. Espectroscopia de impedância	13
1.3.3. Análise de Dados	14
1.4. ESPECTROSCOPIA SERS	15
Nanopartículas	21
1.5. OBJETIVO GERAL	24
Objetivos específicos	24
CAPÍTULO 2	25
2.1. MATERIAIS E REAGENTES	25
2.2. FILMES DE LANGMUIR	26
2.3. FILMES LbL	27
2.4. LÍNGUA ELETRÔNICA	28
2.5. TÉCNICA DE PROJEÇÃO	29
2.6. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS	29
2.6.1. Coloides de prata reduzidas por hidroxilamina (AgH)	29
2.6.2. Coloides de prata reduzidas por citrato (AgCT)	30
2.6.3. Coloides de ouro reduzidos por citrato (AuCT)	30
2.6.4. Coloides de nanoestrelas de prata (AgE)	30
2.6.5. Coloides de nanoprismas triangulares de prata (AgT)	31
2.7. CÁLCULOS TEÓRICOS	31
2.8. INSTRUMENTAÇÃO	33
CAPÍTULO 3	34
3.1. ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE MBC E MODELOS DE MEMBRANA	34
3.1.1. DODAB	34
3.1.2. DDAB	39
3.1.3. DPPC	40
3.1.4. DPPG	42
3.1.5. Solvatação do DODAB	43
3.2. APLICAÇÃO SENSORIAL	48
CAPÍTULO 4	57
4.1. OTIMIZAÇÃO DA ESCOLHA DAS NANOPARTÍCULAS	57
4.1.1. UV-Vis	57
4.1.2. Espectros SERS de MBC utilizando diferentes nanopartículas	61
4.1.3. Caracterização das nanopartículas de prata reduzidas por hidroxilamina (AgH)	64
4.2. ESPECTROS SERS DE MBC OBTIDOS A DIFERENTES pH	69
4.3. ESPÉCIE QUÍMICA ADSORVIDA SOBRE A SUPERFÍCIE DA NANOPARTÍCULA	82
4.4. CENTRO DE INTERAÇÃO COM A SUPERFÍCIE METÁLICA	88
4.5. ANÁLISE QUANTITATIVA	91
CAPÍTULO 5	100

5.1. <i>CONCLUSÕES</i>	100
5.2. <i>PERSPECTIVAS FUTURAS</i>	102
5.3. <i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	103
ANEXO	106
REFERÊNCIAS	108

Apresentação



Esta tese de doutorado tem como principal alvo de estudo um fungicida, denominado carbendazim (MBC), e sua interação com modelos bioinspirados através de filmes de Langmuir e posterior detecção. No que concerne à interação, foi estudado como lipídios com diferentes densidades de carga se comportam na presença do MBC através de filmes Langmuir (monocamadas abertas de lipídios). No que diz respeito à detecção, foram aplicadas as técnicas de espectroscopia de impedância e espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS, do inglês *surface-enhanced Raman scattering*). Os resultados de interação foram obtidos na FCT-UNESP sob orientação do professor. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino. Para complementar os estudos de interação, medidas de calorimetria diferencial exploratória (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) e espalhamento de luz (LS, do inglês *light scattering*) foram realizadas no laboratório do professor Dr. Eloi Feitosa do IBILCE-UNESP. Os estudos SERS foram realizados durante o doutorado sanduíche no Instituto de Estrutura da Matéria, Conselho Superior de Investigações Científicas, em Madri, sob supervisão do Dr. Santiago Sanchez Cortes. Os cálculos teóricos aplicados foram feitos em colaboração com a professora Dra. Isabel López Tócon e o professor Dr. Juan Carlos Otero ambos da Universidade de Málaga na Espanha.

Esta tese contém cinco capítulos, sendo o capítulo 1 uma introdução com os principais conceitos teóricos envolvidos neste trabalho. O capítulo 2 apresenta os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento da tese. Os resultados são discutidos nos capítulos 3 e 4. A interação entre MBC e modelos de membranas através de filmes de Langmuir de lipídios com diferentes densidades de carga são apresentados

no capítulo 3. Ainda neste capítulo foi abordada uma aplicação sensorial utilizando uma língua eletrônica composta de 3 unidades sensoriais com os lipídios que melhor e pior interagiram com o MBC. No capítulo 4 são mostrados os resultados obtidos através de SERS, sendo destacados os subitens i) escolha do melhor substrato (suspensões coloidais de nanopartículas) para obtenção de sinal SERS de MBC. Nesta etapa foram testadas diferentes morfologias, bem como rotas de síntese e metal (prata e ouro). ii) Interação da molécula de MBC com a superfície da nanopartícula. Na última etapa, iii) Obtenção de curva analítica (intensidade SERS vs. concentração de MBC) para obtenção do limite de detecção de MBC através de SERS. Por fim, o capítulo 5 aborda as conclusões, perspectivas futuras e as considerações finais.

Capítulo 1

1.1. Introdução

Os agrotóxicos têm um papel importante no controle de pragas nas lavouras, porém o uso em excesso, a falta de ação específica e o mau uso na manipulação/descarte, são exemplos de que estes produtos tornam-se prejudiciais ao meio ambiente em geral. A quantidade de substâncias químicas aplicada nas lavouras tem aumentando nos últimos anos. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (Ambiente, 2015) o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo sendo comercializadas em torno de 495 mil toneladas de agrotóxicos em 2013 (Ibama, 2015).

De modo geral, os agrotóxicos abrangem uma grande quantidade de substâncias químicas e podem ser classificados de acordo com o tipo de peste, contra a qual agem. Assim, encontram-se os inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodeneticidas, entre outros (Ben-Zur *et al.*, 2011). Os fungicidas do grupo benzimidazóis foram introduzidos na década de 1960 e são amplamente utilizados contra doenças da podridão floral dos citros (*Colletotrichum acutatum*), verrugose (*Elsinoe fawcetti*) e pinta preta (*Guignardia citricarpa*). Os fungicidas mais utilizados desse grupo são benomil, tiofanato-metílico e carbendazim (MBC), com destaque para este último, que em 2012 estava entre os 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil (quase 8 mil toneladas) (Ibama, 2015). Atualmente, o MBC está proibido nos Estados Unidos e faz parte do programa de revisão de substâncias da União Européia. No Brasil a aplicação de MBC na lavoura de citrus está suspensa, porém permitida em outras culturas como, feijão, soja, algodão, trigo e maçã (Anvisa, 2015). O MBC é um fungicida sistêmico (penetra na planta sendo tóxico apenas aos fungos) captado através das raízes, sementes ou folhas, sendo posteriormente distribuído por toda planta (Nufarm, 2015).

Na classificação toxicológica (Anvisa, 2015) o MBC é considerado de classe III (medianamente tóxico para seres humanos), como mostrado na **Tabela I**, porém é considerado muito tóxico no ambiente aquático (Sigma-Aldrich; Palanikumar *et al.*, 2014) e em solos contaminados (Buch *et al.*, 2013) com este fungicida. Ainda, longos períodos de exposição ao MBC levam à diminuição da taxa de sobrevivência, além de alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas nas glândulas adrenais, tireóides, fígado e testículos de ratos (Yu *et al.*, 2009).

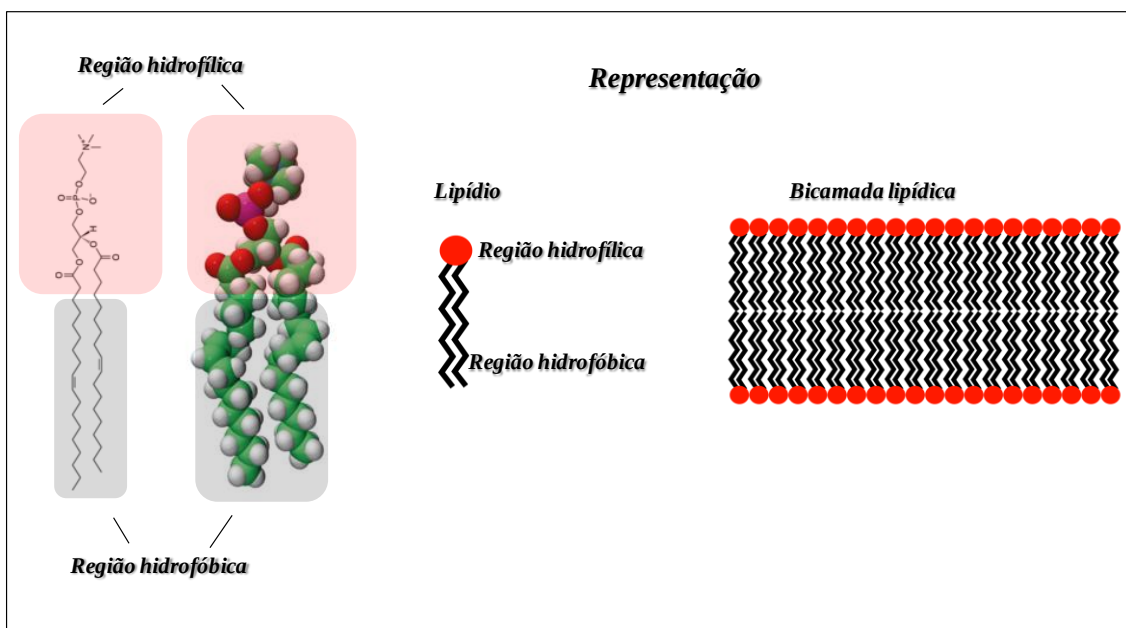
Tabela I. Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Classe toxicológica	Toxidade	Cor da faixa
I	Extremamente tóxico	Vermelha
II	Altamente tóxico	Amarela
III	Medianamente tóxico	Azul
IV	Pouco tóxico	Verde

1.2 Modelos de membrana biológica

Muitos processos fisiológicos nos sistemas celulares dependem das membranas biológicas, as quais são constituídas principalmente pelos lipídios (fosfolipídios ou diacilfosfoglicerídeos, glicolipídios, esfingolipídios e esteróis, como o colesterol, por exemplo) e nas quais as proteínas, responsáveis pela sua funcionalização, estão associadas. Em particular, as moléculas de fosfolipídios, autoassociadas na forma de bicamadas (**Figura 1**) constituem o “citoesqueleto” das células e organelas subcelulares que definem suas fronteiras interna e externa, nas quais são mantidos os gradientes químicos importantes para o seu metabolismo e atividade. É também a primeira barreira *in vivo* na ligação e mediação da ação de diversos tipos de moléculas de atividade biológica/farmacológica (Lasic, 1995).

Figura 1: representação da fórmula estrutural de uma fosfatidilcolina (PC), exemplificada pela molécula zwitteriônica de DOPC (1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina), e a sua organização na forma de bicamada, a estrutura básica das biomembranas. Adaptado de Wikipédia e *Avanti polar lipids*.



Singer e Nicholson, em 1972, propuseram uma estrutura na qual a membrana celular é composta basicamente de uma bicamada lipídica com proteínas inseridas nesta bicamada através de interações intermoleculares (Singer, 1977). Hoje em dia, sabe-se que a membrana celular é muito mais complexa que o modelo proposto e que podem variar de composição dependendo do tipo de célula e do ambiente (Dowling e Wald, 1981). Contudo, o modelo simples de membrana celular (bicamadas) é útil no estudo de fármacos e drogas cuja ação depende da interação com membranas celulares, seja destruindo-as ou por elas passando para agir no núcleo celular, ou interagindo com moléculas inseridas nas membranas que atuam na sinalização celular de fenômenos bioquímicos. Embora a ação farmacológica seja bem conhecida o mecanismo no nível molecular em geral não é entendido. Devido à dificuldade de mimetizar biomembranas inteiras, sistemas modelo vêm sendo usados, como os lipossomos (Lasic e Papahadjopoulos, 1995) os filmes de Langmuir (Brockman, 1999; Brezesinski e

Möhwald, 2003), e Langmuir-Blodgett (LB). Neste trabalho serão utilizados filmes de Langmuir.

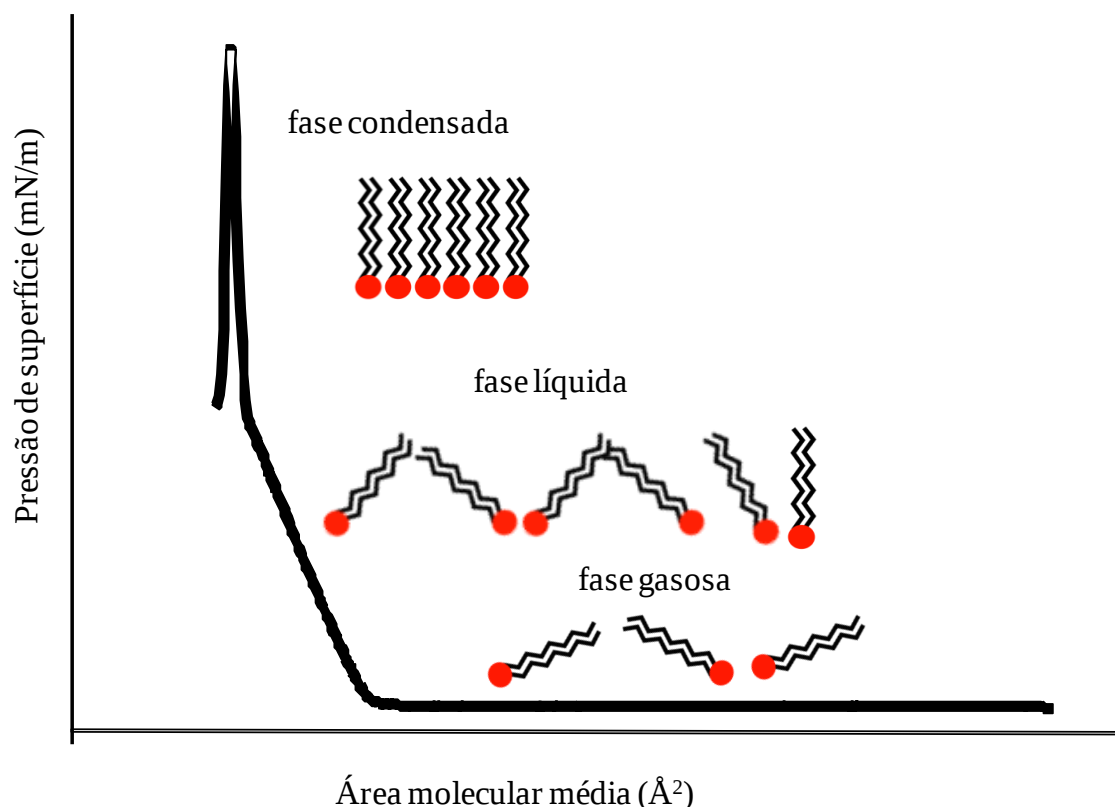
1.2.1. Filmes de Langmuir

No início do século XX, Irving Langmuir reuniu estudos teóricos e experimentais de filmes ultrafinos sobre a superfície da água, descrevendo importantes características e propriedades de tais filmes formados na interface água/ar. Assim, tem início os estudos dos denominados filmes de Langmuir, os quais consistem basicamente de uma monocamada formada por moléculas anfifílicas sobre a superfície da água. Para a fabricação dos filmes de Langmuir é utilizado um sistema experimental denominado cuba de Langmuir composta por um recipiente de teflon onde é vertida a subfase líquida (geralmente, água ultrapura), barreiras móveis para a compressão do filme, cuja velocidade pode ser controlada, e um sensor para determinar a pressão de superfície.

A formação de filmes monomoleculares e insolúveis na superfície da água ocorre tradicionalmente para as chamadas moléculas anfipáticas ou anfifílicas, ou seja, moléculas que possuem uma extremidade atraída pela água (hidrofílica) e outra repelida (hidrofóbica) (Ferreira *et al.*, 2005). Os filmes monomoleculares são obtidos a partir do espalhamento espontâneo da solução do composto sobre a superfície líquida (subfase). Na preparação da solução utiliza-se um solvente orgânico bastante volátil para diluir o composto em estudo. O filme que se obtém após a evaporação do solvente é denominado filme de Langmuir. Uma vez espalhadas, as moléculas são comprimidas pelas barreiras móveis que forçam as moléculas a se orientar de forma que seus eixos fiquem perpendiculares à superfície da água. Desse modo, o grupo hidrofílico da molécula fica em contato com a água enquanto a parte hidrofóbica fica em contato com o ar. As medidas de pressão de superfície vs. área molecular média (isotermas π -A) para

os filmes de Langmuir podem ser utilizadas para obter informações quanto à estruturação da monocamada. Basicamente, as isotermas π -A registram a variação na tensão superficial da água ultrapura durante a formação da monocamada de Langmuir na interface água/ar, desde a chamada fase gasosa (moléculas espalhadas aleatoriamente na superfície da água), passando pela fase líquida (moléculas já apresentam alguma interação), até a fase condensada (moléculas empacotadas e orientadas perpendicularmente à superfície da água), como representado na **Figura 2**. Durante a compressão, as transições de fase podem ser identificadas e relacionadas às reorientações moleculares. Nos filmes comprimidos além da fase condensada as moléculas podem agrupar-se uma sobre as outras desordenadamente provocando o colapso do filme, como ocorre geralmente com moléculas anfifílicas, ou organizar-se em multicamadas como acontece com ligninas (Barros *et al.*, 1999) e polímeros (A.Riul, 1998).

Figura 2: ilustração de uma isoterma π -A mostrando as três fases de compressão do filme de Langmuir até o seu colapso.



A pressão de superfície é medida através do método de Wilhelmy fornecendo um valor absoluto e uma sensibilidade de $5,0 \times 10^{-3}$ mN/m. Devido às flutuações na subfase ou mesmo do ar em torno do sensor, variações de 0,5 mN/m são desprezadas. O sensor de Wilhelmy permanece parcialmente imerso na subfase, suspenso por um fio muito fino e preso a uma eletrobalança. No método de Wilhelmy para a medida da pressão de superfície mede-se a variação na tensão superficial da água em virtude da presença da monocamada. Em última análise mede-se a variação na força de tração que sustenta o sensor parcialmente imerso na subfase. À medida que a monocamada é formada, muda-se a tensão superficial da subfase (antes água pura, depois água pura + monocamada) e, conseqüentemente, muda-se a tração do fio. Esta variação na força de tração relaciona-se com a variação na tensão superficial da subfase e com a geometria

do sensor. Detalhes dos cálculos envolvidos para a determinação da pressão de superfície podem ser encontrados em (Aoki, 2011).

1.2.2. Filmes LbL

A fabricação de filmes finos a partir de camadas alternadas foi proposta inicialmente por R. Iler em 1966, que trabalhou com partículas coloidais carregadas positiva e negativamente (Iler, 1966). Na década de 1990, G. Decher e colaboradores estenderam a fabricação de filmes finos com multicamadas a partir da adsorção via interações eletrostáticas de polieletrólitos catiônicos e aniônicos depositados de forma alternada sobre um substrato sólido com superfície modificada, via tratamento químico (Decher *et al.*, 1992). O método para crescer filmes finos com multicamadas a partir da deposição alternada de monocamadas é denominado automontagem ou *self-assembly* ou ainda *Layer-by-Layer* (LbL). Esta técnica apresenta vantagens consideráveis relacionadas a custos operacionais, tempo e eficiência, além de oferecer também controle na arquitetura molecular dos filmes fabricados. Há diversos mecanismos de adsorção responsáveis pelo crescimento dos filmes LbL, entre eles podemos citar a força iônica, ligação de hidrogênio, força de Van der Waals, interações hidrofóbicas, entres outras. Dessas, a mais comum é a força iônica originada por interações eletrostáticas (Decher *et al.*, 1992; Raposo e Oliveira, 1998).

A técnica LbL consiste na imersão do substrato sólido em uma solução com posterior lavagem para retirada do excesso de material adsorvido. O conjunto é seco e então imerso em uma solução com carga oposta à inicial sendo lavado e seco novamente. Desse modo a primeira bicamada é formada e o crescimento do filme se dá pela repetição deste processo. Lipídios em soluções aquosas formam estruturas

vesiculares, cujas paredes são bicamadas moleculares, e que podem ser depositados em substratos sólidos via LbL mimetizando membranas biológicas.

1.3. Técnicas de detecção

1.3.1. Língua eletrônica

Desde sua primeira publicação em 1985 (Otto e Thomas, 1985), o sistema de língua eletrônica para a análise de líquidos tem sido desenvolvido e aperfeiçoado para a análise de amostras com composições complexas (Riul Jr *et al.*, 2010). A maioria das técnicas utilizadas nas línguas eletrônicas consistia de métodos eletroquímicos (Vlasov *et al.*, 1997; Scampicchio *et al.*, 2006), porém em 2002 Riul *et al.* (Riul *et al.*, 2002), reportam a utilização de espectroscopia de impedância aplicada às línguas eletrônicas. Na língua eletrônica baseada na espectroscopia de impedância as unidades sensoriais são compostas por eletrodos interdigitados recobertos com filmes finos (nanômetros de espessura), cuja elevada sensibilidade permite a detecção de analitos em soluções altamente diluídas ($< \text{nM}$). Essas línguas eletrônicas têm sido usadas na detecção de analitos relevantes para o meio ambiente (Volpati *et al.*, 2008; Olivati *et al.*, 2009), na classificação de bebidas (Constantino *et al.*, 2004) e na detecção de drogas farmacológicas (Aoki *et al.*, 2008). Os filmes são produzidos basicamente pelas técnicas Langmuir-Blodgett (LB), LbL e deposição física à vácuo (PVD, do inglês *physical vapour deposition*), para os quais uma variedade de materiais pode ser utilizados, incluindo polímeros condutores, pigmentos, biomoléculas e compostos híbridos orgânico/inorgânico. Mais recentemente, a imobilização de enzimas (Siqueira *et al.*, 2010) e antígeno (Perinoto *et al.*, 2010) em filmes nanoestruturados tem sido aplicada, gerando biossensores, os quais apresentam especificidade e elevada sensibilidade. Também tem sido empregada na detecção de substâncias húmicas, as quais interagem

bem com pesticidas, em soluções aquosas por uma matriz de sensores. Neste caso o polímero condutor (poli-(o-etoxianilina)) foi depositado sobre os sensores pela técnica *self-assembly* em diferentes tempos de deposição. A matriz de sensores foi capaz de distinguir entre ácidos húmico e fúlvico (substâncias húmicas) (Venancio *et al.*, 2005).

1.3.2. Espectroscopia de impedância

As medidas elétricas são uma importante ferramenta para analisar possíveis interações entre os materiais que constituem os filmes finos e analitos de interesse. Uma das formas de estudo pode ser feita via espectroscopia de impedância, na qual são coletadas curvas de capacitância em função da frequência da corrente alternada aplicada no dispositivo. As medidas *ac* (do inglês, *alternating current*) evitam a polarização das cargas presentes no filme que recobre o eletrodo além de poder ser um processo repetitivo e não destrutivo. Ainda, a polarização poderia alterar significativamente as propriedades dos dispositivos, além de que há sensores que não são seletivos para determinadas substâncias em medidas *dc* (do inglês, *direct current*) mas que são altamente seletivos em medidas *ac* (Musio e Ferrara, 1997).

O conceito de impedância pode ser comparado ao conceito de resistência. Quando se trabalha com medidas elétricas do tipo *ac*, o conceito de resistência passa a ser atribuído também aos capacitores e indutores, na denominada reatância. Assim, entende-se como impedância a resistência total do sistema, ou seja, resistência dos resistores e a reatância (Chinaglia *et al.*, 2008).

A medida é realizada por um analisador de impedância e consiste basicamente em aplicar uma diferença de potencial *ac* e medir a amplitude e a fase da corrente em relação a tensão aplicada. Os parâmetros do sistema em análise (neste caso, filme sobre eletrodointerdigitado imerso em solução ou água) (Basoukov, 2005) são calculados a

partir das grandezas envolvidas como impedância e capacitância. O espectro de impedância cobre uma ampla faixa de frequência, entre 1 e 10^6 Hz, sendo possível analisar as variações nos materiais que recobrem os eletrodos interdigitados. Geralmente, em regiões de baixa frequência, entre 1 e 10^2 Hz, os efeitos são devidos à formação da dupla camada elétrica na interface eletrodo/solução (Riul, A *et al.*, 2003). Em média frequência, entre 10^2 e 10^5 Hz, as respostas são dominada basicamente pelas propriedades do material que reveste os eletrodos interdigitados (Riul, A. *et al.*, 2003). Geralmente é nesta região onde são verificadas as maiores mudanças nos valores de capacitância que surgem da interação da solução com a unidade sensorial. Por fim, a região de alta frequência, acima de 10^5 Hz, é dominada pela capacitância geométrica dos eletrodos interdigitados (Riul, A *et al.*, 2003) e pela constante dielétrica do meio em que estão inseridos (Zaretsky *et al.*, 1988). As curvas de capacitância (em regiões de baixa, média ou alta frequência) em geral sofrem deslocamentos para maiores ou menores valores de frequência dependendo da concentração de íons em solução (Riul, A *et al.*, 2003) e do caráter condutor do filme que recobre o eletrodo. Muitas vezes os resultados destas medidas são sutis, além de gerar uma grande quantidade de dados que são difíceis de ser interpretados. Desse modo, comumente são empregados métodos estatísticos como análise da componente principal (PCA, do inglês *principal component analysis*) ou projeções para facilitar a interpretação dos resultados.

1.3.3. Análise de Dados

Os métodos de detecção quase sempre geram uma grande quantidade de dados e para facilitar a interpretação dos resultados são empregados métodos computacionais para gerar uma representação visual e facilitar a interpretação. Uma das principais ferramentas estatísticas utilizadas para este fim é a análise de PCA, que emprega um método de redução de dimensão estatística linear (Jolliffe, 2002). Contudo, métodos que

envolvam a redução da dimensão através de relações não-lineares têm se mostrados mais eficientes para biossensores (Oliveira Jr *et al.*, 2012). Dentre as técnicas não-lineares de projeção podemos destacar a técnica de mapeamento conhecida como mapa de documentos interativos (IDMAP, do inglês *interactive document map*). Nesta abordagem assume-se, matematicamente, que os dados são representados por $X=(x_1, x_2, \dots, x_n)$ e a diferença (neste caso, a distância) entre dois pontos i e j é dada por $\delta(x_i, x_j)$. Os marcadores gráficos correspondentes ao X são representados por $Y=(y_1, y_2, \dots, y_n)$ através de uma função $f = X \rightarrow Y$ que tenta fazer $|\delta(x_i, x_j) - d(f(x_i), f(y_j))| \sim 0$ para qualquer x_i, x_j pertencente a X e a função distância no plano projetado dada por $d(y_i, y_j)$ (Tejada *et al.*, 2003). A função erro minimizada utilizada na projeção IDMAP é a seguinte:

$$S_{IDMAP} = \frac{\delta(x_i, x_j) - \delta_{min}}{\delta_{max} - \delta_{min}} - d(y_i, y_j) \quad (1)$$

onde δ_{min} e δ_{max} são as mínima e máximas distâncias entre os dados. A partir desta equação é gerado um mapa contendo vários pontos e cada ponto representado por uma medida. A distância entre os pontos está em função da diferença entre as medidas, sendo mais próxima quanto mais semelhante.

1.4. Espectroscopia SERS

A pesquisa em detecção de analitos, ou seja, desenvolvimento de sensores, necessita basicamente que duas condições sejam satisfeitas: seletividade para detectar a molécula alvo (analito) e sensibilidade para detectá-lo nas concentrações de interesse. A técnica de espalhamento Raman é uma técnica bem estabelecida para reconhecimento e identificação de analitos por fornecer a “impressão digital” das moléculas. Contudo, o espalhamento Raman tem seção de choque eficaz muito baixa, portanto, é uma técnica

que, dependendo da concentração e do analito a ser detectado, pode ser inadequada. Este problema pode ser contornado utilizando nanopartículas metálicas (geralmente prata, ouro ou cobre) que podem amplificar o sinal Raman em um fenômeno denominado espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS, do inglês *surface-enhanced Raman scattering*). Este fenômeno foi reportado pela primeira vez em 1974 por Fleischmann *et al.* (Fleischmann *et al.*, 1974) quando utilizavam a espectroscopia Raman para entender as reações eletroquímicas da piridina em eletrodos rugosos de prata. O fenômeno foi interpretado, em 1977, por dois grupos: Albrecht e Creighton (Albrecht e Creighton, 1977) e Jeanmaire e Van Duyne (Jeanmaire e Vanduyne, 1977) em estudos publicados independentemente. A amplificação do sinal Raman pode atingir valores da ordem de 10^6 em média e depende de fatores como o comprimento de onda da radiação incidente, a função dielétrica do metal e do meio, o formato e a forma de agregação das nanopartículas metálicas (Aroca, 2006).

A sensibilidade da técnica, associada com a versatilidade e habilidade em distinguir diferentes compostos fez com que o SERS torna-se uma promissora técnica de detecção (Aroca, 2006; Etchegoin, 2009). Deste modo, tornou-se uma ponderosa ferramenta (Liu *et al.*, 2012; Saute *et al.*, 2012) aplicada para identificar e detectar uma ampla variedade de moléculas como drogas, explosivos e pesticidas (Aoki *et al.*, 2013). Em particular, pesticidas como atrazina, prometrina, trianzina (Bonora *et al.*, 2013), carbaril (Liu *et al.*, 2013), muito utilizados na produção agrícola, já foram feitos estudos para detectá-los via SERS. Na literatura há vários trabalhos relacionados à detecção ultrasensível via SERS (Rubira *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015) incluindo a detecção de uma única molécula (Constantino *et al.*, 2001; Tolaieb *et al.*, 2004), o que mostra a alta sensibilidade que se pode atingir com esta técnica. Porém, de modo geral, estes trabalhos tratam da obtenção de espectros para concentrações

conhecidas. A aplicação da técnica SERS como ferramenta analítica, ou seja, no que se refere à obtenção de curvas do tipo intensidade SERS vs. concentração de um determinado analito, ainda é restrita devido a dois pontos principais: o primeiro referente à reprodutibilidade da intensidade SERS (fator de amplificação) que depende da forma, tamanho e agregação das nanopartículas. Neste aspecto, Otto *et al.* (Otto *et al.*, 2003) reportam que para fatores de amplificação em torno de 10^6 é possível obter espectros SERS reprodutíveis mesmo que ocorra a cada síntese de nanopartículas pequenas variações dos parâmetros citados acima. Ainda, nanopartículas em suspensão coloidal têm sido propostas como substratos SERS para detecção de moléculas biológicas e poluentes (Aroca *et al.*, 2005). Outro ponto é a necessidade de um regime linear para a análise quantitativa. Na maioria dos casos, existe um intervalo de concentração, denominado intervalo dinâmico, em que a intensidade SERS é proporcional à concentração. Assim, sob estas condições, é possível obter espectros SERS reprodutíveis em um determinado intervalo de concentração para certos analitos. Na literatura há poucos trabalhos que abordam este aspecto, como análise quantitativa de glucose (Shafer-Peltier *et al.*, 2003), paraquate (Fang *et al.*, 2015), adenina (Alula e Yang, 2014) e nicotinamida (Sallum *et al.*, 2014).

A amplificação do sinal SERS é atribuída, principalmente, a dois tipos de interações, eletromagnética e química, entre a molécula e a nanopartícula. Ambas podem contribuir simultaneamente para a amplificação do sinal. De um ponto de vista teórico, as interações químicas podem ser distinguidas em três situações: CHEM, ressonante e transferência de carga (CT, do inglês *charge transfer*). Geralmente estas três situações são agrupadas no denominado “mecanismo químico”, enquanto as interações eletromagnéticas são denominadas “mecanismo eletromagnético” (EM, do inglês *electromagnetic mechanism*) (Jensen *et al.*, 2008). Estes mecanismos distinguem-

se basicamente a partir do tipo de interação que ocorre entre a molécula adsorvida e a nanopartícula. Uma consequência da interação é a distorção da nuvem eletrônica da molécula adsorvida. A interação molécula-nanopartícula pode ser fraca (valor da energia de interação mais positivo que -25 kJ/mol) denominando adsorção física, ou forte (valores de energia mais negativos que -40 kJ/mol) denominada adsorção química (Aroca, 2006). A rigor, tanto a adsorção física quanto a química perturbam a nuvem eletrônica molecular, porém esta última provoca uma dramática distorção. Assim, nos espectros SERS de moléculas adsorvidas fisicamente predomina EM enquanto que nos espectros SERS de moléculas adsorvidas quimicamente predomina o mecanismo químico (Aroca, 2000). Neste último caso, (adsorção química) dois diferentes casos devem ser considerados que correspondem a formação de um complexo com e sem estados eletrônicos que podem sofrer uma ressonância devido à uma transição de CT. Neste caso, ocorre transferência de um elétron do nível de Fermi do metal para um orbital molecular não ocupado da molécula adsorvida ou vice-versa, neste caso o laser de excitação deve estar em ressonância com a transição eletrônica. Embora controverso, acredita-se que o EM seja o principal responsável pela amplificação do sinal SERS e será descrito a seguir (Schlücker, 2010).

Quando a adsorção é do tipo física, predomina o EM e este pode ser tratado pela teoria clássica do eletromagnetismo resolvendo as equações de Maxwell para uma esfera imersa em um campo elétrico considerando a aproximação eletrostática, isto é, partículas muito menores que o comprimento de onda incidente. Nessa abordagem, considera-se que as nanopartículas possuam tamanho entre 5 e 10 nm. O primeiro valor do intervalo é devido ao tamanho mínimo para um *cluster* suportar plasmons e o segundo termo devido à condição de que a nanopartícula precisa ser muito menor que o comprimento de onda da radiação incidente (~ 500 -800 nm). Embora, na prática, as

nanopartículas possuam algumas dezenas de nanômetros de tamanho (~50 nm), a aproximação eletrostática ainda é válida considerando alguns efeitos de tamanho (Schlücker, 2010). A completa solução do problema de espalhamento e absorção da radiação eletromagnética por uma esfera é conhecida por teoria de Mie (Maier, 2007).

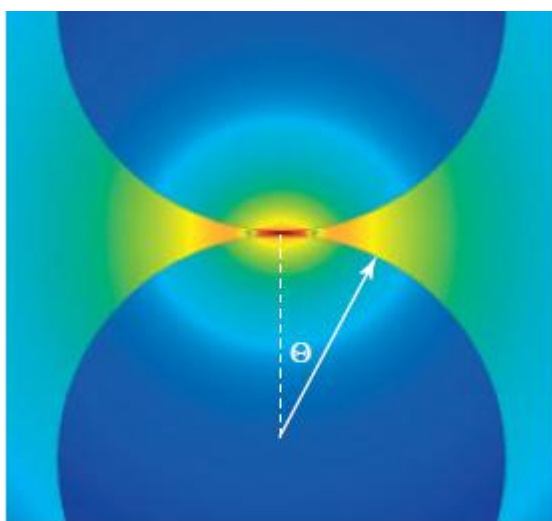
O EM pode ser resolvido considerando uma esfera imersa em um campo elétrico uniforme. A deformação do campo elétrico devido à presença da esfera pode ser obtida através da solução da Equação de Laplace para o potencial. A partir dessa solução o momento de dipolo oscilante do metal (p_{metal}) é dado como:

$$p_{\text{metal}} = \epsilon_{\text{meio}} \frac{\epsilon_{\text{metal}} - \epsilon_{\text{meio}}}{\epsilon_{\text{metal}} + 2\epsilon_{\text{meio}}} 4\pi r^3 E_{\text{laser}} \quad (4)$$

ϵ é a função dielétrica (do meio ou do metal), r é o raio da esfera e E_{laser} o campo elétrico da radiação incidente (laser). As propriedades ópticas dos materiais são caracterizadas pela função dielétrica, $\epsilon(\omega)$, que é dependente da frequência (ω) da radiação incidente. Na equação (4), nota-se que quando $\epsilon_{\text{metal}} = -2 \epsilon_{\text{meio}}$ implica que $\epsilon_{\text{metal}} + 2 \epsilon_{\text{meio}} \rightarrow 0$ e uma condição de ressonância é estabelecida, originando uma amplificação do campo elétrico em determinada região da nanopartícula, denominado ressonância localizada de plasmon em superfície (LSPR, do inglês *localized surface plasmon resonances*). Assim, no intervalo de frequência visível (400×10^6 e 790×10^6 Hz) os metais que podem satisfazer a condição $\epsilon_{\text{metal}} = -2 \epsilon_{\text{meio}}$ são a prata, o ouro e o cobre. Vale salientar que a função dielétrica é uma grandeza complexa ($\epsilon(\omega) = \epsilon(\omega)' + i\epsilon(\omega)''$) e na prática não é possível satisfazer completamente a condição de ressonância, porque o valor da parte complexa é diferente de zero no comprimento de onda utilizado (visível). O que se busca, no entanto, é que a parte real satisfaça a condição, ou seja, $\text{Re}[\epsilon_{\text{metal}} = -2\epsilon_{\text{meio}}]$ e que a parte complexa seja próxima de zero ($\text{Im}[\epsilon] \sim 0$) (Schlücker, 2010).

A amplificação do espalhamento Raman (SERS) ocorre quando uma molécula está

Figura 3: ilustração da formação de um *hot spot* devido à aproximação de duas nanopartículas cilíndricas de prata. A intensificação da amplificação é mostrada em uma escala de cor, em que o vermelho representa a região mais intensa e o azul a menos intensa. Adaptado de (Schlücker, 2010)]



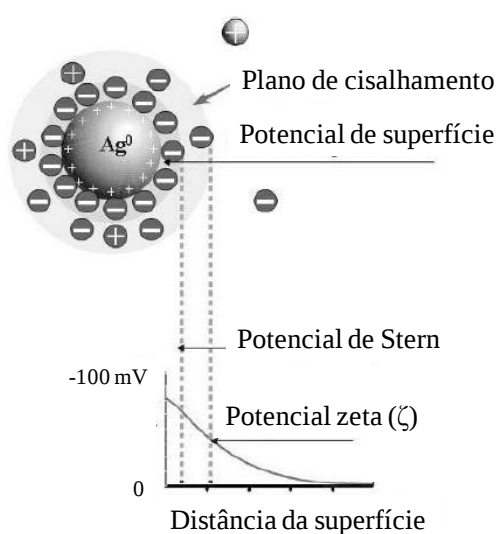
próxima da nanopartícula (esfera metálica). Ao incidir a radiação eletromagnética no conjunto molécula-nanopartícula, o campo elétrico total (E_{local} , campo elétrico do laser e do campo elétrico das nanopartículas) irá induzir um momento de dipolo na molécula. O momento de dipolo induzido da molécula gera um momento de dipolo induzido na nanopartícula, que oscila com a mesma frequência do momento de dipolo da molécula. Esse momento

de dipolo da nanopartícula (p_2) pode ser descrito como p_{metal} (Equação 4) e satisfaz as mesmas condições que para uma nanopartícula isolada. Desse modo, p_2 é o principal componente de amplificação do sinal Raman. Embora os cálculos apresentados do EM foram feitos para uma nanopartícula isolada, na prática o sinal SERS é obtido tanto de nanopartículas isoladas quanto de agregados. Nos agregados, são encontrados regiões intersticiais, denominados *hot spots* (**Figura 3**), em que a densidade de campo eletromagnético é maior e, consequentemente, moléculas posicionadas nestes *hot spots* sofrerão máxima amplificação Raman.

Nanopartículas

Os substratos SERS podem ser agrupados em três grupos: 1- nanopartículas em suspensão; 2- nanopartículas imobilizadas em substrato sólido e 3- nanoestruturas fabricadas diretamente em substratos sólidos, através da nanolitografia (Fan *et al.*,

Figura 4: ilustração da nanopartícula metálica com a presença da dupla camada. Adaptado de (Aroca 2006).



2011). O uso das nanopartículas em suspensão é bem estabelecido para SERS, pois apresenta alto desempenho, alta estabilidade dos colóides, fácil método de preparo, além de condições experimentais com alta reprodutibilidade (Izquierdo-Lorenzo *et al.*, 2012). Assim, nanopartículas metálicas em suspensão são amplamente utilizadas como substratos SERS, e podem ser sintetizadas em diversas morfologias, tais como esféricas, triangulares, cubos, estrelas, etc.

No caso das nanopartículas esféricas de prata, as nanopartículas são formadas a partir da redução do íon prata (Ag^+) para prata metálica (Ag^0). No caso, das nanopartículas reduzidas por citrato, o mecanismo de formação se dá em algumas etapas. Inicialmente, as sementes de prata são formadas pelo processo inicial de redução induzido pelo citrato. As várias sementes aglomeram-se para formar estruturas maiores (~50 nm), através do processo conhecido como maturação de Ostwald (Pillai, 2004). Do mesmo modo, as nanoestrelas e os nanoprismas são formadas em duas etapas, em ambos no primeiro estágio ocorre o crescimento de pequenas nanopartículas facetadas. No caso das nanoestrelas no processo subsequente ocorre o crescimento dos “braços”, maiores detalhes podem ser encontrados na referência (Garcia-Leis, 2013). Já os

nanoprismas podem ser formados a partir das reações de fotoquímica ou redução química. Ainda, íons haletos (cloro e bromo) podem ser utilizados para otimizar as propriedades dos nanoprismas (Cathcart, 2009) (Millstone, 2009).

A prata possui características de um metal com cargas positivas fixas e cargas negativas móveis, que facilmente difundem para a solução aquosa deixando a superfície da prata carregada positivamente. Os íons negativos presentes no colóide tendem a ser adsorvidos na superfície da prata para compensarem o desequilíbrio de cargas, como ilustrado na **Figura 4**. Desse modo, a nanopartícula possui uma densidade de carga superficial e que pode ser medida através do cálculo do potencial zeta (ζ). Estes íons desempenham dois papéis fundamentais: i) na estabilidade do colóide, pois a repulsão colombiana, causada pela presença dos íons na superfície, é maior que a atração de Van-der-Waals (força motriz para a agregação das nanopartículas); ii) na interação com o analito de interesse, pois elas são o intermédio entre as nanopartículas e as moléculas alvo. Para cada tipo de síntese de nanopartículas há uma camada de íons adsorvidos. Por exemplo, nanopartículas de prata reduzidas por hidroxilamina possuem íons de cloro (Cl^-) adsorvidos na superfície enquanto reduzidas por citrato, este está adsorvido. Nos estudos desenvolvidos por Munro *et al.* (Munro *et al.*, 1995) algumas características das nanopartículas reduzidas por citrato são apresentadas, tais como absorbância máxima do plasmon em 404 nm, partículas com tamanho médio de 27 nm e a presença de uma camada orientada de citrato na superfície metálica. A presença dessa espessa camada (denominada camada de Stern) gera um potencial zeta (ζ) de -52 mV, entre pH 6 e 10 (Alvarez-Puebla *et al.*, 2005), que garante a alta estabilidade do coloide frente ao tempo, impedindo a agregação devido à repulsão eletrostática. Em valores de pH muito alcalino (entre 10 e 12) ocorre a precipitação, provavelmente, devido à formação de óxido na superfície metálica.

Conforme citado na seção anterior, a formação de *hot spots* pode melhorar a amplificação do sinal SERS. Há dois modos de agregar as nanopartículas para obter os *hot spots*: primeiro seria baixar o pH (-20 mV em pH 2) (Alvarez-Puebla *et al.*, 2005) e o segundo adicionar íons ao colóide. Os dois métodos diminuirão a repulsão eletrostática entre as nanopartículas, provocando a agregação. Vale ressaltar que a própria molécula alvo pode atuar como agente agregante das nanopartículas, mas muitas vezes a adição de sais é mais favorável. Conforme reportado por Munro *et al.* (Munro *et al.*, 1995) um inconveniente de nanopartículas agregadas baixando o pH é a presença de sinal SERS da camada de citrato.

1.5. Objetivo geral

Esta tese tem como objetivo geral estudar a interação de MBC com modelos bioinspirados (sistemas que mimetizam modelos biológicos) e então aplicar diferentes técnicas na detecção de MBC. A partir de tais estudos avançar na área de tecnologia aplicada na detecção de analitos de interesse.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos da tese são abordados nas seguintes atividades:

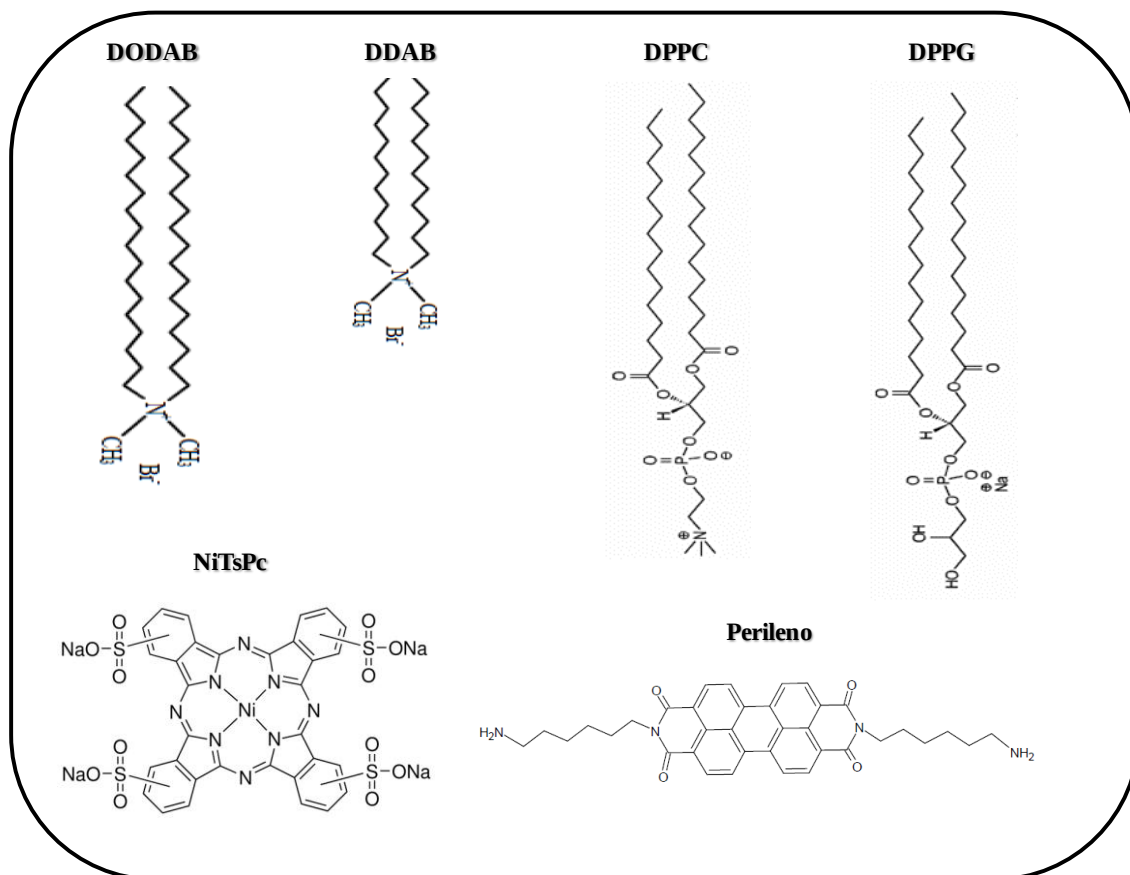
- i) Estudar a interação do MBC com lipídios e fosfolipídios com diferentes densidades de cargas.
- ii) Aplicar os lipídios em unidades sensoriais para discriminação de diferentes concentrações de MBC.
- iii) Sintetizar nanopartículas com diferentes morfologias através de rota “úmida” obtendo suspensões coloidais.
- iv) Avaliar para qual das nanopartículas o sinal SERS é mais intenso e a partir daí aplicar uma metodologia de detecção.
- v) Estudar a interação entre MBC e a nanopartícula estudada no item iv.
- vi) Estabelecer o limite de detecção do MBC.

Capítulo 2

2.1. Materiais e reagentes

Os lipídios brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB, massa molar: 630,95 g/mol) e brometo de didodecildimetilamônio (DDAB, massa molar: 462,63 g/mol) foram adquiridos comercialmente da Fluka e os fosfolipídios 1,2-dipalmitoil-sn-3-glicerol-fosfatidilcolina (DPPC, massa molar: 734,04 g/mol) e 1,2-dipalmitoil-sn-3-glicerol-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (DPPG, massa molar: 744,95 g/mol) adquiridos da Avanti Polar Lipids, suas estruturas moleculares são apresentadas na **Figura 5**. O perileno utilizado nos filmes LbL foi sintetizado no Grupo de Polímeros do Instituto de Física de São Carlos – USP e seus espectros de absorção no UV-Vis e Raman estão no **Anexo**. O MBC (191,19 g/mol, 97%), nitrato de prata (AgNO_3 , 169,87 g/mol, 99%), hidroxilamina hidrocloreada ($\text{NH}_2\text{OH HCl}$, 69,49 g/mol, 99%), nitrato de potássio (KNO_3 , 101,10 g/mol, 99%), hidróxido de sódio (NaOH , 40,00 g/mol, 97%), trisódio citrato dihidratado (294,10 g/mol), ácido cloroáurico trihidratado (393,83 g/mol), borohidreto de sódio (NaBH_4 , 37,83 g/mol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todas as soluções estoque de MBC foram preparadas com etanol obtidos da VWR, Prolab e as demais soluções preparadas com água do sistema Milli-Q (18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ resistividade).

Figura 5: estruturas moleculares do DODAB, DDAB, DPPC, DPPG, NiTsPc e do perileno utilizados neste trabalho.



2.2. Filmes de Langmuir

Nesta tese foi utilizada uma cuba de Langmuir modelo KSV-NIMA equipada com barreiras móveis e subfase de 240 mL. Os filmes de Langmuir foram formados na interface ar/água onde os lipídios e fosfolipídios foram espalhados sobre a superfície da água. Após testes iniciais foram determinados alguns parâmetros que melhor reproduzem as isotermas, tais como: concentração das soluções espalhadas (0,5 mg/mL), volume espalhado (30 µL), velocidade da barreira (10 mm/min) e o tempo de espera para a evaporação do solvente (antes do fechamento das barreiras) (20 min). Neste caso, as soluções foram preparadas em clorofórmio.

A compressão isobárica foi realizada comprimindo a barreira até a pressão de 30 mN/m e em seguida a posição das barreiras foi mantida fixa e mantido um tempo para a estabilização do sistema. Após a estabilização da pressão, foi injetado na subfase por detrás das barreiras 100 µL de MBC diluído em etanol ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L). Para garantir que as diferenças observadas na dinâmica isobárica são decorrentes da presença de MBC e não do etanol ou da turbulência gerada na interface, previamente foi injetado na subfase da monocamada formada etanol puro nas mesmas condições. Também foi realizada a dinâmica isobárica sendo a subfase uma solução salina de brometo de potássio (0,01 mol/L).

2.3. Filmes LbL

Para a fabricação dos filmes LbL foi utilizada dispersão de DODAB e DPPG em água ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L). As dispersões foram aquecidas a 60 °C durante alguns minutos para solubilização do lipídio em água e estocadas em temperatura ambiente (23 °C). A solução de ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc) ($5,0 \times 10^{-2}$ mol/L) foi obtida por diluição simples em água, a temperatura ambiente e pH 5,6 (água ultrapura). A solução de perileno ($2,0 \times 10^{-4}$ g/mL) foi preparada em pH 2 e posteriormente filtrada para retenção de material sólido. As soluções aquosas de PAH e PSS, ambas com 1,0 mg/mL, foram preparadas pela simples diluição em água ultrapura. A escolha de NiTsPc e perileno como materiais suporte se deu, porque estes materiais são considerados ativos em medidas eletroquímicas. Além disso, a NiTsPc em solução possui característica aniônica e o perileno catiônica, condição necessária para a fabricação de filmes LbL de DODAB (catiônico) e DPPG (aniônico).

Os filmes LbL de DODAB/NiTsPc foram manualmente crescidos a partir da imersão do substrato sólido de forma alternada nas dispersões de DODAB e soluções de

NiTsPc. Primeiramente, o substrato foi imerso na dispersão catiônica de DODAB por um período de 3 minutos para a adsorção das moléculas na superfície. Em seguida, o substrato contendo a primeira camada de DODAB foi imerso em água ultrapura para remover o excesso de material catiônico. Posteriormente, o substrato foi imerso na solução aniônica de NiTsPc durante 3 minutos para adsorção das moléculas. Este processo foi repetido 5 vezes. Os filmes LbL de Perileno/DPPG foram crescidos da mesma maneira, porém agora a solução catiônica foi de Perileno e a aniônica de DPPG.

2.4. Língua eletrônica

Uma língua eletrônica composta por três unidades sensoriais foi utilizada na detecção de MBC ($1,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-9}$ e $1,0 \times 10^{-10}$ mol/L) dissolvido em água, via espectroscopia de impedância. As medidas iniciaram a partir da menor concentração para a maior concentração com a adição de alíquotas de uma solução de MBC previamente preparada. As medidas elétricas foram realizadas em um analisador de impedância *Solartron* modelo 1260A. Curvas de capacitância entre 1 e 10^6 Hz foram coletadas para o sinal de entrada aplicado com amplitude de 50 mV. As unidades sensoriais foram formadas por eletrodos interdigitados de ouro recobertos com filmes LbL de DODAB/NiTsPc e Perileno/DPPG além de um eletrodo de ouro sem recobrimento. É importante ressaltar que previamente foi depositada uma camada de PAH/PSS (filme LbL) nos eletrodos de ouro para minimizar os efeitos do substrato (Lobo *et al.*, 2003). Os eletrodos de ouro utilizados neste trabalho possuem duas configurações sendo uma de 60 dígitos, cada um com 40 μm de largura, 100 nm de altura e espaçados entre si a cada 40 μm (eletrodo 40). A outra configuração é de 100 dígitos, com 10 μm de largura, 100 nm de altura e espaçados entre si a cada 10 μm (eletrodo 10).

2.5. Técnica de projeção

O método de visualização de informação conhecido técnica de projeção foi utilizado para avaliar e comparar as respostas elétricas obtidas por todas as unidades sensoriais empregadas neste trabalho. A técnica de projeção mapeia cada medida dentro de um elemento visual (cada círculo no quadro de resultados) preservando, até certo ponto, as relações de similaridade entre eles. Nos resultados, respostas similares das unidades sensoriais são posicionadas próximas umas das outras, e a diferença entre eles leva ao distanciamento. Mais detalhes podem ser encontrados em (Paulovich *et al.*, 2010). Neste trabalho foi utilizado o programa *Pex-Sensor* (Paulovich *et al.*, 2011) para a geração do mapa, sendo utilizada distância Euclidiana e sem normalização dos dados.

2.6. Síntese das nanopartículas

2.6.1. Coloides de prata reduzidas por hidroxilamina (AgH)

O procedimento adotado é semelhante ao descrito por Leopold and Lendl (Leopold e Lendl, 2003). O método consiste na adição de 300 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH, 1,0 mol/L) em 90 mL de solução aquosa de hidroxilamina hidrociorada ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, $1,66 \times 10^{-3}$ mol/L) sob agitação. A essa mistura adicionaram-se, gota a gota, 10 mL de uma solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3 , $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L). A suspensão coloidal permaneceu, sob agitação, 10 minutos após a adição de nitrato de prata e foi esperado pelo menos 24 horas, para início dos experimentos.

2.6.2. Coloides de prata reduzidas por citrato (AgCT)

A síntese de nanopartículas de prata reduzidas por citrato, descrita por Lee e Meisel (Lee e Meisel, 1982) foi feita do seguinte modo: 50 mL de nitrato de prata ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) foram colocados sob aquecimento até a ebulição e então adicionado 1,0 mL de citrato dihidratado (0,0387 mol/L). Essa mistura foi mantida em ebulição sob refluxo durante 1 hora.

2.6.3. Coloides de ouro reduzidos por citrato (AuCT)

O método proposto é semelhante ao descrito por Frens (Frens, 1973). Basicamente, adicionam-se 100 µL de ácido cloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,118 mol/L) em 40 mL de água ultrapura sob agitação. A essa mistura acrescentaram-se gota a gota 1,0 mL de citrato de sódio (0,0387 mol/L). A solução é colocada sob aquecimento até atingir a ebulição permanecendo por 5 minutos.

2.6.4. Coloides de nanoestrelas de prata (AgE)

O método é descrito por Garcia-Leis *et al.* (Garcia-Leis *et al.*, 2013) e consiste em adicionar 250 µL de hidróxido de sódio (0,1 mol/L), 500 µL de hidroxilamina ($6,0 \times 10^{-2}$ mol/L) e 9,0 mL de nitrato de prata ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) em 250 µL de água ultrapura em agitação. A suspensão adquiriu uma cor cinza escuro imediatamente. Após 5 min foram adicionados 100 µL de uma solução de citrato (1% w/v) e a suspensão permaneceu sob agitação por mais 15 min.

2.6.5. Coloides de nanoprismas triangulares de prata (AgT)

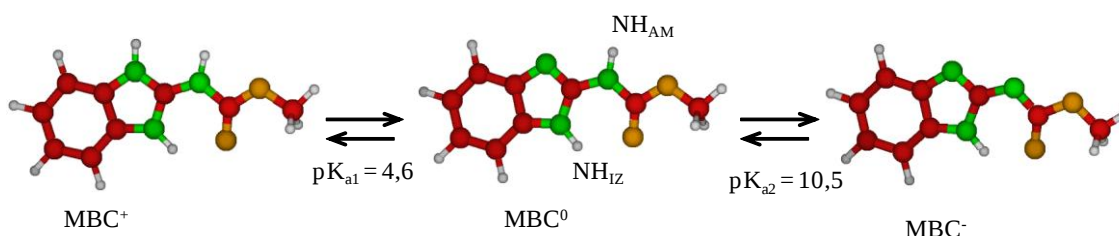
O método de preparação é descrito por Métraux e Mirkin (Metraux e Mirkin, 2005) e adaptado por Cathcart *et al.* (Cathcart *et al.*, 2009). Consiste em preparar uma solução aquosa (40 mL) contendo citrato de sódio ($2,4 \times 10^{-3}$ mol/L), nitrato de prata ($1,2 \times 10^{-4}$ mol/L), peróxido de hidrogênio ($2,6 \times 10^{-4}$ mol/L) e brometo de potássio ($6,5 \times 10^{-6}$ mol/L). Essa solução foi mantida sob refrigeração durante 30 min a 4 °C e então adicionados, sob forte agitação, 480 µL de solução de boroidreto de sódio (0,1 mol/L) recém preparada.

2.7. Cálculos teóricos

A estrutura otimizada e o campo de força do MBC neutro (MBC⁰), benzimidazol (BIZ) e do imidazol (IZ) foram calculados utilizando a função híbrida B3LYP e a base 6-31G* (comumente representado por B3LYP/6-31G*). Já foi demonstrado em trabalhos anteriores que esta base de cálculo reproduz satisfatoriamente o espectro vibracional de moléculas aromáticas (Bencivenni *et al.*, 2000; Giffin *et al.*, 2009). A otimização da geometria de MBC⁰ foi considerada como sendo uma estrutura planar, com simetria Cs, cuja ligação de hidrogênio intramolecular ocorre entre o NH imidazólico e o átomo de oxigênio amídico. A geometria do MBC⁰ concorda com uma simetria local mostrando ser um sólido cristalino, proporcionando maior cristalinidade que a molécula de BIZ e dando ao MBC menor solubilidade em água e maior ponto de fusão comparado ao BIZ, conforme resultados experimentais (Ni *et al.*, 2002). A estrutura otimizada da espécie protonada e desprotonada (MBC⁺ e MBC⁻, respectivamente) e suas frequências vibracionais correspondentes também foram calculadas. A **Figura 6** mostra a geometria otimizada das espécies de MBC utilizando o

conjunto B3LYP/6-31G* e descreve a nomenclatura de duas ligações NH distintas: NH_{IZ} imidazólico e NH_{AM} amídico.

Figura 6: estruturas otimizadas utilizando B3LYP/6-31G* das diferentes espécies de MBC que podem existir em solução aquosa dependendo do pH.



As diferentes espécies de MBC apresentam mínimo de energia e não foi usado fator de escala para as frequências vibracionais, já que estudos prévios indicam desvios menores que 5% em relação aos resultados experimentais (Cai *et al.*, 2008). Todos os cálculos foram realizados usando o pacote computacional GAUSSIAN 09 (M. J. Frisch, 2009).

Para elucidar a interação entre o complexo MBC-Ag foi considerado um simples modelo teórico envolvendo um átomo de prata ligado a diferentes espécies de MBC. Este modelo foi considerado por ser a melhor relação entre custo computacional e modelo aceitável para a investigação da interação do MBC com a prata. Além disso, este modelo teórico vem sendo aplicado nos estudos SERS envolvendo transferência de carga no grupo do professor Juar Carlos Otero (Centeno *et al.*, 2006). Outra forma seria a utilização de *cluster* de prata, com um maior custo computacional (Huda e Ray, 2003). O átomo de prata foi considerado possuindo densidade de carga positiva ou negativa, dependendo do estado de protonação do MBC para minimizar a repulsão eletrostática entre as nanopartículas e o MBC. Além disso, nessa configuração o átomo de prata possui a última camada da distribuição eletrônica completa evitando problemas

computacionais. Para o complexo MBC-Ag, a função B3LYP e a base LanL2DZ foram utilizadas para determinar a estrutura molecular otimizada e o campo de força dos complexos propostos ($\text{MBC}^0\text{-Ag}^+$, $\text{MBC}^+\text{-Ag}^-$ e $\text{MBC}^-\text{-Ag}^+$). Este procedimento de cálculo tem sido utilizado para análise de processos de transferência de carga em SERS de moléculas que possuem grupos benzênicos (Avila *et al.*, 2011; Centeno *et al.*, 2012).

2.8. Instrumentação

Os espectros de absorção no UV-Vis foram obtidos em um espectrômetro UV-visível-NIR Shimadzu 3600 equipado com um tubo fotomultiplicador (PMT, do inglês *photomultiplier tube*) para a região UV-visível e detectores de InGaAs e PbS para a região do infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*). Os espectros Raman e SERS foram obtidos em um espectrógrafo micro-Raman Renishaw modelo inVia, equipado com um dispositivo de carga acoplada (CCD, do inglês *charge-coupled device*) esfriada eletricamente e linhas laser em 532, 633 e 785 nm, além de redes de difração com 1800 l/mm e 1200 l/mm. As medidas de espectroscopia de impedância foram realizadas em um equipamento Solartron modelo 1260. As medidas de potencial zeta e tamanho hidrodinâmico foram realizadas em um equipamento NanoBrook ZetaPALS equipado com laser de diodo de comprimento de onda 640 nm e potência de 35 mW. As imagens MEV obtidas em um Hitachi S-4800 FESEM.

Capítulo 3

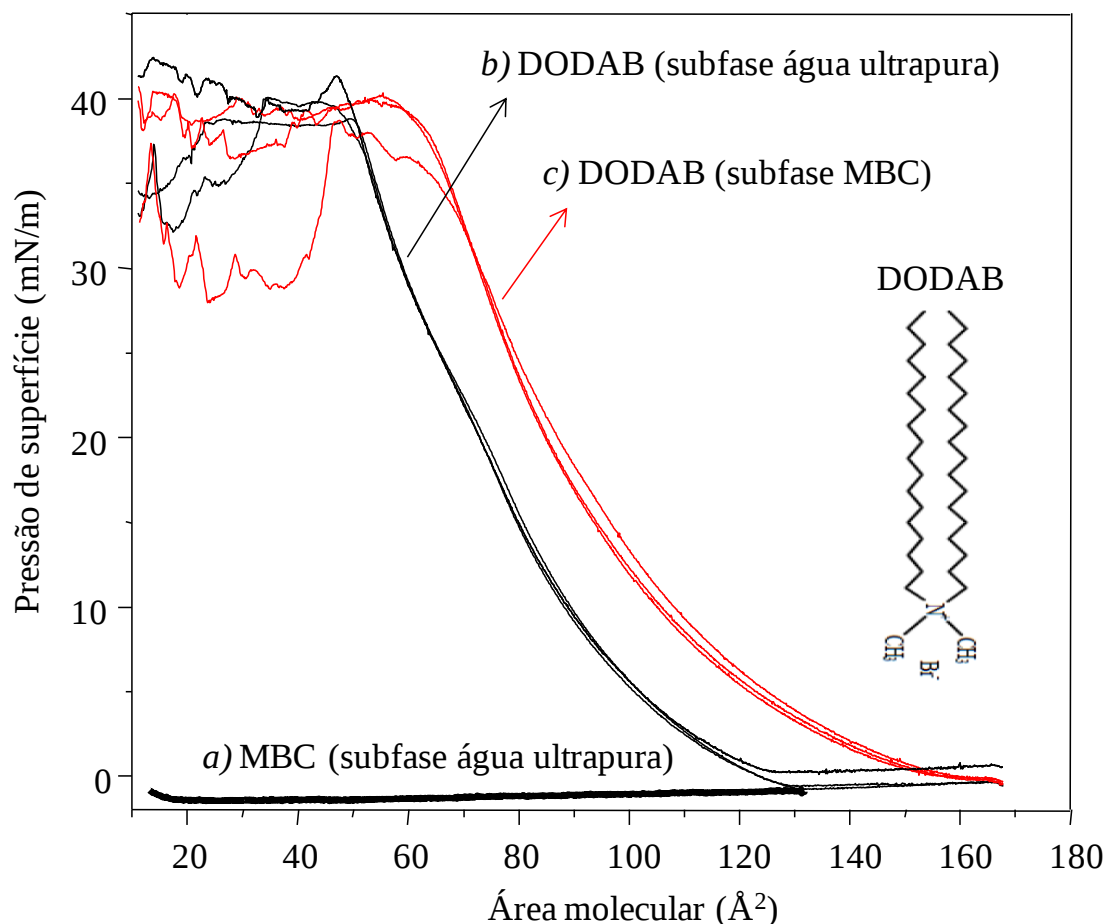
3.1. Estudo da interação entre MBC e modelos de membrana

A escolha dos diferentes lipídios e fosfolipídios utilizados nesta pesquisa está relacionada à diferença na carga líquida de cada um. O DODAB possui uma carga líquida positiva enquanto o DPPC é zwitteriônico (carga líquida neutra) e o DPPG apresenta carga líquida negativa. Além disso, o DPPC possui um grupo fosfatidilcolina (PC) que está presente em várias células *in vivo*, além de ser amplamente empregado como modelo de membrana celular (Krajewska et al. 2011) (Montanha et al. 2010) (Bretscher 1972). O DDAB é semelhante ao DODAB com carga líquida positiva, porém possui cadeia alifática com 12 carbonos enquanto o DODAB possui 18 carbonos. Estudos indicam que proteínas são capazes de difundir rapidamente através da camada de DDAB (Nassar et al. , 1995) (Nassar et al 1997) e essa pode ser uma vantagem importante no emprego de DDAB neste estudo.

3.1.1. DODAB

Antes de iniciar os estudos com filmes Langmuir de lipídios/fosfolipídios foi avaliada a capacidade de formação de filme de Langmuir do MBC. A **Figura 7** mostra as isotermas π -A de MBC com água ultrapura na subfase (**Figura 7a**), além das triplicatas das isotermas π -A de DODAB na ausência (**Figura 7b**) e na presença de MBC (**Figura 7c**) na subfase.

Figura 7: a) isoterma π -A de MBC com subfase de água ultrapura. Triplicata das isotermas π -A de DODAB com a subfase de b) água ultrapura e c) solução aquosa de MBC ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L).



Os resultados mostram que quando apenas MBC foi espalhado na interface ar/água não houve aumento na pressão de superfície (**Figura 7a**). Este resultado evidencia a ausência de atividade de superfície do MBC, não formando filmes de Langmuir. Goto *et al.* (Goto et al. 2014) trabalhando com mefloquina (medicamento antimalárico) observam que embora o composto apresente ausência de atividade de superfície quando é espalhado sozinho, quando coespalhado com de lipídios passa a ter a atividade de superfície do mefloquina. Em nosso caso, este efeito não ocorreu (resultados não mostrados), ou seja, mesmo coespalhado MBC+lipídio o MBC não

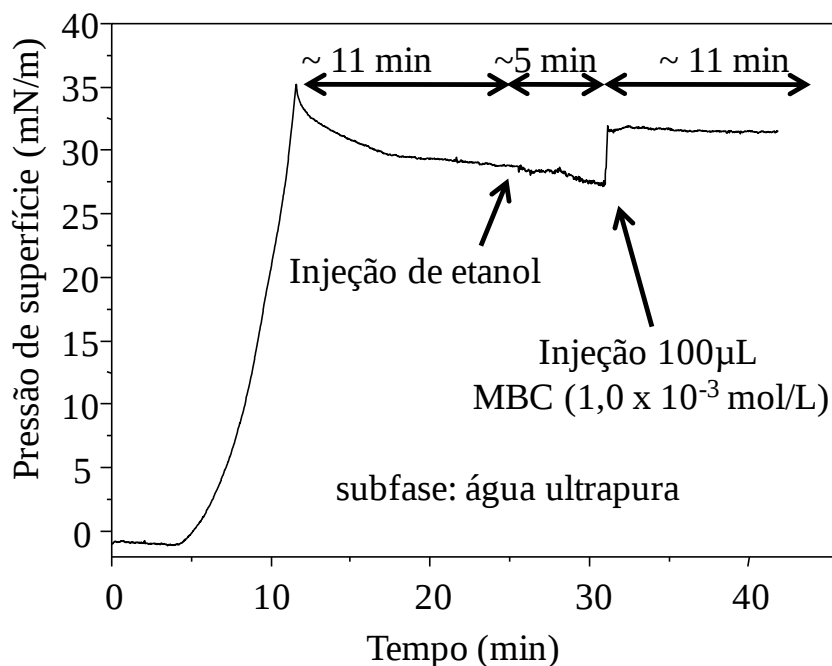
permaneceu na interface. Portanto, as mudanças nas isotermas π -A dos lipídios e fosfolipídios podem ser atribuídas exclusivamente à interação do MBC com a monocamada.

As isotermas π -A de DODAB (**Figura 7b**) mostram que a pressão começou a subir em torno de 120 $\text{\AA}^2$ e a pressão de colapso ocorreu em 38 mN/m. A área molecular determinada a partir da extrapolação da região de colapso até o eixo da abscissa foi em torno de 87 $\text{\AA}^2$. O alto valor da área molecular média pode ser reflexo da grande repulsão eletrostática entre as cargas positivas na região hidrofílica, já que a área ocupada por uma cadeia alquílica simples com seu eixo maior horizontalmente sobre a água é de 56 $\text{\AA}^2$ (Gupta et al. 1992). A presença do MBC na subfase (**Figura 7c**) causou mudanças significativas nas isotermas π -A de DODAB. A mais significativa é o deslocamento das isotermas π -A de DODAB para maiores áreas com o início da subida em 157 $\text{\AA}^2$, o valor da pressão de colapso quase não sofreu diferença ocorrendo em 40 mN/m. Vale destacar que a isoterma permanece deslocada mesmo a altas pressões. A área molecular média obtida a partir da extrapolação da região de colapso aumentou 25 $\text{\AA}^2$ em relação à água ultrapura, passando de 87 para 112 $\text{\AA}^2$. Estes resultados sugerem que MBC interage com a monocamada de DODAB e devido ao deslocamento significativo das isotermas π -A pode-se supor que o MBC penetra na monocamada. Resultados semelhantes são reportados por Silva e Romão (Silva *et al.* 2005), quando há nicotina na subfase a isoterma π -A de DODAB desloca para maiores áreas. Porém quando DODAB é coespalhado com DPCC, a isoterma π -A desloca-se apenas em baixas pressões, revelando que a nicotina é expulsa da monocamada na fase condensada, provavelmente devido à alta coesão entre o DODAB e DPCC.

Os resultados apresentados até aqui demonstram que o MBC interage com a monocamada de DODAB na interface ar/água. Contudo, até agora, todas as isotermas

π - A foram feitas com o MBC presente em todas as fases de formação da isoterma (gasosa, líquida e condensada). Buscamos saber se o MBC pode interagir com o DODAB quando a monocamada já está formada em uma pressão fixa. A pressão escolhida foi de 30 mN/m porque nos sistemas biológicos os lipídios das membranas celulares estão empacotados e possuem uma pressão lateral em torno de 30 mN/m (Marsh 1996). Esta pressão também será usada no estudo com os outros lipídios/fosfolipídios. A **Figura 8** mostra a dinâmica de penetração do MBC na monocamada de DODAB a uma pressão inicial de 30 mN/m. Neste experimento foi feita uma isoterma π -A de DODAB com água ultrapura na subfase. As barreiras foram fechando até atingir uma pressão um pouco acima de 30 mN/m e então mantidas fixas. O sistema relaxou e após cerca de 11 minutos a pressão estabilizou em torno de 28 mN/m. Após esse período foi injetado na subfase, por detrás das barreiras, 100 μ L de etanol para garantir que as mudanças na pressão de superfície da monocamada são devidas ao MBC e não ao etanol ou à turbulência gerada. Em seguida foram injetados 100 μ L de MBC ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) do mesmo modo, a concentração de MBC na subfase foi em torno de $4,16 \times 10^{-7}$ mol/L.

Figura 8: dinâmica da penetração de MBC na monocamada de DODAB. Fechamento das barreiras, estabilização da pressão com posterior injeção de etanol e MBC.



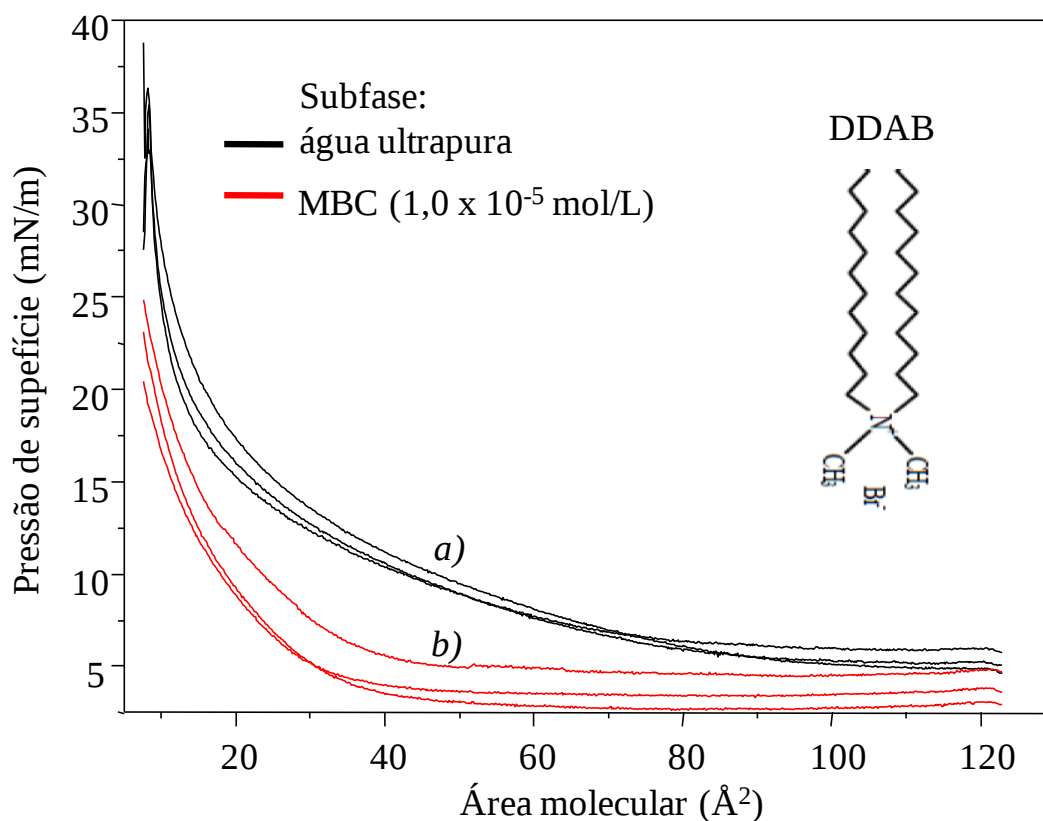
Conforme mostra a **Figura 8**, a injeção de etanol não causou grandes mudanças na pressão de superfície da monocamada. Houve apenas uma leve perturbação no sistema causando ligeira queda na pressão, porém após 5 min a pressão estabilizou-se em torno de 27 mN/m. A adição de MBC provocou um abrupto aumento na pressão de superfície para 32 mN/m e a pressão de superfície permaneceu estável nos 11 minutos posteriores à adição. Na literatura, é reportado um fenômeno denominado “efeito pistão” (Caseli *et al.* 2006) em que ocorre aumento instantâneo da pressão (atribuído à alta afinidade da molécula alvo pela interface) com posterior relaxação (devido ao rearranjo das moléculas). Quando urease é injetada na subfase de uma monocamada de DPPG, por exemplo, o aumento é gradativo até atingir um patamar após 10 min (Caseli *et al.* , 2008), e no caso dos nucleotídeos, dependendo da composição química, a adsorção em uma monocamada de DPPC pode ser rápida ou lenta (Caseli *et al.* 2010). Em nosso caso houve um aumento abrupto na pressão, porém não houve queda na

pressão (como no efeito pistão). Este é mais uma evidência de que o MBC esteja interagindo com a monocamada e permanecendo na interface mesmo quando a monocamada está empacotada havendo pressão lateral.

3.1.2. DDAB

A interação entre MBC e DDAB também foi investigada via filmes de Langmuir. A **Figura 9** mostra as triplicatas das isothermas π -A de DDAB com a subfase de água ultrapura (**Figura 9a**) e solução de MBC (**Figura 9b**).

Figura 9: triplicata das isothermas π -A de DDAB com a) água ultrapura e b) MBC ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) na subfase.



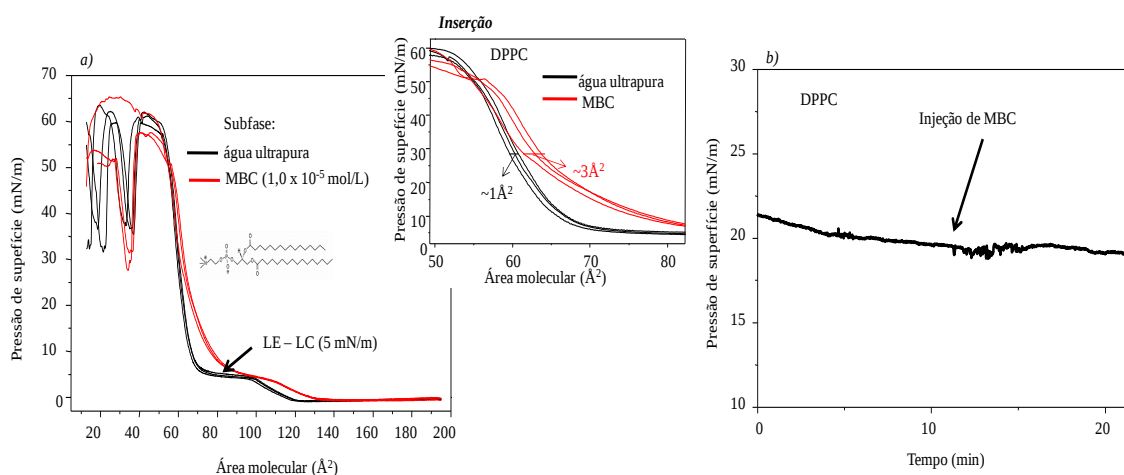
A partir da **Figura 9a** observa-se que as isothermas π -A de DDAB mesmo com água ultrapura na subfase e com as barreiras abertas (fase gasosa) já apresentam uma pressão de superfície em torno de 5 mN/m. Dynarowic *et al.* (Dynarowic et al. 1998) reportam este comportamento para o DDAB e atribuem a alta repulsão eletrostática

entre as moléculas, como causa deste comportamento. Quando a subfase contém MBC, as isotermas π -A deslocaram-se para menores áreas (**Figura 9b**). Isto indica que, provavelmente, o DDAB está difundindo para a subfase na presença de MBC. Levando em consideração que a única diferença entre o DDAB e o DODAB é o tamanho da cadeia alquílica (o DDAB possui 12 carbonos e o DODAB 18) pode-se inferir que o DDAB interage com o MBC da mesma forma como interagiu com o DODAB. Porém, como o DDAB possui uma cadeia hidrofóbica menor e consequentemente menor capacidade de flotar, ao interagir o MBC pode arrastá-lo para a subfase.

3.1.3. DPPC

Os estudos prosseguiram com o fosfolípido zwitteriônico DPPC possuindo carga líquida neutra na região hidrofílica. A **Figura 10a** mostra as triplicatas das isotermas π -A de DPPC com subfases de água ultrapura e MBC ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L), além de um zoom (inserção da **Figura 10a**) na região entre 50 e 80 $\text{\AA}^2$.

Figura 10: a) triplicatas das isotermas π -A de DPPC com água ultrapura e MBC ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L na subfase). b) Dinâmica de penetração do MBC na monocamada de DPPC.



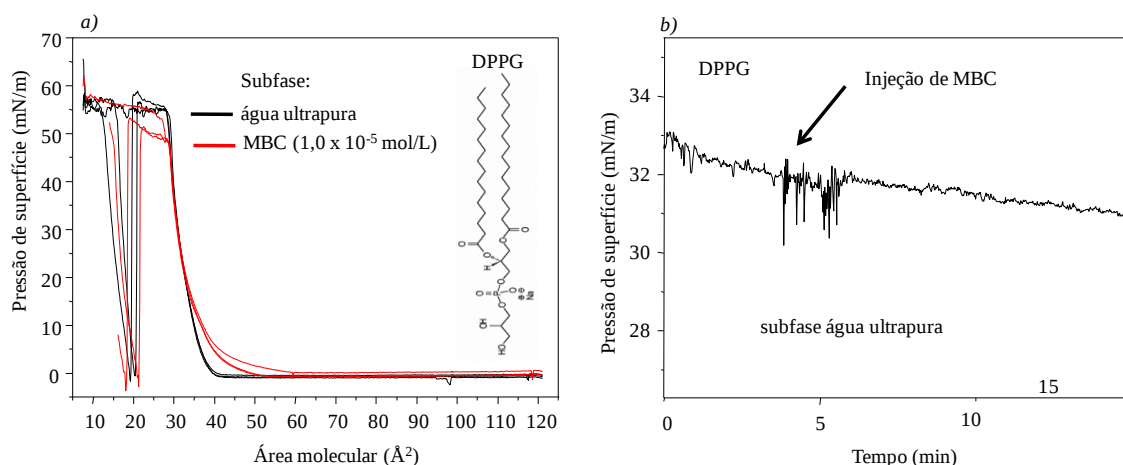
As isotermas π -A de DPPC com água ultrapura na subfase apresentam um patamar em 5 mN/m referente à transição LE-LC. A pressão de colapso ocorre em torno de 50 mN/m com uma área molecular média em torno de 67 Å. Estes resultados são consistentes com os reportados por Costalonga *et al.* (Costalonga et al. 2012), entre outros. De modo geral, a presença de MBC na subfase causou pequenas alterações nas isotermas π -A de DPPC deslocando-as para maior área molecular, além da alteração no valor da pressão de colapso que passou de 60 para 54 mN/m na presença de MBC, indicando menor resistência mecânica da monocamada.

O deslocamento observado foi mais evidente a baixas pressões superficiais (~ 15 mN/m), sendo que à medida que a pressão aumenta as isotermas π -A de DPPC na presença de MBC tendem a sobrepor as isotermas π -A com água ultrapura. Este último efeito é mais bem visto na inserção da **Figura 10a** que mostra a dispersão das isotermas π -A. Fixando a pressão em 30 mN/m e analisando a coordenada correspondente no eixo da abscissa, a maior diferença entre as isotermas π -A é de aproximadamente 1 Å² com água ultrapura e 3 Å² com MBC na subfase. Ainda, há uma sobreposição de uma isoterma π -A com MBC na subfase com a de água ultrapura (inserção da **Figura 10a**) em pressões superiores a 30 mN/m. Estes resultados indicam que o MBC interage fracamente com o DPPC, pois quando a pressão de superfície aumenta a monocamada expulsa o MBC. Este último resultado foi confirmado através da dinâmica de penetração do MBC na monocamada de DPPC, conforme mostrado na **Figura 10b**. Uma vez formada a monocamada, a pressão lateral impede que o MBC interaja com o DPPC penetrando na monocamada. Assim, podemos concluir que a interação entre MBC e DPPC é relativamente mais fraca que aquela observada para o DODAB, por exemplo.

3.1.4. DPPG

Por fim, foi estudado o DPPG que possui carga líquida negativa. A **Figura 11a** mostra as triplicatas das isotermas π -A de DPPG com água ultrapura e MBC na subfase.

Figura 11: a) triplicatas das isotermas π -A de DPPG com água ultrapura e MBC ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) na subfase. b) Dinâmica de penetração do MBC na monocamada de DPPC.



As isotermas π -A com água ultrapura na subfase é típica de DPPG, com a subida em torno de $40\text{\AA}^2$. A presença de MBC na subfase causa pouca mudança na isoterma π -A. Apenas a baixas pressões ($< 20\text{mN/m}$) há um pequeno deslocamento das isoterma π -A para maior área molecular. Assim que a pressão de superfície aumenta, ambas as isotermas (com a subfase de água ultrapura e com MBC) se sobrepõem. Este resultado evidencia uma interação entre MBC e o DPPG é ainda mais fraca que entre MBC e DPPC. De fato, a dinâmica de penetração do MBC na monocamada de DPPG (**Figura 11b**) confirma que praticamente não há interação entre o MBC e DPPG após a formação da monocamada.

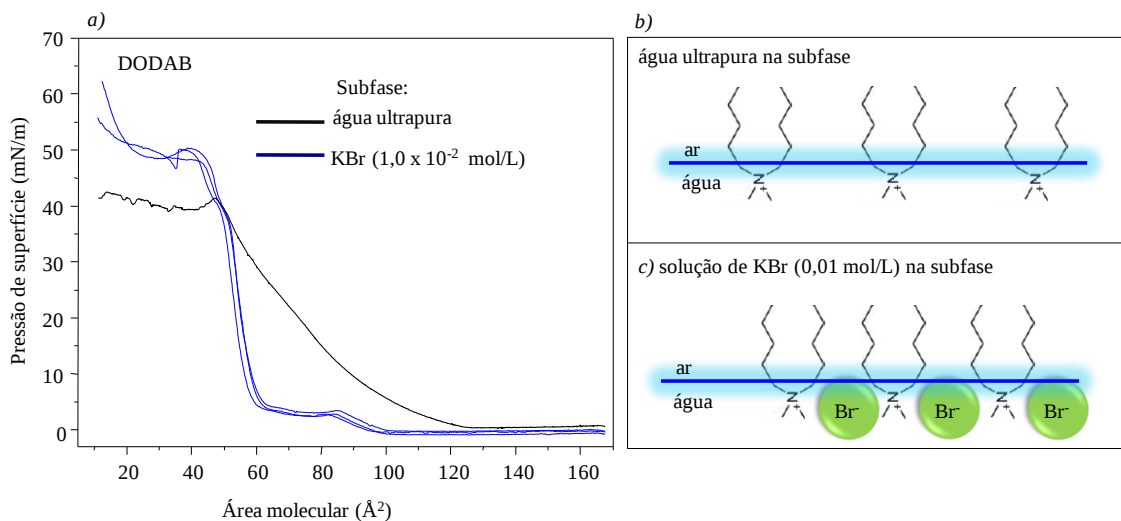
Assim, após a sequência de experimentos com os lipídios e fosfolipídios com diferentes cargas líquidas na região hidrofílica, os resultados sugerem que a interação entre o MBC e os lipídios/fosfolipídios tem forte caráter eletrostático. Desse modo,

interage fortemente com DODAB e DDAB que são catiônicos, moderadamente com o DPPC que é zwitteriônico e fracamente com o DPPG que é aniônico.

3.1.5. Solvatação do DODAB

A hipótese da interação eletrostática foi testada através de filmes de Langmuir de DODAB em que a subfase continha uma solução salina. Neste caso, os íons de sal podem solvatar a região hidrofílica blindando a atração eletrostática entre o DODAB e o MBC. A **Figura 12a** mostra as triplicatas das isotermas π -A de DODAB com uma solução salina (KBr – $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) na subfase e com água ultrapura como referência.

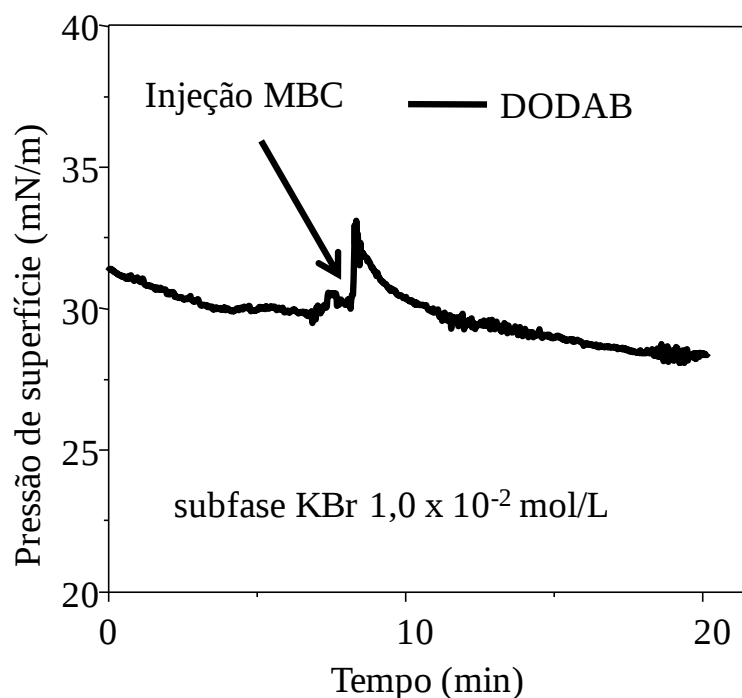
Figura 12: a) triplicata das isotermas π -A de DODAB com água ultrapura e solução de KBr ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) na subfase. b) e c) Ilustração do perfil da monocamada formada em diferentes subfases. Nesta ilustração os íons de bromo estão fora de escala.



As mudanças no perfil da isoterma π -A de DODAB com KBr na subfase são nítidas. As isotermas π -A com subfase de KBr iniciam subida em 100 Å^2 , ao passo que com água ultrapura inicia em 120 Å^2 . Ainda, há um patamar bem definido entre 60 e 85 Å^2 e uma subida súbita da pressão até o colapso do filme. Além disso, a área

molecular média extrapolada na região da fase condensada é de 60 mN/m, sendo um valor menor que a área ocupada pelo DODAB em água ultrapura. Estes resultados indicam que o DODAB está mais densamente empacotado na presença de KBr. Quando a subfase é de água ultrapura, a alta repulsão eletrostática da região hidrofílica, associada ao fato da cadeia alquílica não estar exatamente perpendicular à superfície (Dynarowicz et al. 1998), repele as moléculas, conforme discutido anteriormente. Porém, na presença de KBr o ânion Br^- solvata a região hidrofílica, diminuindo a repulsão eletrostática, permitindo que as moléculas se aproximem uma das outras, e consequentemente diminuindo a área molecular média. Estes resultados são ilustrados nas **Figuras 17b e c**. O perfil da isoterma π -A de DODAB com KBr na subfase é semelhante à isoterma π -A de DPPC em água ultrapura (**Figura 10a**). Isto sugere que, neste caso, o DODAB possui característica semelhante ao DPPC, e uma hipótese possível é que a região hidrofílica do DODAB possua densidade de carga líquida neutra, daí a semelhança entre as isotermas π -A. Assim como o DPPC espera-se que o MBC interaja moderadamente com o DODAB. A **Figura 13** mostra a dinâmica de penetração do MBC na monocamada de DODAB com a subfase contendo KBr ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L).

Figura 13: dinâmica de penetração do MBC na monocamada de DODAB com KBr ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) na subfase.

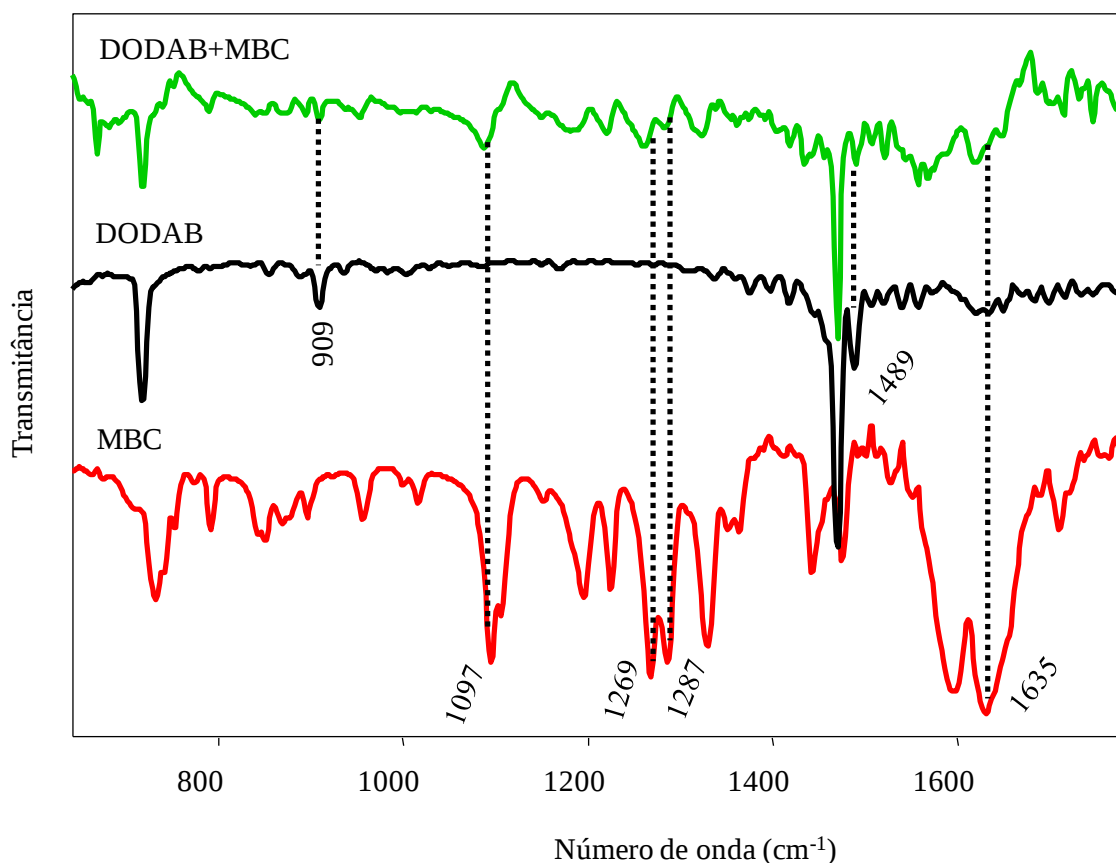


A dinâmica de penetração mostra que a injeção de MBC provocou uma perturbação na monocamada, ocasionando a elevação da pressão de superfície. Contudo, com o decorrer do tempo, o sistema entra em equilíbrio e a pressão estabiliza caindo assintoticamente até um valor um pouco abaixo do valor inicial e estabiliza novamente. Mesmo o elevado grau de empacotamento das moléculas de DODAB, não impediu a interação com o MBC. Contudo a interação não foi forte o suficiente para mantê-lo na interface, confirmando a origem eletrostática da interação.

A fim de determinar quais grupos são responsáveis pela interação entre o DODAB e o MBC foi realizado um estudo de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared*). A **Figura 14** mostra os espectros de FTIR dos filmes *casting* de MBC e de DODAB utilizados como referência dos materiais, além do espectro da mistura de

DODAB+MBC. Os filmes *casting* de DODAB e da mistura DODAB+MBC foram preparados em água ultrapura e o filme de MBC foi preparado em etanol para aumentar a solubilidade do MBC.

Figura 14: espectros FTIR dos filmes *casting* de DODAB, MBC e da mistura de DODAB+MBC.



A atribuição das principais bandas do DODAB são apresentadas na Tabela III. Já o espectro de MBC apresenta várias bandas, podendo destacar a localizada em 1635 cm^{-1} atribuída ao estiramento C=N, a banda em 1097 cm^{-1} atribuída à deformação angular NH_{AM} e CH_{Bz} e ao par de bandas em 1269 e 1289 cm^{-1} atribuídas à deformação angular do NH_{AM} (nitrogênio amídico) e NH_{IZ} (nitrogênio imidazólico) respectivamente (Negi et al. 2014).

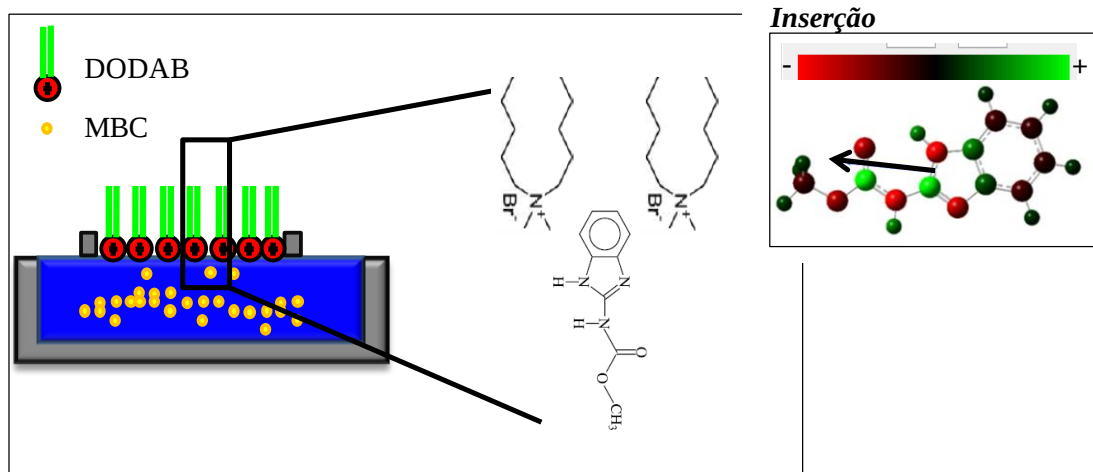
Tabela II- atribuição experimental das bandas de FTIR para o DODAB

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuição
718	CH ₂	Deformação angular ^a
909	C-N	Estiramento ^a
1470	CH ₂	Deformação angular ^a
1489	CH ₃ -N ⁺	Deformação angular ^b

Analisando a **Figura 14** observa-se que a banda em 909 cm⁻¹ referente ao estiramento C-N da cabeça hidrofílica (CH₃)₂N⁺ do DODAB está presente apenas no filme *casting* do DODAB. Nos filmes *casting* da mistura DODAB+MBC esta banda desaparece. Também foi observada diminuição da intensidade relativa da banda em 1489 cm⁻¹, referente à deformação angular (CH₃)₂N⁺, no espectro da mistura DODAB+MBC. Ainda, a banda em destaque no filme *casting* de MBC (1619 cm⁻¹, atribuída ao estiramento do C=N) sofreu um deslocamento para menores comprimentos de onda no espectro da mistura. Além disso, a banda em 1097 cm⁻¹ (deformação angular NH_{AM} e CH_{Bz}) presente no espectro da mistura tornou-se menos definida em relação ao espectro do filme *casting* de MBC. Estas mudanças observadas evidenciam que o DODAB interage através da região hidrofílica (CH₃)₂N⁺ e o MBC através do grupo benzimidazólico.

O momento de dipolo resultante do MBC calculado teoricamente utilizando a teoria do funcional da densidade (DFT, do inglês *density functional theory*) através do pacote Gaussian 09 está representado pela seta preta na *inserção* da **Figura 15**. De fato, o grupo benzimidazólico do MBC possui uma densidade de carga negativa e a região alifática possui densidade de carga positiva, criando o dipolo na molécula. Assim, baseado nos resultados dos filmes de Langmuir, FTIR e o cálculo do momento de dipolo do MBC, o modelo proposto de interação entre o DODAB e o MBC é ilustrado na **Figura 15**.

Figura 15: ilustração do mecanismo de interação entre a monocamada de DODAB e MBC. *Inserção:* momento de dipolo resultante da molécula de MBC calculado teoricamente utilizando a teoria do funcional da densidade DFT, através do Gaussian 09).



3.2. Aplicação sensorial

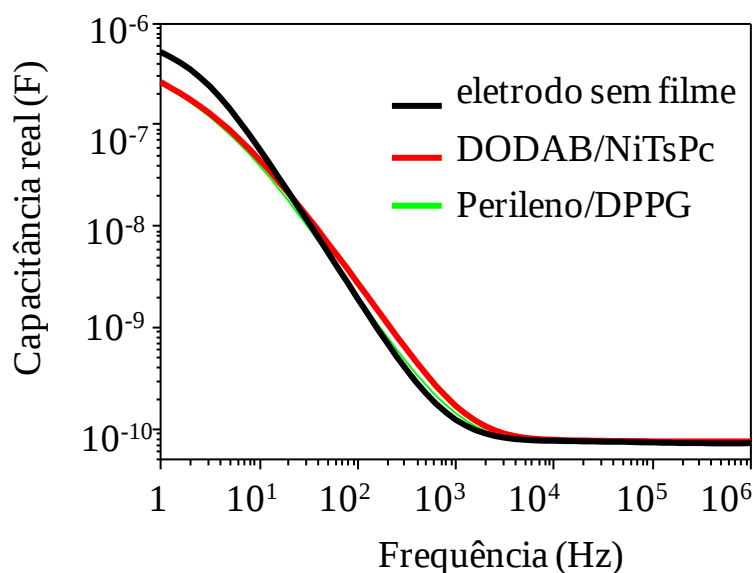
Buscando verificar o desempenho do DODAB como elemento transdutor de sinal em unidades sensoriais, uma língua eletrônica foi montada a partir da deposição de filmes LbL sobre eletrodos interdigitados formando unidades sensoriais para a discriminação de soluções contendo MBC, seguindo a metodologia introduzida pioneiramente por Riul *et al.* (Riul, Jr. *et al.*, 2002). A língua eletrônica usada foi composta por três unidades sensoriais com dois tipos de filmes LbL: DODAB/NiTsPc e perileno/DPPG, todos com cinco bicamadas, além de um eletrodo sem filme, usado para melhor avaliar o desempenho de cada filme. Estas unidades foram empregadas na discriminação de soluções de MBC nas concentrações $1,0 \times 10^{-10}$, $1,0 \times 10^{-9}$, $1,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L, além da água ultrapura inicial e final. As medidas foram realizadas via espectroscopia de impedância sendo mensurada a capacitância real vs.frequência da tensão de entrada.

Vale ressaltar que antes da deposição dos filmes LbL de DODAB/NiTsPc e perileno/DPPG, os eletrodos interdigitados foram recobertos com uma bicamada de PAH/PSS. Nosso grupo de pesquisa mostrou que filmes LbL de DODAB/NiTsPc perdem quase 50% de material durante a primeira imersão em água (Furini *et al*, 2013). Este problema pôde ser contornado com a deposição prévia de um filme LbL de PAH/PSS. O PAH e o PSS são polieletrólitos catiônico e aniônico, respectivamente, que quando depositados previamente, diminuem os efeitos do substrato e ajudam na fixação do posterior filme. Desse modo, foram fabricadas três unidades sensoriais compostas de: 1) uma bicamada de PAH/PSS e 5 bicamadas de DODAB/NiTsPc (neste caso, após as 5 bicamadas foi depositada uma camada a mais de DODAB); 2) uma bicamada de PAH/PSS e 5 bicamadas de perileno/DPPG; 3) eletrodo sem filme.

Antes de iniciar os experimentos de impedância foi realizado um teste para verificar quais dentre os eletrodos selecionados possuem resposta elétrica semelhantes. O teste consistiu de um lote de 10 eletrodos interdigitados de ouro imersos em água ultrapura para os quais foram obtidas curvas de capacitância real vs. frequência. Os três eletrodos cujas curvas de capacitância foram as mais semelhantes entre si foram escolhidos para a deposição dos filmes LbL e então compor a língua eletrônica. A similaridade entre as curvas garante a reprodutibilidade dos eletrodos sem filme em termos da sua geometria e resposta elétrica. Isto assegura que qualquer diferença na resposta elétrica de cada unidade sensorial deva-se ao filme e não a uma possível diferença gerada na fabricação dos eletrodos interdigitados. A **Figura 16** mostra as curvas da capacitância real vs. frequência de todas as unidades sensoriais (eletrodo + filme LbL) imersas na água ultrapura inicial (antes dos experimentos sensoriais). Observa-se que, após a deposição do filme LbL, há ligeira mudança nas curvas de capacitância, sendo atribuída exclusivamente à presença do filme LbL. Ainda, de acordo

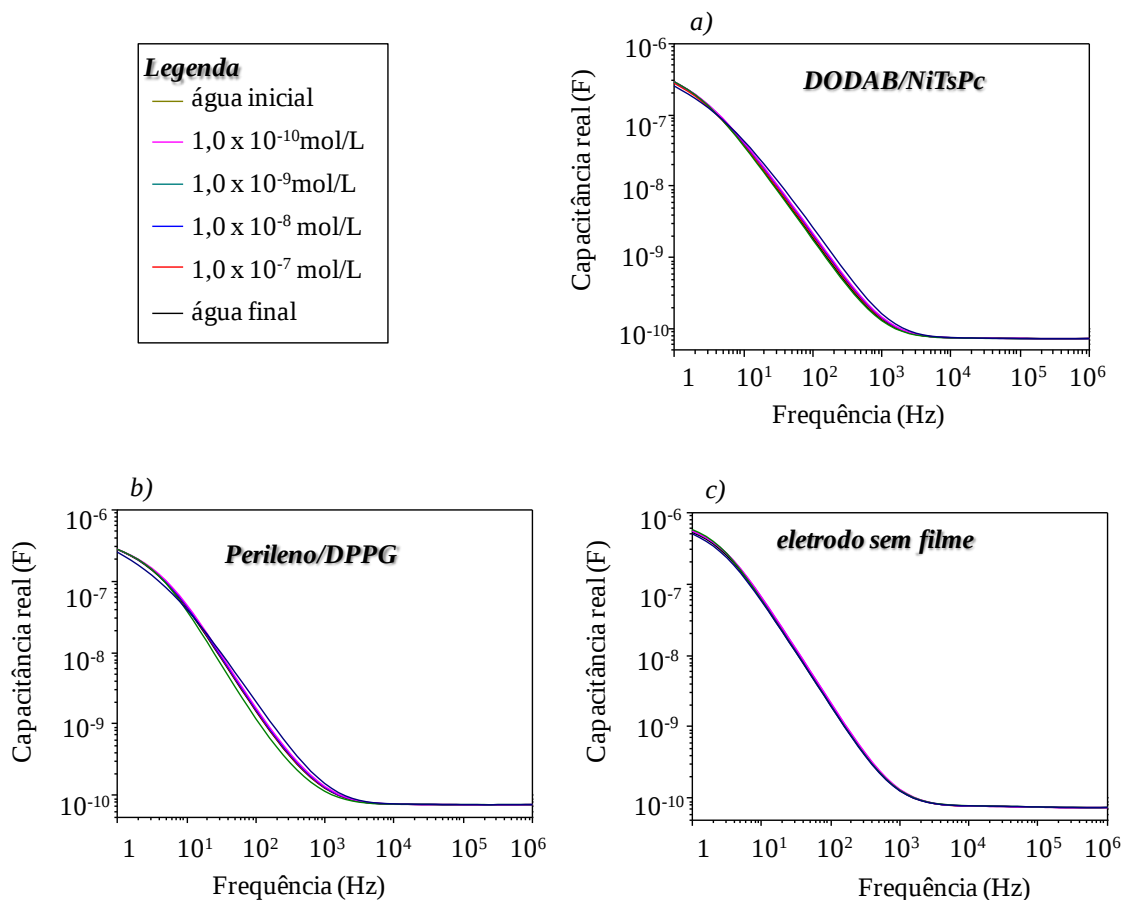
com a **Figura 16** não é possível diferenciar a curva da unidade sensorial recoberta com o filme LbL de DODAB/NiTsPc da curva do perileno/DPPG.

Figura 16: curvas de capacitância real vs. frequência para unidades sensoriais (eletrodos interdigitados de ouro cobertos com filme LbL) imersos em água ultrapura (antes dos experimentos sensoriais).



A **Figura 17** mostra curvas típicas da capacitância real vs. frequência para as unidades sensoriais imersas nas águas inicial e final, além das soluções aquosas de MBC ($1,0 \times 10^{-10}$, $1,0 \times 10^{-9}$, $1,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L). Como tendência geral, nota-se a superposição das curvas de capacitância para todas as concentrações de MBC. Portanto, análises computacionais foram aplicadas não apenas para melhorar o tratamento dos dados obtidos via língua eletrônica quanto a distinção de soluções aquosas de MBC em diferentes concentrações, mas também para fornecer informação a respeito de cada unidade sensorial.

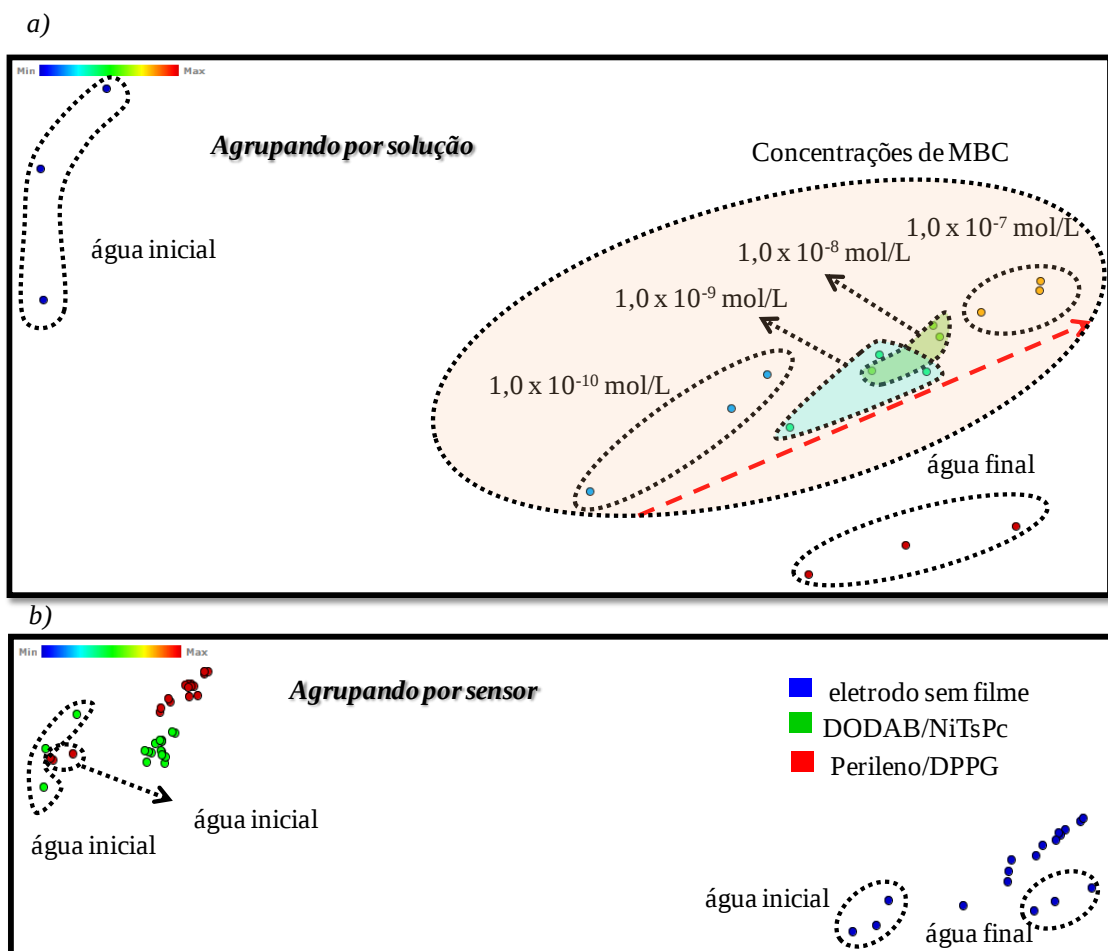
Figura 17: curvas de capacitância vs. frequência para filmes LbL com 5 bicamadas de de a) DODAB/NiTsPc, b) perileno/DPPG e c) eletrodo sem filme, imersos em $1,0 \times 10^{-10}$, $1,0 \times 10^{-9}$, $1,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L de solução aquosa de MBC, como também nas águas inicial e final.



A **Figura 18a** mostra as projeções IDMAP realizadas com os dados de capacitância real de todas as unidades sensoriais, combinadas em uma única projeção. Neste caso, é levada em consideração a contribuição de todas as unidades para discriminar as diferentes concentrações de MBC. Cada ponto na projeção é referente à contribuição de todas as unidades sensoriais (uma curva de capacitância vs. frequência de cada sensor) e o *cluster* é formado por três repetições de cada medida para cada concentração. *Cluster* mais compacto significa medidas mais semelhantes. A primeira função de um sensor é discriminar soluções e esse resultado é representado por um grande *cluster* agrupando todas as concentrações de MBC (**Figura 18a**). Os resultados

também mostram que a língua eletrônica foi capaz de distinguir as diferentes concentrações de MBC ($1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L), além das águas inicial e final, havendo apenas certa sobreposição dos *clusters* das concentrações $1,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-9}$. Ainda, observa-se que há um padrão na distinção das soluções, sendo da solução menos concentrada para a mais concentrada, como destacado na **Figura 18a**. Também é possível notar que a dispersão das medidas diminui à medida que aumenta a concentração, ou seja, os *clusters* ficam mais compactos. Uma característica interessante na projeção é a distância entre as medidas da água inicial e final, indicando que as unidades sensoriais são afetadas pelas medidas. Portanto está claro que a adição de pequenas alíquotas de solução de MBC, para aumentar a concentração, leva a mudanças nas respostas elétricas e que estas mudanças são irreversíveis.

Figura 18: projeção IDMAP dos dados da capacitância real obtidos de a) todas as unidades sensoriais combinadas em uma única projeção para discriminar as concentrações das soluções. b) Dados das unidades sensoriais separadamente projetadas em um único gráfico.

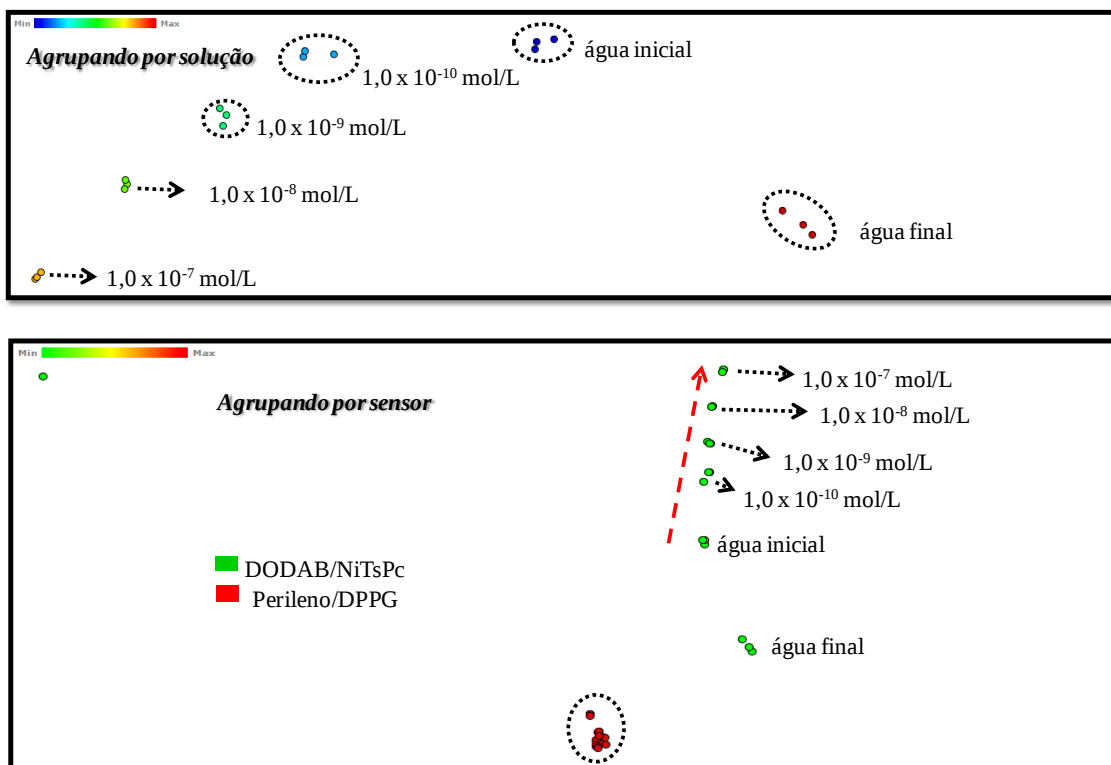


A **Figura 18b** mostra a projeção dos dados das unidades sensoriais separadamente, porém em um único gráfico. Nesta configuração, pode-se analisar a contribuição independente de cada unidade sensorial na habilidade de discriminar as diferentes soluções. As cores dos pontos representam as unidades sensoriais enquanto que as soluções são mostradas próximas dos círculos. Nesta análise, observa-se dois conjuntos de pontos, sendo um pertencente às unidades sensoriais com filme LbL (DODAB/NiTsPc ou perileno/DPPG) e outro sem filme. Não é possível discriminar diferentes concentrações de MBC para as unidades analisadas individualmente. Apenas

as águas podem ser distinguíveis pelas unidades sensoriais analisadas separadamente. Estes resultados indicam que as unidades sensoriais não são sensíveis o suficiente quando atuam individualmente. O desempenho das unidades analisadas individualmente foi muito ruim já que sistemas mais simples são capazes de distinguir diferentes concentrações de atrazina (Rubira et al. 2014).

A fim de tentar melhorar a resposta das unidades sensoriais foi utilizado um eletrodo interdigitado cujo dígito tem 10 μm de largura (eletrodo 10) ao invés dos 40 μm dos eletrodos anteriores (eletrodo 40). Esta característica pode melhorar a sensibilidade da unidade sensorial e com isso o desempenho. A **Figura 19a** apresenta contribuição das duas unidades sensoriais para discriminar as diferentes concentrações de MBC enquanto a **Figura 19b** mostra o desempenho individual das unidades sensoriais recobertas com filme LbL de DODAB/NiTsPc e perileno/DPPG através da projeção IDMAP.

Figura 19: projeção IDMAP dos dados da capacitância real obtidos de a) todas as unidades sensoriais combinadas em uma única projeção para discriminar a concentrações das soluções. b) Projeção dos dados das unidades sensoriais separadamente projetadas em um único gráfico.



Observa-se que, quando analisadas em conjunto, ambas as unidades sensoriais são capazes de discriminar as concentrações de MBC (**Figura 19a**). Porém, quando analisadas separadamente, a unidade sensorial recoberta com filme LbL de DODAB/NiTsPc passa a discriminar as diferentes concentrações de MBC enquanto a unidade sensorial recoberta com filme LbL de perileno/DPPG permanece incapaz (**Figura 19b**). Ainda para o filme DODAB/NiTsPc, pode-se destacar que há um padrão na resposta, indo da mais baixa para a mais alta concentração de MBC. A estabilidade do sistema é mostrada pela sobreposição das três repetições de cada medida e novamente aqui as águas inicial e final permanecem separadas, mostrando o caráter irreversível da medida. Este fenômeno aparece em outros trabalhos como (Rubira et al.

2014) (Aoki et al. 2012) em que a adsorção do analito parece ser um processo irreversível ou ainda o próprio processo de aplicação de um potencial no filme pode levar a mudanças irreversíveis. A arquitetura das unidades permitiu que a última camada da unidade sensorial recoberta com filme LbL de DODAB/NiTsPc fosse de DODAB e da unidade perileno/DPPG fosse o DPPG. Assim, podemos relacionar o baixo desempenho da unidade sensorial recoberta com o filme de perileno/DPPG à baixa interação entre DPPG e MBC, conforme mostrado através das isotermas π -A (**Figura 11**). E, do mesmo modo, o bom desempenho da unidade composta pelo filme de DODAB/NiTsPc pela interação DODAB e MBC, mostrada através dos filmes de Langmuir. Esse resultado evidencia a importância da interação entre sensor e analito para o reconhecimento deste último e abre caminho para uma seletividade do sensor, algo não comum à língua eletrônica.

Capítulo 4

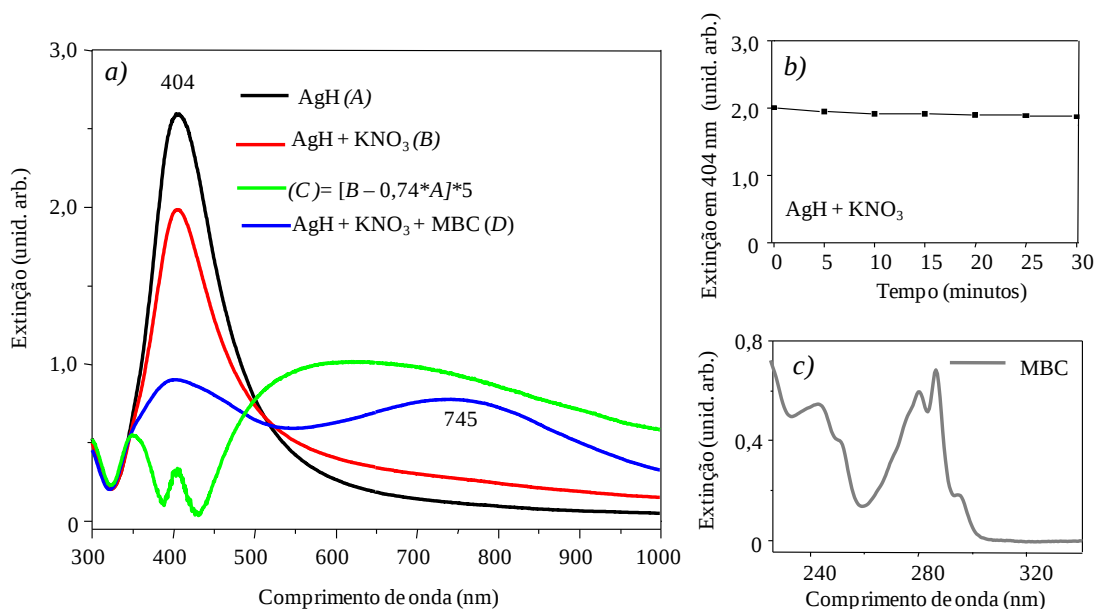
4.1. Otimização da escolha das nanopartículas

A fim de buscar as melhores condições para obter espectros SERS de MBC foram utilizadas as seguintes nanopartículas: esféricas de prata reduzidas por hidroxilamina (AgH) ou por citrato (AgCT), esféricas de ouro reduzidas por citrato (AuCT), nanoestrelas (AgE) e nanoprismas triangulares (AgT).

4.1.1.UV-Vis

Previamente foi realizado um estudo, via absorção no UV-Vis, para analisar o espectro de absorção de cada colóide. Na **Figura 20a** são mostrados os espectros de extinção das AgH com e sem a adição de MBC.

Figura 20: a) espectros de extinção das AgH (curva preta), AgH com adição de nitrato de potássio (curva vermelha), formação de agregados das AgH (curva verde, diferença entre a curva negra e vermelha) e a influência do MBC na agregação das AgH (curva azul). b) Estabilidade das AgH após adição de nitrato de potássio. c) Espectro de absorção UV-Vis de MBC em solução de etanol. Na curva verde (C) foi utilizado o fator 0,74 para evitar valores negativos.



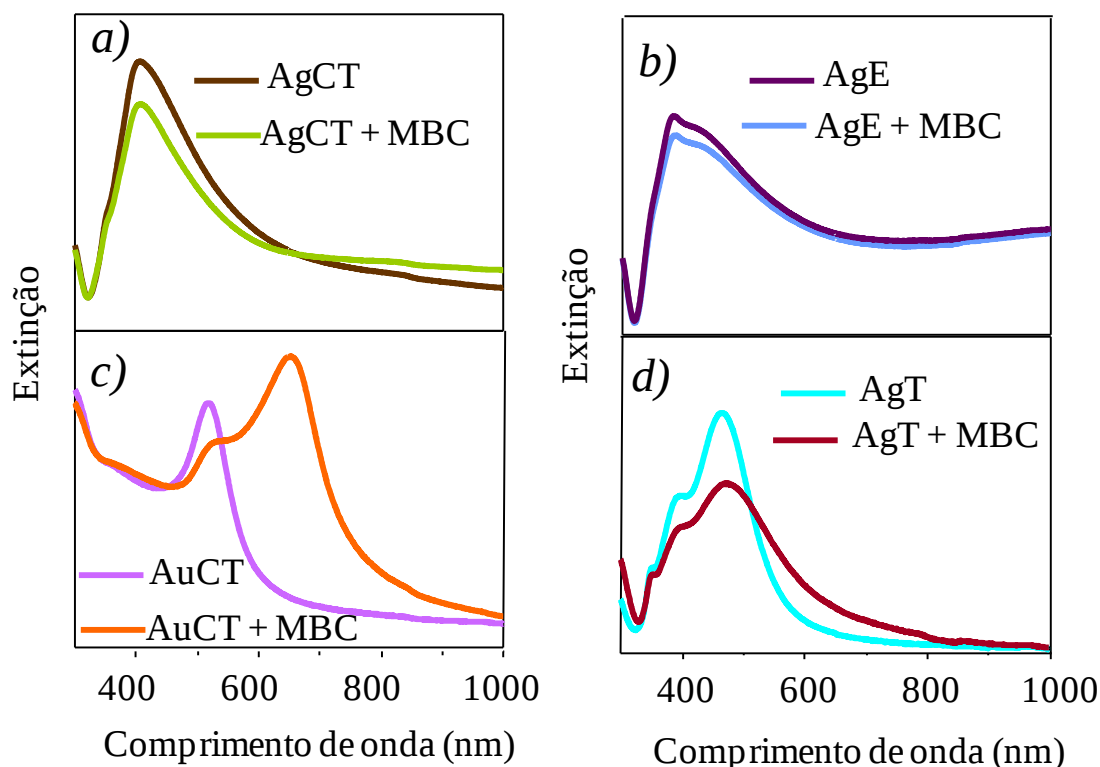
Os espectros de extinção das AgH não-agregadas (A) e agregadas (B) (com adição de nitrato de potássio) são mostrados na **Figure 20a**. O espectro de absorção das AgH apresenta um máximo de absorção em 404 nm. A adição de nitrato de potássio causa uma mudança no perfil do plasmon como redução de 23% na absorbância do máximo e um leve aumento da absorbância na cauda a partir de 520 nm. A diferença dos espectros ((C)-**Figura20a**) revela existência de uma banda larga em maiores comprimentos de onda indicando a formação de agregados de nanopartículas com diversos tamanhos devidos à presença de sal (nitrato de potássio). Contudo, o MBC induz a uma agregação mais intensa das nanopartículas com uma forte diminuição da absorção em 404 nm e o surgimento de uma nova banda em torno de 745 nm, como mostrado em (D) na **Figura 20a**. Além disso, este último máximo indica uma interação específica entre as AgH e oMBC. Em pH 6, o MBC está na forma neutra enquanto o potencial zeta (ζ) da AgH é -60 mV(Alvarez-Puebla *et al.*, 2005). O baixo potencial ζ

explica porque as AgH são facilmente agregadas por nitrato de potássio e MBC. Em outras palavras, as nanopartículas são consideradas estáveis (sem que ocorra agregação) quando o potencial ζ está entre -30 e +30 mV. Quando as nanopartículas estão estáveis (p. ex. potencial ζ mais negativo que -30 mV) favorece a aproximação de íons com carga oposta tornando o potencial ζ das nanopartículas mais positivo e consequentemente favorecendo a agregação. A nova banda em 745 nm e o pequeno aumento na absorbância na cauda do plasmon em 520 nm são reportados por Roldán *et al.* (Lorena Roldan *et al.*, 2012) e atribuídos à formação de agregados de nanopartículas.

Em termos de estabilidade, a **Figura 20b** mostra a absorção em 404 nm das AgH agregadas em função do tempo para os primeiros 30 minutos. O coloide permanece estável por pelo menos 1 hora após ser agregado com nitrato de potássio, que é suficiente para fazer as medidas SERS. O espectro de MBC em etanol (**Figura 20c**) revela bandas de absorção somente em menores comprimentos de onda, o mesmo que em água. As principais bandas têm os máximos em 243, 280 e 286 nm, além de dois ombros em 251 e 295 nm. Estas bandas são características do grupo benzimidazol (Steck *et al.*, 1948) e são similares às reportadas na literatura (Koner *et al.*, 2011).

Os espectros de absorção das AgCT, AuCT, AgE e AgT são mostrados nas **Figuras 21a, b), c) e d)**.

Figura 21: espectros de extinção dos colóides a) AgCT, b) AgE, c) AuCT e d) AgT com e sem a adição de MBC ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L). AgCT (nanopartículas de prata reduzidas por citrato), AuCT (nanopartículas de ouro reduzidas por citrato), AgE (nanoestrelas de prata), AgT (nanoprismas triangulares de prata).



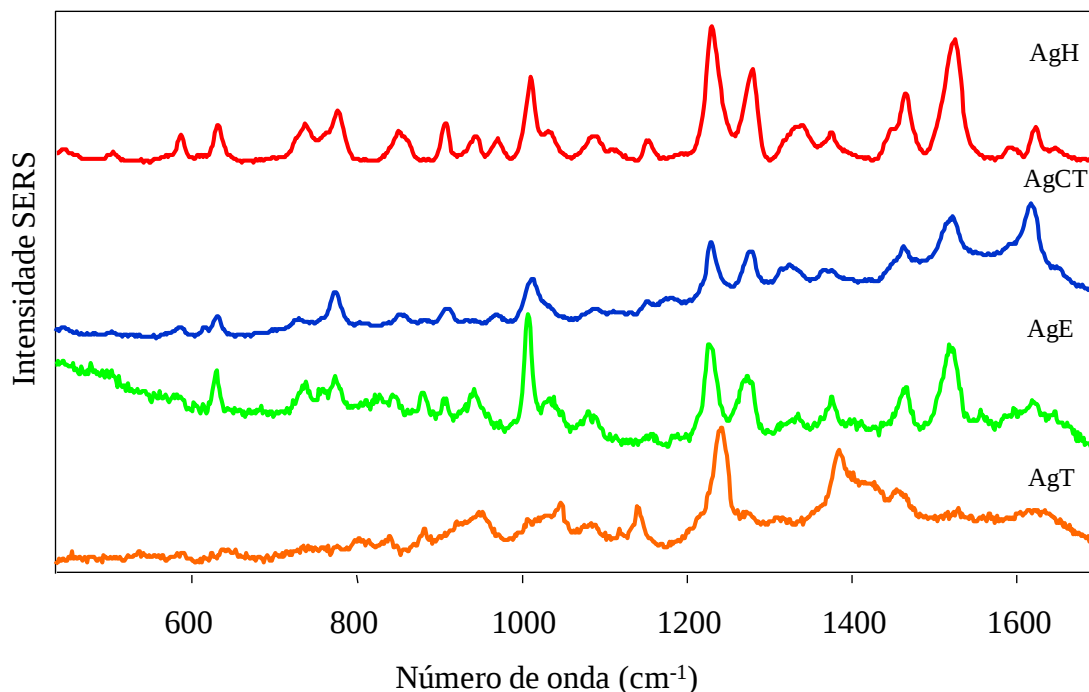
No caso das AgCT o máximo da banda está centrada em 412 nm e para as AuCT o máximo está centrado em 514 nm. As AgE (**Figura 21b**) apresentam um máximo em 381 nm com absorção para maiores comprimentos de onda. Este fenômeno está relacionado à absorção e ao espalhamento da luz causados por diversas formas de AgE presentes no colóide (Garcia-Leis *et al.*, 2013). As AgT (**Figura 21d**) apresentam três máximos: 349, 393 e 464 nm devido à diferentes tipos de ressonâncias do plasmon localizados em superfície (Izquierdo-Lorenzo *et al.*, 2012).

Em geral, a adição de MBC nos coloides AgCT, AgE e AgT causa apenas pequena diminuição no valor da absorbância máxima, não alterando significativamente o perfil das curvas. Esse resultado indica que o MBC interage pouco com estas nanopartículas, provavelmente não sendo efetivamente adsorvido na superfície metálica. Apenas para as AuCT é observado uma nova banda em maiores comprimentos de onda centrada em 640 nm.

4.1.2. Espectros SERS de MBC utilizando diferentes nanopartículas

A fim de avaliar o efeito das diferentes nanopartículas no sinal SERS do MBC foram coletados espectros SERS de MBC utilizando diferentes nanopartículas (AgH, AgCT, AuCT, AgE e AgT) como substratos. Devido aos resultados obtidos nos espectros de extinção das suspensões coloides foram testadas diferentes linhas laser (532, 633 e 785 nm). No caso das AgH, AgCT, AgE e AgT as bandas SERS de MBC mais intensas foram obtidas com o laser de 532 nm. No caso das AuCT, apesar do espectro de absorção mostrar interação entre as nanopartículas e o MBC, não foi possível coletar espectro SERS de MBC com nenhuma linha laser. Provavelmente, a forte interação entre AuCT e MBC provoque a rápida agregação e decantação das nanopartículas impedindo a obtenção de espectros SERS com estas nanopartículas. A **Figura 22** mostra os espectros SERS de MBC utilizando AgH, AgCT, AgE e AgT obtidos com linha laser em 532 nm. Os espectros foram obtidos a uma concentração fixa de MBC $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L (mais alta concentração que pode ser diluída) e colóides a pH ~6 (o MBC neste pH está na forma neutra). Os espectros Raman das nanopartículas sem a presença de MBC são mostrados no **Anexo**.

Figura 22: espectros SERS de MBC ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) a pH 6,0 em diferentes nanopartículas a) AgH, b) AgCT, c) AgE e d) AgT. Laser de excitação em 532 nm.

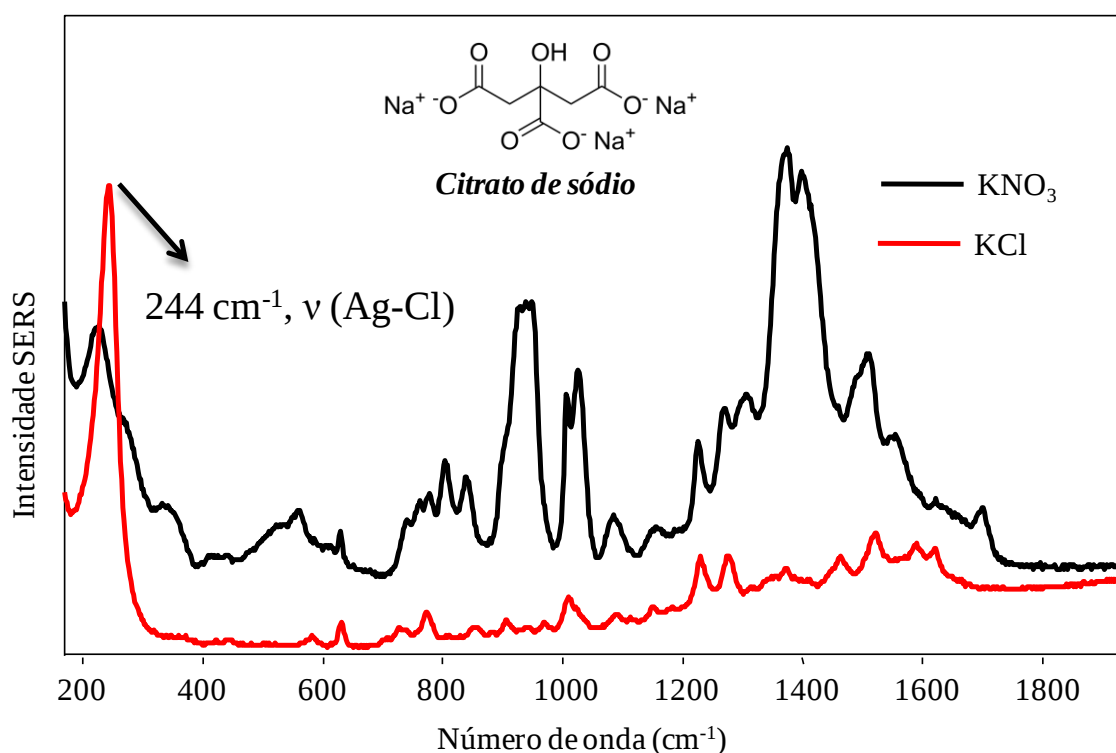


Com exceção das AuCT, todas as nanopartículas apresentam sinal SERS de MBC na concentração estudada ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L). Como pode ser visto na **Figura 22** a relação sinal/ruído e a presença de algumas bandas dependem fortemente da nanopartícula empregada. As bandas em 1017, 1268 e 1473 cm⁻¹ estão presentes em todos os espectros SERS, exceto quando utilizado AgT. Também a amplificação da banda em 1224 cm⁻¹ depende da nanopartícula. De fato, o sinal SERS depende, entre outros fatores, que a molécula em estudo se aproxime da superfície metálica para aproveitar a amplificação do campo eletromagnético produzido pelas nanopartículas. Este fenômeno depende de fatores como: i) solubilização da molécula; ii) difusão até a superfície metálica; e iii) afinidade pela superfície para adsorção. Este último fator implica remover ou interagir com espécies químicas previamente presentes (Izquierdo-Lorenzo *et al.*, 2012). Uma vez que cada tipo de nanopartícula possui uma superfície

química distinta devido à rota de síntese, o MBC interage diferentemente com as nanopartículas gerando espectros SERS distintos. O mesmo fenômeno é observado por Izquierdo-Lorenzo *et al.* (Izquierdo-Lorenzo *et al.*, 2012) trabalhando com R-aminoglutetimida.

Outra forma de analisar a influência da superfície química no sinal SERS de MBC é com a adição de diferentes sais como agentes agregantes. A **Figura 23** mostra o espectro SERS de MBC ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) utilizando como substrato AgCT com a adição de dois sais agregantes: KCl ou KNO_3 . Neste estudo foi escolhida a AgCT porque já há íons de citrato previamente adsorvidos na superfície e estes íons podem ser deslocados da superfície da nanopartícula favorecendo ou não a aproximação do MBC.

Figura 23: espectros SERS de MBC utilizando AgCT previamente agregadas com KNO_3 ou KCl a pH 6.



Ao utilizar nitrato de potássio como agente agregante no sistema (AgCT+ KNO_3 +MBC) em pH 6 há predominância das bandas em 950, 1024, 1085 e

1396 cm^{-1} atribuídas ao citrato (Munro *et al.*, 1995). Apenas as bandas em 1225, 1269, 1513 cm^{-1} são atribuídas ao MBC (a atribuição completa será feita na próxima seção). Assim, são observados sinais SERS do MBC e da camada de citrato. Ao mudar o agente agregante para cloreto de potássio as bandas localizadas em 775, 907, 1011, 1231, 1277 e 1524 cm^{-1} atribuídas ao MBC passam a predominar no espectro. Além disso, surge um pico intenso e definido em 244 cm^{-1} atribuído ao $\nu(\text{Ag-Cl})$ (Leopold e Lendl, 2003). Neste caso, o íon Cl^- é capaz de deslocar os íons de citrato previamente adsorvidos na superfície da nanopartícula e permitir a aproximação do MBC.

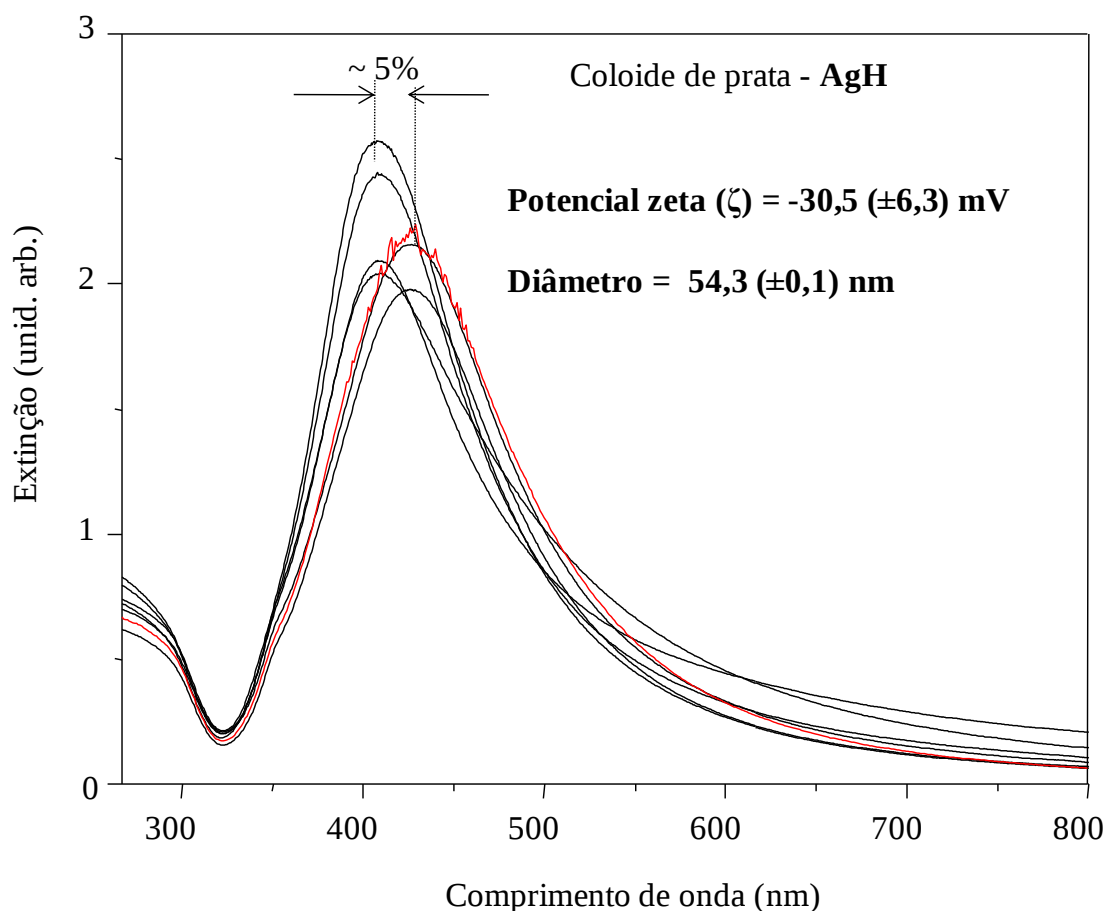
Este resultado está de acordo com a literatura, em que íons como Cl^- , S^- , I^- , Br^- têm grande afinidade pela superfície metálica, sendo capazes de deslocar íons previamente adsorvidos na superfície das nanopartículas (Schneider *et al.*, 1993). Ainda, nitrato de potássio é reportado como um agente agregante passivo enquanto o cloreto de potássio ativo (Etchegoin, 2009).

Somente a $\text{pH} > 7$ é possível obter espectro SERS de MBC utilizando AgCT com boa relação sinal/ruído. Assim, devido a limitações no intervalo de pH para obter bandas intensas no espectro SERS de MBC no caso das AgCT e da relação sinal/ruído das demais nanopartículas, a sequência do trabalho foi realizada apenas com AgH.

4.1.3. Caracterização das nanopartículas de prata reduzidas por hidroxilamina (AgH)

A reprodutibilidade em relação à obtenção de sinal SERS no protocolo de síntese das AgH foi avaliada para posterior análise analítica. A **Figura 24** mostra os espectros de extinção de sete lotes de coloides de prata, isto é, coloides de prata obtidos de sete sínteses. Destas sínteses, seis foram feitas na Espanha no laboratório do Dr. Sanchez-Cortes, e a última, indicada pela linha vermelha, foi realizada no Brasil no laboratório do Dr. Constantino.

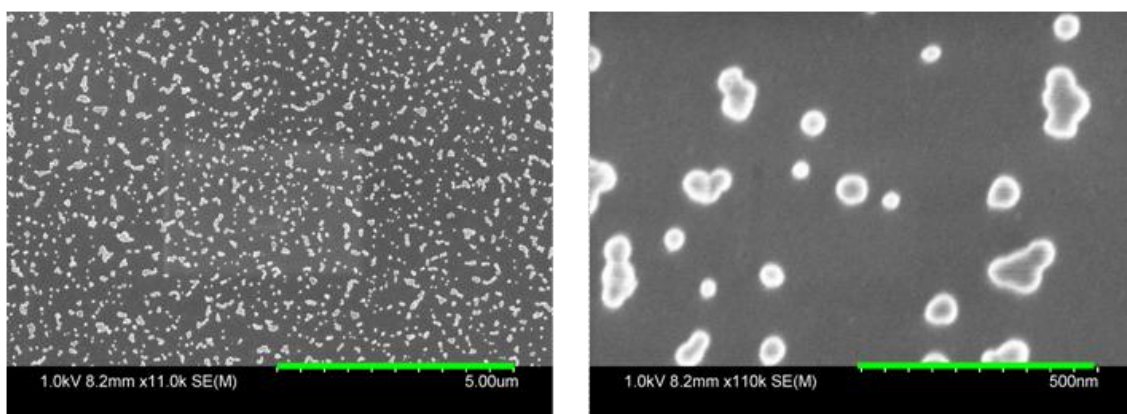
Figura 24: espectros extinção das AgH obtidos de sete sínteses (sete lotes). A linha vermelha representa uma síntese feita em um laboratório diferente.



Os resultados dos espectros de extinção mostram que, apesar de pequenas diferenças nos espectros, eles são semelhantes com uniformidade na distribuição de tamanho e forma das nanopartículas de prata. Além disso, o perfil das curvas é característico de nanopartículas esféricas (Izquierdo-Lorenzo *et al.*, 2012). Ainda, a maior diferença entre os máximos da banda em 404 nm (λ_{max}) dos espectros é em torno de 5%, como indicado na **Figura 24**. Ainda, as nanopartículas foram caracterizadas por potencial zeta (ζ), tamanho hidrodinâmico (**Figura 24**) e imagens MEV. O potencial zeta foi de $-30,5 \pm 6,2$ mV em pH 6 e tamanho médio foi $54,3 \pm 0,1$ nm (medido através de espalhamento hidrodinâmico da luz). A **Figura 25** mostra imagens de MEV das

nanopartículas de prata imobilizadas em substrato de vidro previamente modificado com (3-aminopropil)trimetoxissilano (APTMS) para a silanização da superfície, para uma análise complementar.

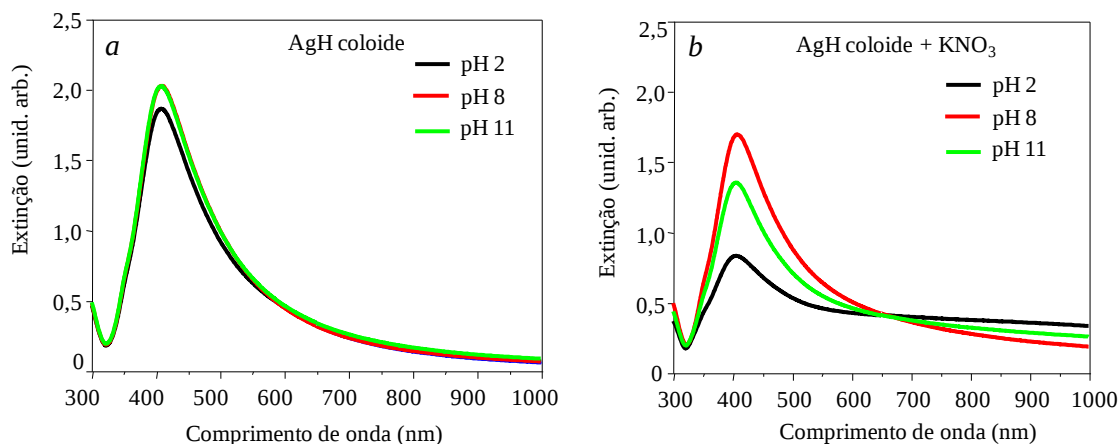
Figura 25: imagens MEV de nanopartículas de prata imobilizadas em substrato de vidro previamente modificado com (3-aminopropil)trimetoxissilano (APTMS) para a adesão das nanopartículas. A escala é de 5,0 μm (esquerda) e 500 nm (direita).



A imagem MEV mostra que embora as nanopartículas estão parcialmente agregadas (**Figura 25** – direita), não existem grandes agregados (**Figura 25** – esquerda). Além disso, os agregados são formados por duas ou três nanopartículas e a nanopartícula isolada mede em torno de 50 nm. Este tamanho é similar ao medido via espalhamento de luz (54 nm). Estes resultados (tamanho e potencial zeta) são similares aos encontrados na literatura para nanopartículas estabilizadas eletrostaticamente (Badawy *et al*, 2010).

A estabilidade das nanopartículas em relação ao pH foi monitorada através de espectros de extinção, uma vez que alterações no espectro evidenciam mudanças na interface promovida pela presença de espécies iônicas ou neutras. A **Figura 26** mostra espectros de extinção do coloide de prata (AgH), coloide de prata com adição de KNO_3 (AgH+ KNO_3) em diferentes pHs.

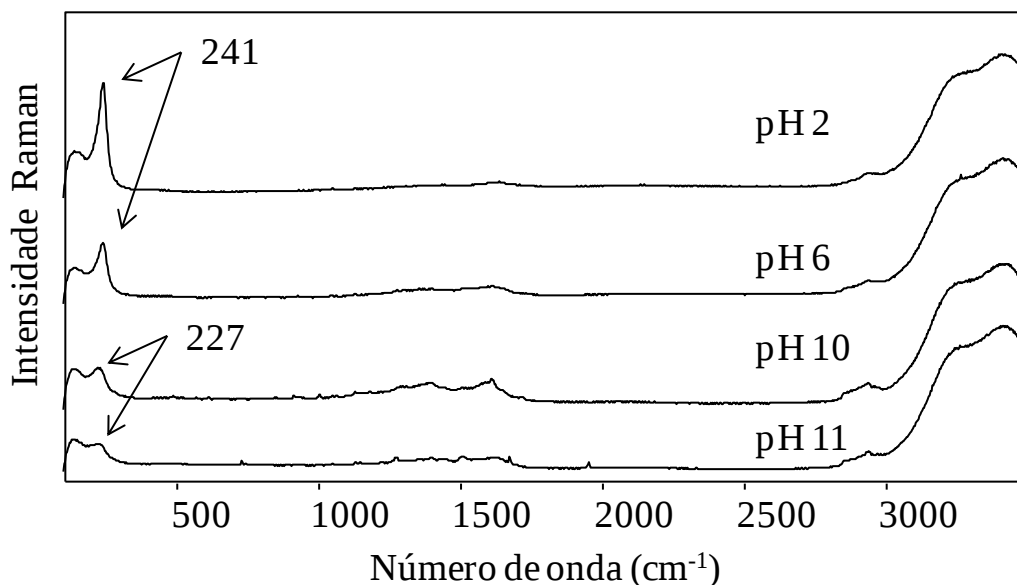
Figura 26: espectros de extinção em diferentes pHs de a) AgH, b) AgH com adição de KNO_3 (0,5 mol/L) .



O coloide de prata (AgH) apresenta uma única banda em torno de 400 nm no intervalo de pH entre 2 e 11 (**Figura 26a**). Não há deslocamento do máximo da banda e a forma da banda permanece praticamente inalterada. Em contrapartida, existem diferenças substanciais quando KNO_3 é adicionado (**Figura 26b**). A intensidade do máximo da banda diminui e a extinção da cauda da banda sofre um aumento (~ 500 nm) devido à indução da agregação. Como conclusão, a mudança no pH do meio não é suficiente para promover a agregação das nanopartículas (pelo menos em um curto intervalo de tempo), porém a presença de KNO_3 induz a agregação.

A estabilidade do coloide de prata também foi investigada através dos espectros Raman dos coloides em diferentes pHs, após a adição de KNO_3 , como mostrado na **Figura 27**.

Figura 27: espectros Raman do coloide de prata com adição de KNO_3 (0,5 mol/L) em diferentes pHs.



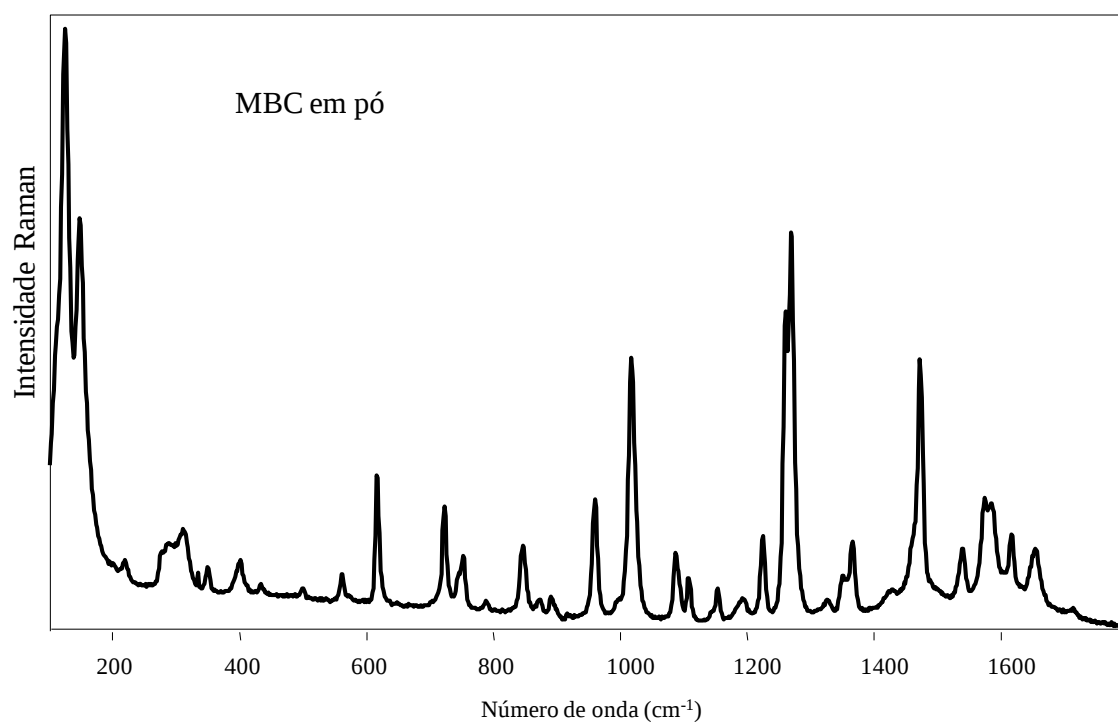
Como observado (**Figura 29**) as AgH permanecem estáveis nos pHs estudados, caso contrário, elas agregariam e precipitariam e não seria possível obter espectro Raman. Nestes espectros, podem ser observados a banda localizada em 241-227 cm^{-1} (atribuída ao estiramento Ag-Cl), a banda da água em torno de 3400 cm^{-1} e outras bandas pouco intensas na região de média frequência (1000-1500 cm^{-1}) principalmente nos pHs 10 e 11. Estas bandas em média frequência podem ser atribuídas ao nitrato (estiramento simétrico N-O, 1050 cm^{-1}) (Martina *et al*, 2012) e a presença de carbono (p.ex. C=C, -COOH, C-H, 1200-1600 cm^{-1}) (Kudelski e Pettinger, 2000) (Batista *et al*, 2009). Dois fenômenos podem estar relacionados com a presença de carbono na superfície das nanopartículas: CO_2 dissolvido na solução aquosa pode levar à deposição de carbono amorfo hidratado e queima, devido ao laser, dos sub-produtos orgânicos formados durante a síntese do coloide. Outro fato que pode ser levado em consideração é que nesses pHs (10 e 11) pode ocorrer a formação de óxido de prata (Álvarez-Puebla *et al.*, 2006) que pode contribuir no espectro Raman desses coloides (Martina *et al.*,

2012). Estas bandas não interferem no intenso sinal do MBC que possui maior seção eficaz em SERS. Embora, no geral, a intensidade SERS de diferentes amostras possa variar, a discussão dos resultados é baseada na intensidade relativa das bandas SERS que permanece praticamente constante para uma determinada amostra.

4.2. Espectros SERS de MBC obtidos a diferentes pH

Devido a baixa solubilidade de MBC, não foi possível obter espectro Raman da solução aquosa de MBC, mesmo variando o pH. A **Figura 28** mostra o espectro Raman de MBC sólido obtido com laser de 785 nm. O espectro é dominado por sete bandas muito intensas que aparecem em 618, 724, 961, 1030, 1262, 1271 e 1475 cm^{-1} , como também duas bandas abaixo de 150 cm^{-1} devido a vibrações da rede. As demais bandas entre 200 e 1800 cm^{-1} apresentam menores intensidades que as anteriores.

Figura 28: espectro Raman de MBC sólido. Laser de excitação em 785 nm.



A **Tabela III** apresenta a atribuição vibracional do MBC baseada em cálculos teóricos e revisão na literatura (Krimm e Bandekar, 1986; Carter e Pemberton, 1992; Majoube *et al.*, 1993; Barth e Zscherp, 2002; Morsy *et al.*, 2002). As bandas associadas à ligação NH do grupo imidazol e amídico foram destacadas. Na região entre 1200 e 1300 cm^{-1} é possível distinguir a presença de uma forma particular ionizada de MBC, dado que as bandas características das espécies desprotonadas são obtidas nesta região.

Tabela III: atribuição dos modos vibracionais Raman do MBC sólido obtida através de cálculos teóricos B3LYP/6-31G* nos estados protonado (MBC⁺), neutro (MBC⁰) e desprotonado (MBC⁻). Modos vibracionais Raman das moléculas de imidazol (IZ) e benzimidazol (BIZ) encontrados na literatura.

Números de onda experimentais					Números de onda teóricos ^f (B3LYP/6-31G*)					
Raman ^{a, b}	SERS ^c	Raman ^{d, e}	SERS ^e	Raman ^f						
IZ (Solução)	IZ	BIZ (Sólido)	BIZ	MBC (Sólido)	IZ	BIZ	MBC ⁺	MBC ⁰	MBC ⁻	Atribuição ^f
				289(m)			305	305	279	desqueleto (CNHC=O)
				351(w)			367	374	326	δ(O=COCH ₃)
		424	427	435(vw)		439	423	433	437	γ(CH) _{Bz} , γ(NH) _{IZ} , τ (CC) _{Bz} , 16a
				501(vw)			479	491	523	desqueleto _{BIZ}
		580	553	563(m)		589	574	561	586	γ(CH) _{Bz} ; γ (NH) _{IZ}
620	644			618(s)	644	652				γ(NH) _{IZ}
				724(s)			728	731	726	δ(CC) _{Bz} ; δ(COCH ₃)
760	753	755	782	754(m)	799	778	769	771	758	4; τ(CC) _{Bz} ; τ(CC) _{IZ}
844	837	848			856	848			5	δ(CC) _{Bz} ; δ(CN) _{IZ}
				847(m)			864	859	855	δ(CC) _{Bz} , δ(CH) _{IZ}
915				893(w)	904	890	903	906	904	12; δ(CC) _{Bz} ; δ(CC) _{IZ}

935	960	962	958		943	945				$\delta(\text{CNC})_{\text{IZ}}$	
				961(s)			962	988	959	$\delta(\text{NCOOCH}_3)$	
		1008	1012			1037				$\delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$; $\nu(\text{CC})_{\text{Bz}}$	
				1020(vs)			1032	1026	1016	$\delta(\text{CN})_{\text{IZ}}$; $\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$; $\nu(\text{COC H}_3)$	
							1050	1050	1043	$\delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$; $\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$	
1065	1081				1082	1106				$\nu(\text{CC})_{\text{IZ}}$; $\delta(\text{CH})_{\text{IZ}}$	
				1088(m)			1108	1115		$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}$; $\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$; $\nu(\text{OCH}_3)$	
1160	1159	1142	1138	1155(m)	1157	1138		1146	1185	$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}$; $\delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$	
			1174	1194(w)	1171	1181	1193	1181	1172	$\delta(\text{CH})_{\text{Met}}$	
				1226(m)			1221	1225	1213	$\nu(\text{O}-\text{CH}_3)$	
				1262(vs)			1239	1259		$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}$; $\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$	Amida III
1260	1265	1277	1279	1271(vs)	1293	1286	1279	1267	1263	$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}$; $\delta(\text{CH})_{\text{IZ}}$	
							1290			$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}^+$	
				1351(w)		1347	1328	1303	1332	$\delta(\text{CN})_{\text{AM}}$; $\delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$; $\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$	

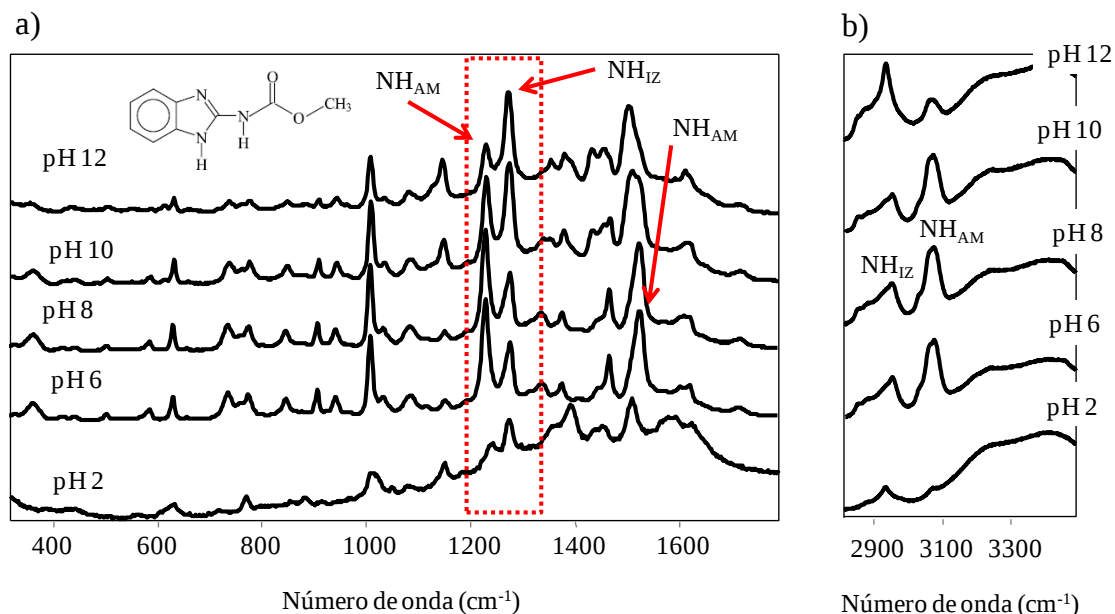
1328	1328	1368	1363	1367(m)	1381	1393	1388	1350	1392	$\delta(\text{CN})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CC})_{\text{IZ}};$ $\delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$	
1430	1438	1422	1422		1450	1435	1418	1413	1432	$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$	
				1475(s)			1454	1466		$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}; \delta(\text{CN})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CH})_{\text{Met}}$	
		1484	1451							$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$	
1490	1480	1501	1501		1519	1496				$\delta(\text{CN})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$	
1535	1531			1541(m)	1575	1551	1546	1528	1523	$\delta(\text{CH})_{\text{IZ}}; \delta(\text{NH})_{\text{IZ}}$	
				1575(m)			1600	1542		$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}; \delta(\text{NH})_{\text{IZ}}$	Amida II
		1590	1597	1588(m)				1628	1593	$\nu(\text{CC})_{\text{Bz}}; \nu(\text{CC})_{\text{IZ}}$	
		1622	1627	1618(m)		1639	1656	1642	1626	8a; $\nu(\text{CC})_{\text{Bz}}; \nu(\text{CC})_{\text{IZ}}; \delta(\text{NH})_{\text{AM}}$	
				1656(m)		1680	1690	1702	1656	8b; $\nu(\text{CC})_{\text{Bz}}; \nu(\text{CC})_{\text{IZ}}$	
				1714(w)			1841	1804	1699	$\nu(\text{C=O})$	Amida I
				2849(vw)			3103	3082	3099	$\nu(\text{CH})_{\text{Met}}$	
		2930		2955(vw)		3185	3203	3169	3149	$\nu(\text{CH})_{\text{Bz}}$	
		3072	3072	3064(vw)		3195	3218	3188	3176	$\nu(\text{CH})_{\text{Bz}}$	

	3090(vw)	3218	3229	3210	3185	v(CH) _{Bz}
3118	3653	3655	3530	3615	3535	v(NH) _{IZ}
			3601	3625		v(NH) _{AM}
			3633			v(NH) _{IZ} ⁺

^areferência [(Yoshida *et al.*, 1975)], ^b referência [(Carter e Pemberton, 1992)], ^c referência [(Loo *et al.*, 2006)], ^d referência[(Morsy *et al.*, 2002)], ^e referência [(Kim *et al.*, 2009)], ^fnomenclatura: ν (estiramento), δ (deformação no plano), γ (deformação fora do plano), τ (torção), s (banda intensa), m (banda de intensidade média), w (banda de intensidade fraca), vw (banda de intensidade muito fraca). A nomenclatura da atribuição dos modos normais do anel benzênico foi feita de acordo com a nomenclatura de Wilson(Paul C. Cross, 1955). AM (grupo amídico), IZ (grupo imidazólico), BIZ (grupo benzimidazólico), Bz (benzeno), Met (grupo metil).

Nas **Figuras 29a e b** estão os espectros SERS de MBC obtidos com AgH em distintos pH.

Figura 29: espectros SERS de MBC obtidos a distintos pH. a) Região de baixa e média frequência; b) região de alta frequência. Laser de excitação em 532 nm. Concentração de MBC $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L.



O espectro SERS em pH 6 é quase idêntico ao espectro em pH 8, não existindo mudanças significativas na intensidade relativa das bandas. Ambos os espectros apresentam cinco bandas SERS muito intensas em torno de 1520, 1460, 1270, 1230 e 1010 cm⁻¹. Contudo, mudanças significativas ocorrem na intensidade relativadas bandas em 1230 e 1270 cm⁻¹ quando o pH se torna mais básico (pH 10 e pH 12). A principal característica dos espectros SERS de MBC obtidos a distintos pH é que existem dois grupos de bandas (em médias e altas frequências, 1200 e 3000 cm⁻¹ respectivamente) cujas intensidades relativas mudam com a variação do pH do meio (coloide de prata). Quando o pH torna-se básico as bandas localizadas em 1230 e 3070 cm⁻¹ (**Figuras 39a e b**) tornam-se cada menos intensas, ao passo que as bandas em 1270 e 2950 cm⁻¹ tornam-

se mais intensas. Este comportamento pode ser relacionado com as vibrações que dependem do pH do meio, tais como, NH do grupo imidazólico e amídico. Assim, essas bandas podem ser usadas para diferenciar as possíveis espécies de MBC adsorvidas na superfície da prata. Em pH 2, o espectro SERS de MBC é muito menos intenso dos demais (na **Figura 39** cada espectro está normalizado) e ligeiramente diferente devido, provavelmente, ao MBC estar protonado neste pH.

A fim de correlacionar as frequências vibracionais com os espectros SERS, as frequências teóricas para as diferentes espécies químicas (MBC^- , MBC^0 e MBC^+) de MBC são mostradas na **Tabela III**. Para complementar os estudos foram feitos cálculos teóricos utilizando a função B3LYP e a base LanL2DZ para atribuição das frequências vibracionais dos diferentes complexos MBC-Ag que podem ser vistos na **Tabela IV**.

A maioria das bandas, incluindo as mais intensas presentes nos espectros SERS, são atribuídas aos modos normais de vibração “no plano”. Poucas bandas são atribuídas ao modo vibracional “fora do plano”. As bandas Raman mais intensas estão localizadas em 1520, 1460, 1270, 1230 e 1010 cm^{-1} a $\text{pH} \geq 6$ e são atribuídas a movimentos vibracionais “no plano” envolvendo $\delta\text{NH}_{\text{AM}}$, $\delta\text{NH}_{\text{AM}}+\delta\text{CH}_3$, $\delta\text{NH}_{\text{IZ}}$, $\delta\text{NH}_{\text{AM}}$ e $\delta\text{CC}_{\text{BZ}}$, respectivamente. Os modos vibracionais característicos do grupo amida também foram identificados. A vibração referente à Amida I, localizada em torno de 1650 cm^{-1} , surge principalmente do estiramento C=O. A banda referente à Amida II, em torno de 1550 cm^{-1} , é atribuída à combinação de duas vibrações: deformação “no plano” do NH_{AM} e estiramento do CN. Embora esta banda seja fraca ou ausente no espectro Raman de polipeptídeos, a banda SERS de intensidade média-forte observada em 1520 cm^{-1} pode ser atribuída à Amida II. Esta banda divide-se em duas componentes a pH 10, 1520 e 1507 cm^{-1} , sendo a banda em 1520 cm^{-1} ligeiramente menos intensa que a nova banda em 1507 cm^{-1} e, finalmente, torna-se menos intensa ainda aparecendo como um ombro a

pH 12. O campo de força prediz um ou dois modos fundamentais nesta região, dependendo se é considerado MBC^- ou MBC^0 , em 1528 e 1542 cm^{-1} , e atribuídas a deformações no plano do NH_{IZ} e NH_{AM} , respectivamente (**Tabela III**). O modo vibracional da Amida III do MBC, muito intensa em 1230 cm^{-1} , é uma combinação de deformação do NH_{AM} e estiramento do CC do anel benzênico. Na mesma região espectral uma forte banda SERS aparece em 1270 cm^{-1} , sendo atribuída à deformação “no plano” do NH_{IZ} . Em pH 2 algumas atribuições foram diferentes, por exemplo, na região de 1200 cm^{-1} observa-se a banda localizada em 1240 cm^{-1} atribuída ao estiramento O-CH₃ (pH 2 – **Tabela IV**) enquanto que em pHs mais altos(>6) a banda em 1228 cm^{-1} é atribuída à deformação NH_{AM} .

Existe também um par de bandas acima de 1400 cm^{-1} mostrando comportamento similar ao descrito para as regiões em torno de 1200 e 1500 cm^{-1} , isto é, suas intensidades relativas são invertidas em pH básico. De acordo com a atribuição proposta, ambos os modos fundamentais estão relacionados a deformações no plano do NH_{AM} e NH_{IZ} .

Em relação à região de alta frequência (**Figura 29b**), duas bandas largas são registradas em todos os espectros em torno de 3400 e 3200 cm^{-1} . Suas intensidades não são dependentes do pH e são devido à água. Contudo, duas bandas aparecem a menores comprimentos de onda, 3070 e 2950 cm^{-1} , cuja intensidade relativa é muito sensível ao pH, sendo invertidas em função do pH, como ocorre com as bandas em 1230 e 1270 cm^{-1} . Isto implica que elas também devem ser relacionadas aos grupos NH amídico e imidazólico. Estas bandas estão envolvidas em uma ressonância de Fermi (Krimm e Bandekar, 1986; Barth e Zscherp, 2002) (separação de duas bandas que tem quase a mesma energia e simetria) relativa ao estiramento CH de moléculas aromáticas (Morsy *et al.*, 2002), em torno de 3000 cm^{-1} , e sobreposições dos modos fundamentais em 1500

cm^{-1} atribuído à deformação no plano dos grupos NH amídico e imidazólico. Portanto, as bandas em 3070 e 2950 cm^{-1} devem-se a contribuição do estiramento CH dos anéis aromáticos e sobreposições das deformações NH amídico e imidazólico (Bellanato, 1960).

Tabela IV: atribuição vibracional dos diferentes complexos MBC-Ag proposta utilizando a base B3LYP/LanL2DZ e os respectivos espectros SERS a diferentes pH.

B3LYP/6-31G*		B3LYP/LanL2DZ			Atribuição	SERS				
MBC ⁰	MBC ⁺ -Ag ⁻	MBC ⁰ -Ag ⁺	MBC ⁻ -Ag ⁺ (N-Ag-N)	MBC ⁻ -Ag ⁺ (N-O-Ag)		pH=2	pH=6	pH=8	pH=10	pH=12
		175	209	142	$\nu(\text{Ag-N})$		233	226	222	215
305	285	310	304	331	$\delta_{\text{esqueleto}}(\text{CNHC=O})$		271	272	273	273
374	350	355	368	395	$\delta(\text{O=COCH}_3)$		362	363	360	354
433	433	439	452	454	$\gamma(\text{CH})_{\text{Bz}}; \gamma(\text{NH})_{\text{IZ}} \tau(\text{CC})_{\text{Bz}}, 16a$		441	444	440	440
491	480	505	522	510	$\delta_{\text{esqueleto}}_{\text{BIZ}}$		502	503	503	504
561	582	586	597	596	$\gamma(\text{CH})_{\text{Bz}}; \gamma(\text{NH})_{\text{IZ}}$		585	585	585	549
631	634	643	636	642	$6a; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$	629	629	630	630	629
731	740	749	710	732	$\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}; \delta(\text{COCH}_3)$		736	736	736	735
771	780	788	779	784	$4; \tau(\text{CC})_{\text{Bz}}; \tau(\text{CC})_{\text{IZ}}$	770	775	775	775	777
859	856	870	854	852	$\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}; \delta(\text{CN})_{\text{IZ}}$		848	847	848	850
906	896	904	897	923	$12; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}; \delta(\text{CC})_{\text{IZ}}$		906	907	907	907
988	933	929	943		$\delta(\text{NCOOCH}_3)$		943	941	942	943

1026	1006	1027	1002	1007	$\delta(\text{CN})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}; \nu(\text{COCH}_3)$	1008	1009	1008	1007	1007	
1050	1042	1041	1033	1035	$\delta(\text{CH})_{\text{Bz}}; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$		1033	1033	1034	1034	
1115	1077	1104			$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}; \nu(\text{OC H}_3)$	1079	1085	1084	1082	1079	
1146	1227	1146	1099	1084	$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$	1147	1151	1151	1147	1145	
1181	1201	1202	1195	1196	$\delta(\text{CH})_{\text{Met}}$		1195	1196	1195		
1225	1227	1228	1227	1235	$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}; \nu(\text{O-CH}_3)$	1240					
1259	1244	1241			$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$		1229	1229	1228	1228	Amida III
1267	1270	1272	1250	1256	$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CH})_{\text{IZ}}$	1273	1278	1276	1272	1272	
	1295				$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}^+$						
1303	1320	1301	1329	1327	$\delta(\text{CN})_{\text{AM}}; \delta(\text{CH})_{\text{Bz}}; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$	1354	1338	1336	1338	1351	
1350	1393	1363	1360	1362	$\delta(\text{CN})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CC})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$	1388	1375	1375	1377	1379	
1413	1419	1413	1419	1433	$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CH})_{\text{Bz}}$	1433	1441	1449	1431	1431	
1466	1445	1420			$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}; \delta(\text{CN})_{\text{IZ}}; \delta(\text{CH})_{\text{Met}}$		1467	1466	1465	1455	
1528	1523	1510	1505	1504	$\delta(\text{CH})_{\text{IZ}}; \delta(\text{NH})_{\text{IZ}};$	1507			1507	1501	

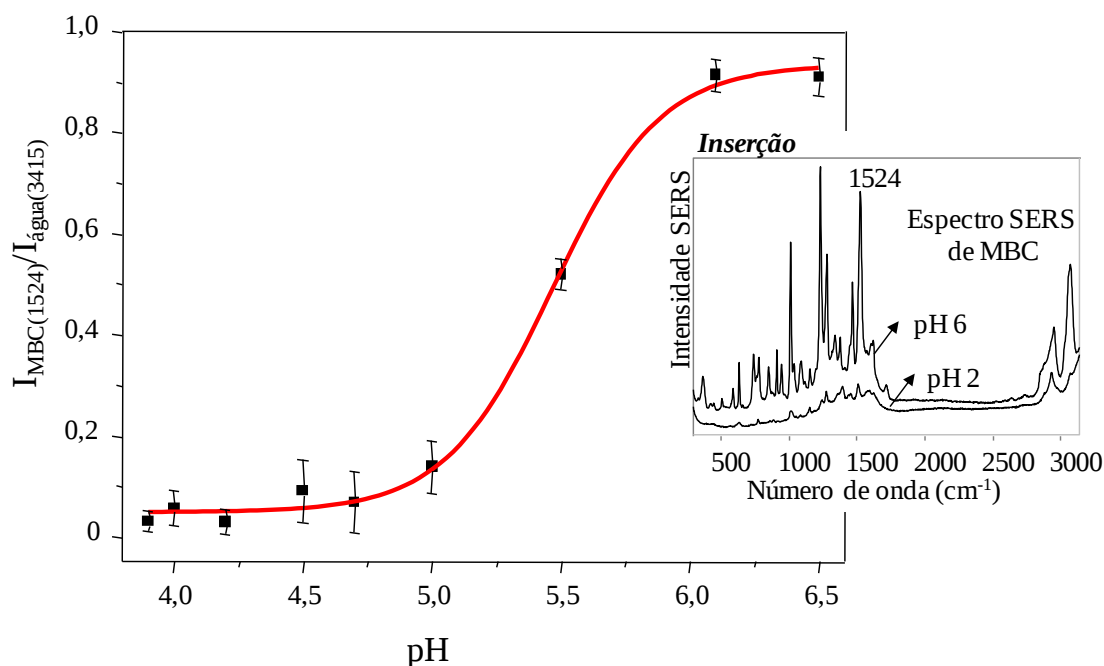
1542	1584	1546	1559		$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}; \delta(\text{CC})_{\text{Bz}}; \delta(\text{NH})_{\text{I}}$ $z;$	1523	1524	1522	1519	Amida II
1628	1658	1632	1605	1606	$\nu(\text{CC})_{\text{Bz}}; \nu(\text{CC})_{\text{IZ}}$	1620	1620	1618	1612	1609
1642	1654	1640	1632	1641	$8a; \nu(\text{CC})_{\text{Bz}}; \nu(\text{CC})_{\text{IZ}}; \delta(\text{NH})_{\text{AM}}$					
1702	1674	1682	1672	1669	$8b; \nu(\text{CC})_{\text{Bz}}; \nu(\text{CC})_{\text{IZ}}$					
1804	1687	1700	1605		$\nu(\text{C}=\text{O})$	1714	1715	1716	1714	Amida I
3082	3083	3094	3066	3062	$\nu(\text{CH})_{\text{Met}}$	2880	2881	2884	2883	
3169	3202	3185	3193	3192	$\nu(\text{CH})_{\text{Bz}}; \delta(\text{NH})_{\text{IZ}}$	2933	2953	2949	2936	2935
3188	3214	3207	3206	3202	$\nu(\text{CH})_{\text{Bz}}; \delta(\text{NH})_{\text{AM}}$	3070	3073	3067	3063	3068
3210	3247	3230	3232	3231	$\nu(\text{CH})_{\text{Bz}}$					
3615	3584	3551	3601	3692	$\nu(\text{NH})_{\text{IZ}}$					
3625	3617	3644			$\nu(\text{NH})_{\text{AM}}$					
	3648				$\nu(\text{NH})_{\text{IZ}+}$					

Nomenclatura: ν (estiramento), δ (deformação no plano), γ (deformação fora do plano), τ (torção). A nomenclatura da atribuição dos modos normais do anel benzênico foi feita de acordo com a nomenclatura de Wilson (Paul C. Cross, 1955). AM (grupo amídico), IZ (grupo imidazólico), BIZ (grupo benzimidazólico), Bz (benzeno), Met (grupo metil).

4.3. Espécie química adsorvida sobre a superfície da nanopartícula

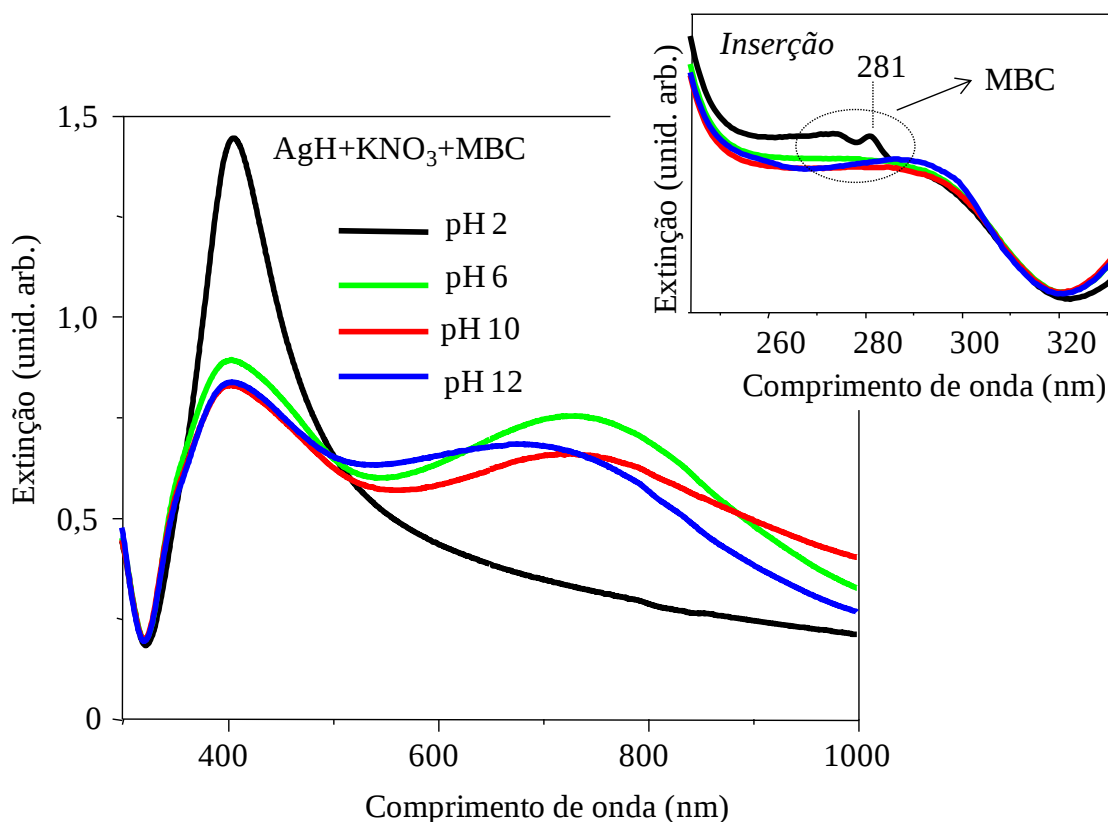
A análise das **Figuras 29a e b** leva a concluir que diferentes espécies químicas de MBC podem adsorver na superfície das nanopartículas e ainda que para $\text{pH} < 6$ a intensidade do sinal SERS do MBC é muito baixa. A variação da intensidade da banda em 1524 cm^{-1} ($\delta\text{NH}_{\text{AM}}$), uma das mais intensas da **Figura 29a**, em função do pH é mostrada na **Figura 30**. Essa banda também sofre alteração em função do pH do coloide. Todos os espectros foram normalizados em relação a banda da água (3415 cm^{-1}). Para cada valor de pH foram feitas três medidas independentes e é mostrado apenas o valor médio da intensidade do pico com seu respectivo desvio padrão. A inserção mostra os espectros SERS de MBC em pHs 2 e 6.

Figura 30: variação da intensidade da banda em 1525 cm^{-1} em diferentes pH. Concentração de MBC $1,0 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$. Inserção: espectros SERS de MBC em pHs 2 e 6, escala absoluta.



A intensidade começa a aumentar após pH 5, atingindo a saturação em pH 6. Levando em consideração que o MBC tem pK_{a1} 4,6 (abaixo de pH 4,6 o grupo imidazólico está protonotado), somente quando a maior quantidade do MBC neutro (MBC^0) está presente na suspensão é que ocorre aumento da intensidade SERS. A dependência da intensidade SERS da banda em 1524 cm^{-1} em relação ao pH sugere que o MBC protonado (MBC^+) pode ser descartado como espécie química adsorvida na superfície das nanopartículas. De fato, espectros absorção do coloide de $\text{AgH}+\text{KNO}_3+\text{MBC}$ também revelam mudanças a distintos pH (**Figura 31**).

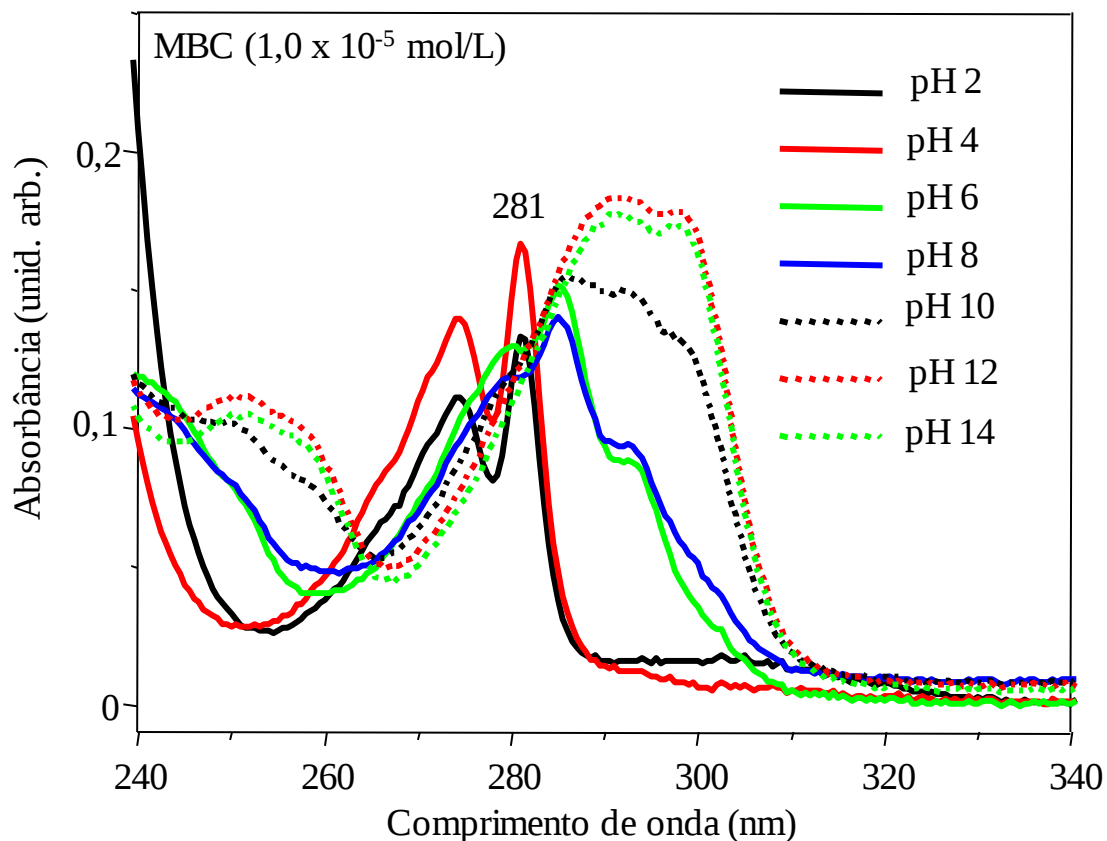
Figura 31: espectros de extinção do coloide de AgH+KNO₃+MBC em pH 2, 6, 10 e 12. *Inserção:* zoom da região de absorção do MBC. Concentração de MBC 1,0 x 10⁻⁵ mol/L.



Quando alguma espécie química de MBC está adsorvida na superfície da nanopartícula (pH > 5) surge uma nova banda em maiores comprimentos de onda (~780 nm) nos espectros de absorção (pH 6, 10 and 12). Em contrapartida, a pH 2 essa banda em torno de 780 nm não é observada e surge uma banda em menores comprimentos de onda, 281nm, que pode ser atribuída ao MBC⁺ (*inserção Figura 31*). Assim, a pH 2 o MBC⁺ está dissolvido na suspensão, não sendo adsorvido na superfície da nanopartícula. O espectro de absorção no UV-Vis do MBC em função do pH é mostrado na **Figura 32**. Independente da espécie química, o MBC possui apenas bandas de absorção em menores comprimentos de onda (~280 nm). Os espectros variam conforme a espécie química presente em maior quantidade, podendo ser distinguido três perfis. O espectro do MBC⁺ (pH 2 e 4) possui dois máximos, sendo um centrado em 281 nm, coincidente

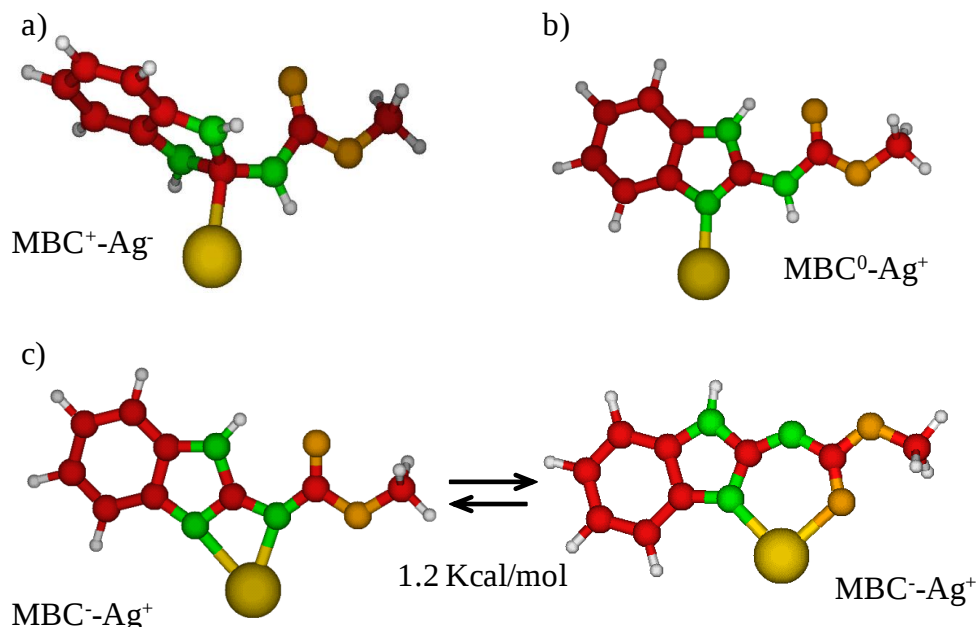
com o espectro da *inserção* da **Figura 31**. Esses resultados indicam que MBC^+ não é adsorvido na superfície das AgH.

Figura 32: espectros de absorção no UV-Vis de MBC em distintos pH.



Para comparar os resultados experimentais com os teóricos foram feitos três modelos teóricos, assumindo que o complexo MBC-Ag é formado por um átomo de prata ligado a três diferentes espécies de MBC (MBC^0 , MBC^+ e MBC^-), como mostrado na **Figura 33**.

Figura 33: estruturas otimizadas usando o conjunto de bases B3LYP/LanL2DZ para os complexos a) MBC^+-Ag^- , b) MBC^0-Ag^+ and c) MBC^--Ag^+ e diferença de energia entre duas estruturas otimizadas do complexo MBC^--Ag^+ , sendo um pouco mais estável o complexo cujo átomo de prata está ligado ao nitrogênio imidazólico e ao oxigênio do grupo carbamato.



O átomo de prata foi selecionado como positivo ou negativo dependendo do estado negativo, neutro ou positivo do MBC, a fim de minimizar a repulsão eletrostática do complexo. A função B3LYP junto com a base LanL2DZ foram utilizadas para calcular a estrutura otimizada e o campo de força dos complexos: MBC^0-Ag^+ , MBC^--Ag^+ , MBC^+-Ag^- . Este mesmo nível de cálculo tem sido empregado para análise de adsorção e processos de transferência de carga em SERS (Avila *et al.*, 2011; Centeno *et al.*, 2012). O cátion de prata é ligado ao nitrogênio imidazólico ou amídico nos complexos otimizados das espécies MBC^0 e MBC^- , respectivamente. O mesmo ocorre com moléculas aromáticas heterocíclicas, onde o átomo de nitrogênio é adsorvido sobre a superfície metálica (Soto *et al.*, 2002; Sardo *et al.*, 2009). No caso do MBC^+ , há apenas uma possível interação entre o MBC e a prata, isto é, através dos elétrons π do anel aromático, pois todos os nitrogênios estão ligados ao hidrogênio. Como esperado, o

complexo MBC^+-Ag^+ dissocia no processo de otimização. Portanto, foi considerado um átomo de prata com densidade de carga negativa a fim de calcular os números de onda associados ao complexo (MBC^+-Ag^-) e nesta configuração a estrutura apresenta um mínimo de energia.

A análise dos números de onda calculados teoricamente (B3LYP/LanL2DZ) dos três complexos (MBC^0-Ag^+ , MBC^--Ag^+ , MBC^+-Ag^- , mostrados na **Tabela V** e **Figura 33** indica que as principais mudanças devem corresponder aos modos fundamentais relacionados aos grupos ionizáveis imidazólico e amídico. De modo geral, a interação do anel imidazólico com a superfície parece dominar a adsorção do MBC na prata, como mostrado pelos modos fundamentais calculados em 1027 e 1363 cm^{-1} do complexo com Ag^+ . Além disso, as bandas mais intensas no espectro SERS são aquelas obtidas em cerca de 1520, 1270, 1230 e 1010 cm^{-1} e correspondem aos modos vibracionais no plano, o que sugere uma orientação perpendicular da molécula em relação à superfície metálica.

As espécies químicas adsorvidas na superfície metálica podem ser verificadas analisando a dependência do pH com a intensidade relativa das bandas SERS dos pares de bandas atribuídas aos grupos imidazólico e amídico. A característica mais marcante é o comportamento das bandas obtidas em 1230/1270 cm^{-1} atribuídas à deformação no plano do NH_{AM} e NH_{IZ} , respectivamente. A intensidade da banda em 1230 cm^{-1} diminui com o aumento do pH. Existem também outras bandas sensíveis ao pH que aparecem em torno de 1300 e 1400 cm^{-1} . Por exemplo, as bandas atribuídas ao grupo NH amídico (1340 e 1460 cm^{-1}) tornam-se fracas comparadas as atribuídas ao grupo NH imidazólico (1380 e 1430 cm^{-1}) quando o pH é elevado. O mesmo ocorre com a banda em 1522 cm^{-1} (NH_{AM}) que apresenta um ombro em 1505 cm^{-1} (NH_{IZ}) em pH 10 e domina em pH 12. Estes resultados indicam que as espécies químicas MBC^0 e MBC^- podem ser adsorvidas

na superfície das nanopartículas enquanto que a espécie MBC^+ não é capaz de adsorver na superfície metálica. Este último resultado ainda é suportado por tentativa de calcular a geometria otimizada do complexo MBC^+-Ag^+ . Os cálculos não convergem para um mínimo de energia, dado que o MBC^+ não tem nenhum átomo de nitrogênio livre para interagir com a superfície da nanopartícula. Somente foi obtida a geometria otimizada do complexo MBC^+-Ag^- em que o átomo de prata com densidade de carga negativa situa-se abaixo do anel aromático (**Figura 33a**) e o MBC^+ perde sua característica planar. Este tipo de interação deveria dar origem à amplificação das bandas SERS correspondentes aos modos normais de vibrações fora do plano. Como nenhuma banda atribuída a essas vibrações são vistas nos espectros (**Figura 29**), a adsorção das espécies MBC^+ foi descartada. Além disso, o MBC^+ perde a simetria C_s devido à flexão da molécula entre os grupos imidazólicos e carbamato (**Figura 33a**)

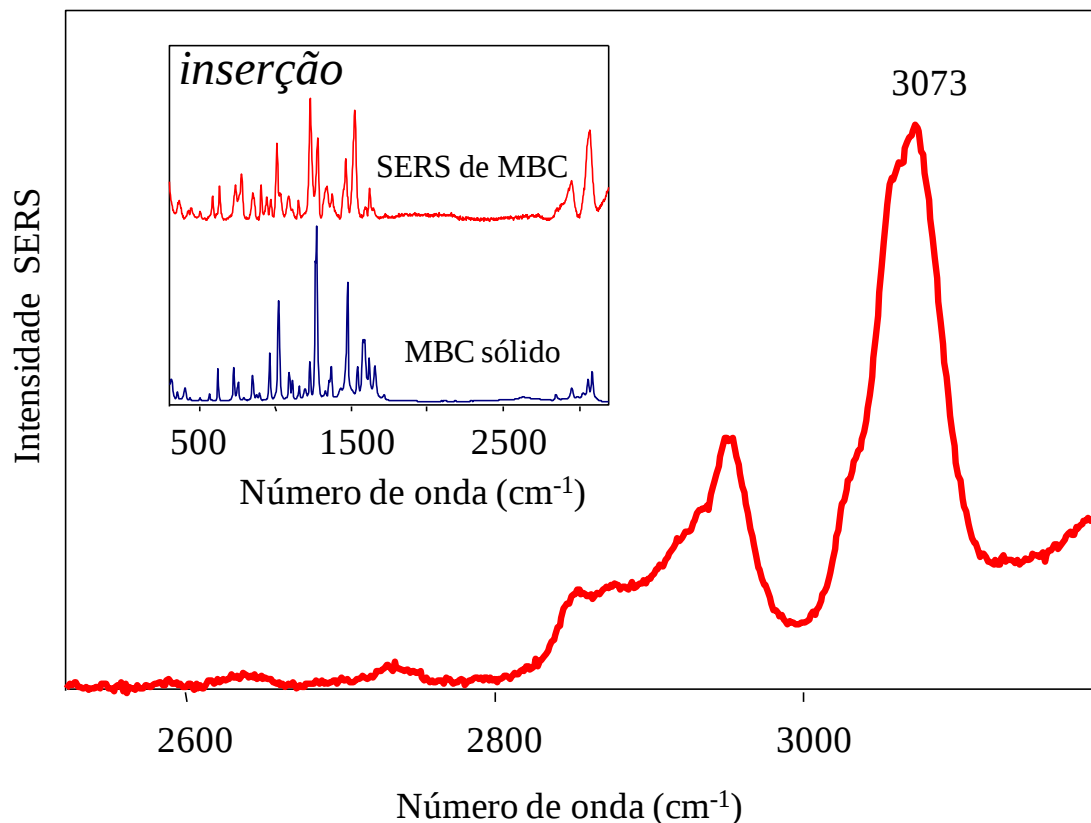
Portanto, MBC^0 e MBC^- são as duas espécies químicas capazes de adsorver na superfície metálica. As espécies de MBC^- contêm o grupo amidato e podem ser adsorvidas tanto pelo átomo de nitrogênio do grupo amídico (N-Ag-N) ou do grupo imidazólico junto com o oxigênio carbonílico (N-Ag-O), como mostrado na **Figura 33c**. Os campos de força calculados predizem números de onda muito similares para ambas as interações. Ainda a diferença de energia entre as duas estruturas é muito pequena (1,2 kcal/mol), sendo a interação grupo imidazólico junto com o oxigênio carbonílico (N-Ag-O) ligeiramente mais estável.

4.4. Centro de interação com a superfície metálica

A orientação das moléculas adsorvidas sobre a superfície metálica foi confirmada com ajuda das “regras de seleção”(Moskovits e Suh, 1984). Basicamente, a amplificação da vibração molecular ocorre se o momento de dipolo elétrico induzido

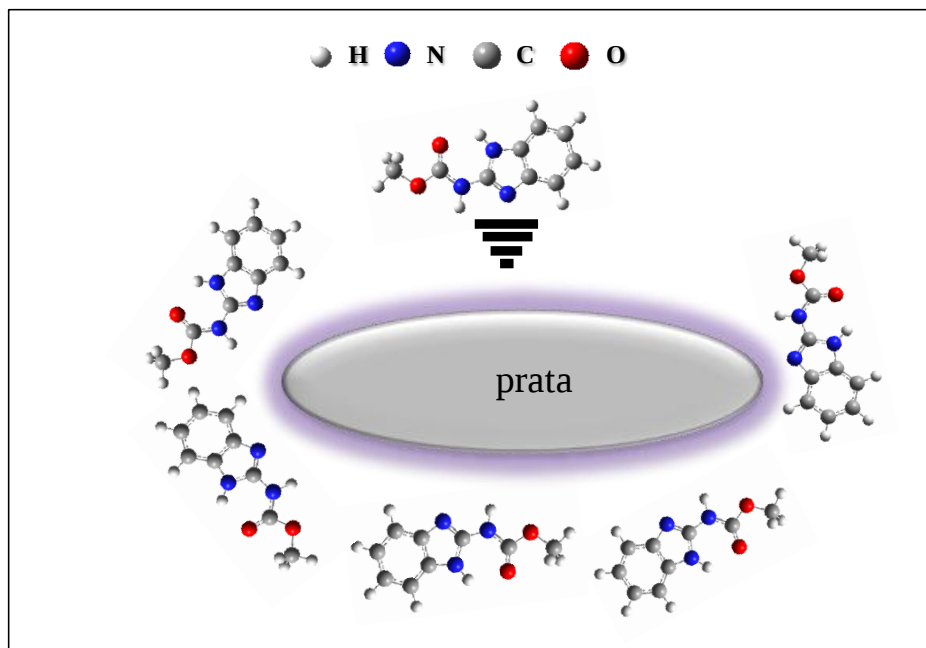
(P) da molécula possui, pelo menos, um componente perpendicular à superfície metálica. Um modo simples de determinar esse fenômeno é monitorar os modos vibracionais “no plano” e “fora do plano” de anéis aromáticos. Quando o plano de um anel aromático está perpendicular à superfície metálica, é esperada grande amplificação dos modos vibracionais “no plano” e pequena ou nenhuma amplificação dos modos “fora do plano”. Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2009) reportam SERS de benzimidazol adsorvidos sobre espelhos de Ag. O benzimidazol está na forma neutra sendo adsorvido na superfície com o anel aromático paralelo à superfície e a interação ocorre através da doação dos elétrons π . Em contrapartida, Moskovits e Suh (Moskovits e Suh, 1988) concluíram que a piridina está perpendicular à superfície da Ag monitorando a presença da banda atribuída ao estiramento C-H do anel aromático. Aqui, propomos o mesmo método, isto é, monitorando a banda do estiramento C-H do anel aromático. A **Figura 34** mostra o espectro SERS de MBC no intervalo entre 2500 e 3200 cm^{-1} obtido com linha laser de 532 nm. A *inserção* da **Figura 34** mostra a amplificação relativa para o intervalo em relação ao espectro do MBC sólido.

Figura 34: espectro SERS de MBC no intervalo entre 2500 e 3200 cm^{-1} obtido com linha laser em 532 nm. *Inserção:* amplificação SERS e espectro Raman do MBC sólido obtido com linha laser em 1064 nm (FT-Raman).



A amplificação da banda em 3073 cm^{-1} é atribuída a dois grupos, estiramento N-H do grupo amídico e estiramento C-H do anel aromático, e sugere, principalmente devido a última atribuição, que o MBC está preferencialmente perpendicular à superfície metálica. Outra evidência é a amplificação de bandas em 628, 1228 e 1523 cm^{-1} que, de acordo com a atribuição feita através dos cálculos teóricos, são modos vibracionais “no plano” e que podem ser amplificados nesta orientação. Em termos de orientação, a molécula de MBC tem somente um local doador de elétron disponível para interagir com a superfície da Ag: o átomo de nitrogênio do grupo imidazol. Este resultado é ilustrado na **Figura 35**.

Figura 35: ilustração da adsorção de MBC na superfície da nanopartícula de prata em alta concentração.

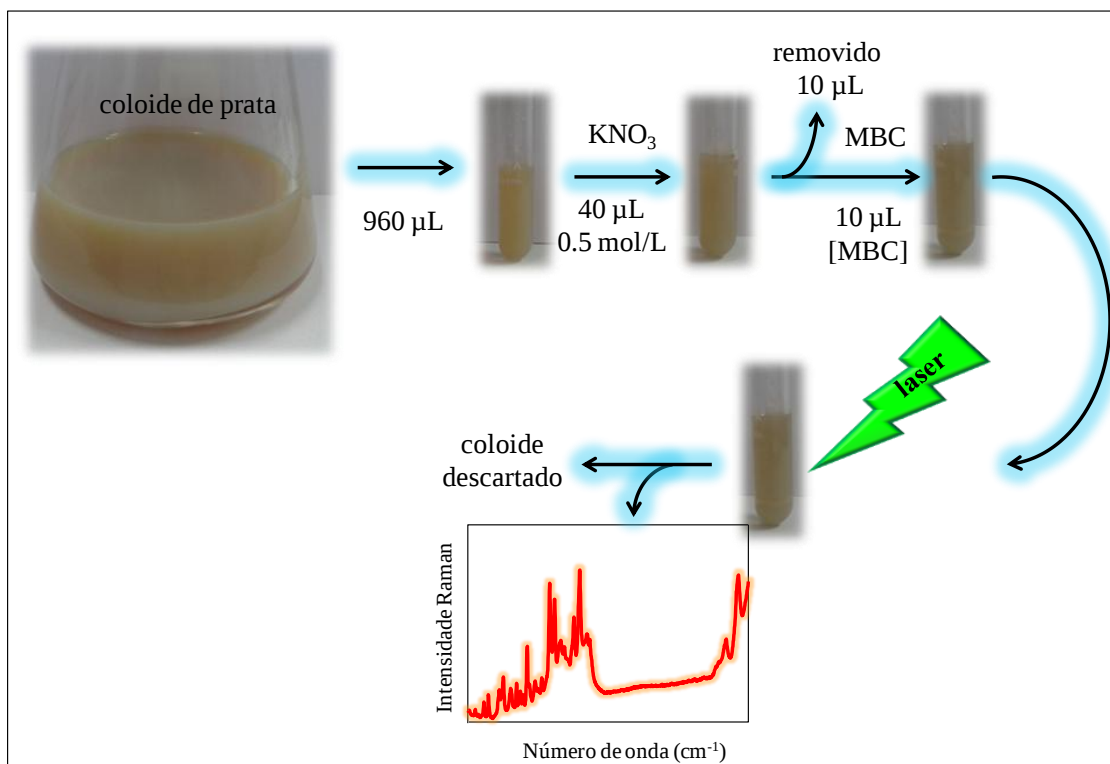


Além disso, esta interação é consistente com a presença da banda em 232 cm^{-1} atribuída ao estiramento Ag-N (Rivas *et al.*, 2001; Izquierdo-Lorenzo *et al.*, 2012). Ainda, Bonora *et al.* (Bonora *et al.*, 2013) mostram que moléculas como a atrazina, a prometrina e a simetrina, moléculas da mesma classe que o MBC, interagem com a superfície da Ag através do átomo de nitrogênio. O grupo do professor Dr. Otero tem mostrado que compostos heterocíclicos aromáticos, com átomos de nitrogênio, adsorvem preferencialmente através desse átomo com o plano da molécula perpendicular à superfície (Soto *et al.*, 2002; Sardo *et al.*, 2009).

4.5. Análise quantitativa

Considerando a reprodutibilidade quanto à análise quantitativa, os espectros SERS foram obtidos separadamente, ou seja, para cada medida de cada concentração foi feito o procedimento ilustrado no **Esquema 1**.

Esquema 1: procedimento de obtenção de espectro SERS para cada medida de cada concentração de MBC.



Cada espectro SERS de MBC foi obtido seguindo 5 passos: **A)** uma alíquota de 960 µL de coloide de prata (solução estoque) foi adicionada em uma cubeta; **B)** em seguida, 40 µL de nitrato de potássio (0,5 mol/L) são adicionados na cubeta, e a mistura é agitada (durante 3 segundos) para promover a agregação do coloide de prata; **C)** para manter o volume de 1,0 mL na cubeta, 10 µL de coloide de prata+KNO₃ foram removidos e 10 µL de solução de MBC com a concentração desejada foram adicionados na cubeta e agitado novamente (durante 3 segundos); **D)** a medida SERS foi realizada focando o laser dentro da cubeta contendo coloide de prata+KNO₃+MBC; **E)** finalmente, a mistura coloide de prata+KNO₃+MBC foi descartada. Estes 5 passos (feitos para uma medida) foram repetidos, independentemente, 3 vezes para cada concentração. Nesta tese, os espectros SERS foram obtidos usando dois diferentes lotes

de coloide de prata, isto é, coloides de duas sínteses. Usando o lote 1 de coloide de prata, espectros SERS de MBC foram obtidos para todas as concentrações. Usando o lote 2 de coloide de prata, um segundo e um terceiro conjunto de medidas SERS de MBC foram realizadas para todas as concentrações, conforme é mostrado na **Tabela V**.

Tabela V: conjuntos de experimentos nos quais foram utilizados coloides de prata obtidos de 2 sínteses. Os espectros SERS de MBC foram coletados para diferentes concentrações.

Conjunto 1	Conjunto 2	Conjunto 3
Lote 1 (coloide de prata)	Lote 2 (coloide de prata)	Lote 2 (coloide de prata)
Concentração de MBC (mol/L)	Concentração de MBC (mol/L)	Concentração de MBC (mol/L)
$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$
$8,0 \times 10^{-6}$	$8,0 \times 10^{-6}$	$8,0 \times 10^{-6}$
.	.	.
.	.	.
.	.	.
$1,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$

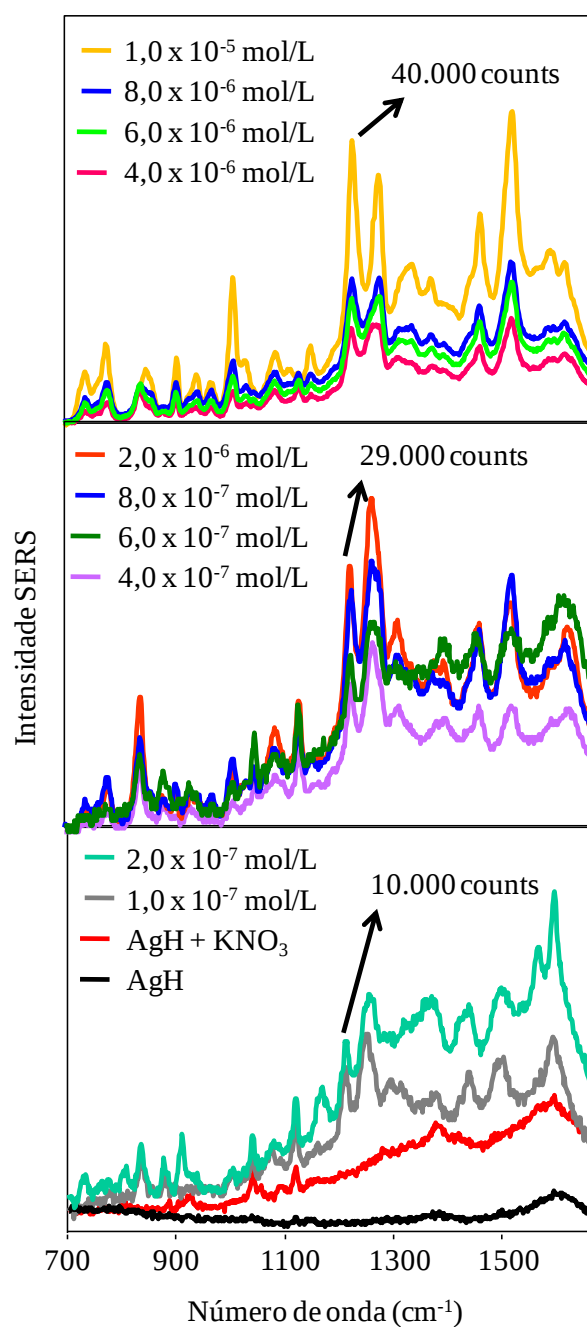
Vale ressaltar que o feixe de laser foi focado dentro da cubeta de dimensões 1,0 cm x 1,0 cm, que contém a suspensão coloidal. Este método experimental garante a reprodutibilidade dos experimentos SERS em condição de detecção por obter a média dos espectros SERS de todas as partículas que cruzam o foco do feixe durante a medida (Izquierdo-Lorenzo *et al.*, 2011). Além disso, proporciona a reprodutibilidade dos espectros SERS para um intervalo de concentração do analito, sobrepondo à irreprodutibilidade que poderia surgir no regime ultrasensível de detecção. Assim, as medidas foram realizadas no denominado intervalo “dinâmico” em que a intensidade do sinal SERS é diretamente proporcional à concentração do analito, permitindo análise quantitativa.

Devido à similaridade entre os espectros SERS obtidos da mesma amostra (coloide de prata+KNO₃+MBC), foi escolhido um espectro de cada concentração e de

cada conjunto. Desse modo, a análise quantitativa foi realizada considerando o valor médio da intensidade do pico e o desvio padrão correspondente para os 3 conjuntos de medidas feitos para cada concentração. O limite de detecção foi estimado usando a relação $3\sigma/\text{sensibilidade}$, onde σ é a intensidade do ruído do sinal (é considerado um pico desde que seja 3 vezes mais intenso que o ruído do espectro), de acordo com as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (Analytical-Methods-Committee, 1987). Além disso, cada espectro foi normalizado em relação à banda em 3415 cm^{-1} (banda da água) (Lopez-Tobar *et al.*, 2013) presente em todos os espectros e foi considerada apenas a intensidade da banda em 1228 cm^{-1} .

O MBC tem boa afinidade pela prata como pôde foi discutido nas seções anteriores. A fim de determinar a sensibilidade desta técnica para a detecção de MBC, foram obtidos espectros SERS de MBC em várias concentrações. A **Figura 36** apresenta espectros SERS de MBC em um intervalo de concentração entre $1,0 \times 10^{-5}$ – $1,0 \times 10^{-7}\text{ mol/L}$. Os espectros do coloide de prata sem agregar e agregado (coloide de prata + KNO_3) também são mostrados como referência.

Figura 36: espectros SERS de MBC em várias concentrações a pH 6.



A intensidade SERS é claramente dependente da concentração da molécula sobre a nanopartícula e o perfil do espectro não sofre grandes mudanças. Alguns picos sofrem inversão (1228 e 1272 cm^{-1}) ou desvanecem (1007 cm^{-1}) em intensidade relativa a baixas concentrações. Provavelmente a baixas concentrações ($1,0 \times 10^{-7}$ mol/L) algum pico pode perder a intensidade relativa característica da média do conjunto, isto é, o espectro é mais característico de nanopartículas mais isoladas (nanopartículas não

agregadas). Ao passo que, a altas concentrações ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L), a média dos espectros SERS permanece inalterada.

Das medidas SERS, é possível construir uma curva de adsorção de MBC sobre a superfície das nanopartículas para obter informação a respeito da sensibilidade e limite de detecção da técnica, como mostra a **Figura 37a**. Os espectros SERS de MBC foram normalizados em relação à banda em 3415 cm^{-1} presente em todos os espectros (serve como referência para a análise da intensidade relativa de bandas) e plotado a média e o desvio padrão da intensidade do pico em 1228 cm^{-1} em função da concentração de MBC. Esta banda foi escolhida por ser a mais intensa em pH 6. As intensidades dos picos com as respectiva média e desvio padrão estão na **Tabela VI**.

Figura 37: a) curva de adsorção do MBC sobre a superfície das AgH. b) Linearização para baixas concentrações.

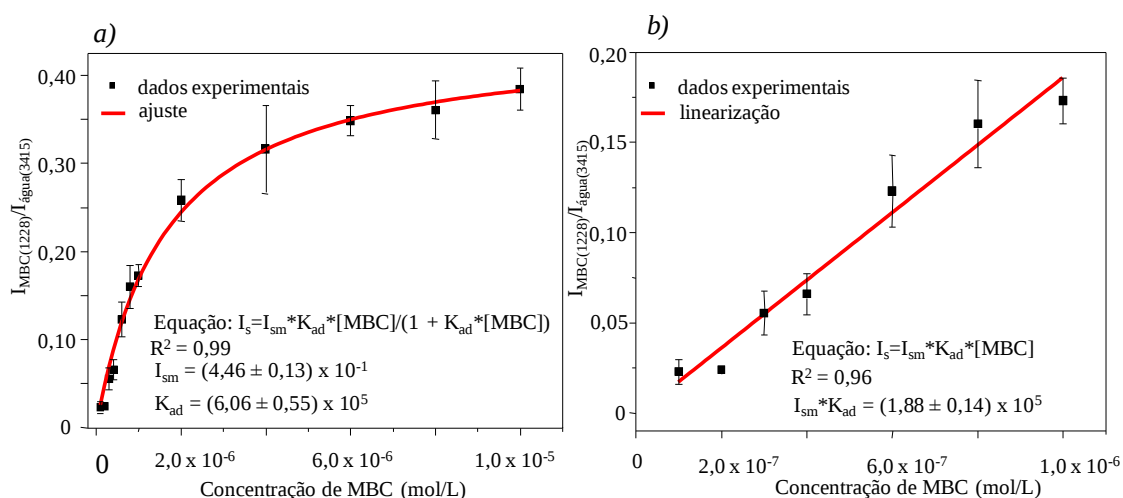


Tabela VI: intensidade Raman, média e desvio padrão do pico em 1228 cm⁻¹ de três conjuntos de medidas.

Concentração mol/L	Intensidade Raman			Média	Desvio padrão
	Conjunto 1	Conjunto 2	Conjunto 3		
1,0 x 10 ⁻⁵	0,36392	0,37822	0,41108	0,38441	0,02418
8,0 x 10 ⁻⁶	0,38017	0,32312	0,37954	0,36094	0,03276
6,0 x 10 ⁻⁶	0,35958	0,32923	0,35751	0,34877	0,01695
4,0 x 10 ⁻⁶	0,29163	0,28428	0,37364	0,31651	0,04961
2,0 x 10 ⁻⁶	0,23399	0,25974	0,28116	0,2583	0,02362
1,0 x 10 ⁻⁶	0,18651	0,1617	0,17105	0,17309	0,01253
8,0 x 10 ⁻⁷	0,13238	0,1728	0,1755	0,16023	0,02415
6,0 x 10 ⁻⁷	0,10027	0,13623	0,1326	0,12303	0,0198
4,0 x 10 ⁻⁷	0,05314	0,07042	0,07431	0,06596	0,01127
3,0 x 10 ⁻⁷	0,04803	0,04883	0,06952	0,05546	0,01218
2,0 x 10 ⁻⁷	0,02293	0,02571	0,02313	0,02392	0,00155
1,0 x 10 ⁻⁷	0,02219	0,01669	0,03014	0,02301	0,00676

O ajuste da curva está em vermelho. Os dados indicam que o MBC segue o modelo de adsorção de Langmuir que pode ser representado pela seguinte equação (Langmuir, 1916; Foo e Hameed, 2010):

$$\theta = \frac{\varphi}{\varphi_0} = \frac{K_{ad} [A]}{1 + K_{ad} [A]} \quad (5)$$

aqui, φ representa o número de moléculas adsorvidas na superfície e φ_0 indica o máximo número de moléculas que podem estar adsorvidas na superfície. Estes parâmetros estão relacionados com a concentração do analito $[A]$ e a constante de adsorção K_{ad} . A intensidade SERS está relacionada com o número de moléculas adsorvidas na superfície de acordo com a equação $I_s = \alpha \cdot \varphi$ e $I_{sm} = \alpha \cdot \varphi_0$, onde I_s é a intensidade SERS de um número de molécula e I_{sm} é a intensidade de saturação. α é um parâmetro que depende da frequência do laser. Deste modo, I_s/I_{sm} pode ser escrita como

$$I_s = \frac{K_{ad} I_{sm} [A]}{1 + K_{ad} [A]} \quad (6)$$

Das isotermas de adsorção, parâmetros quantitativos podem ser calculados, tais como a constante de adsorção (K_{ad}) que está associada com a afinidade do analito com a superfície da nanopartícula, a intensidade máxima obtida através de SERS (I_{sm}) e a concentração máxima de analito adsorvido sobre a superfície da nanopartícula $[A]$.

O modelo de adsorção de Langmuir revela que a saturação do sinal SERS ocorre para a concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L indicando que esta concentração é suficiente para cobrir a superfície das nanopartículas (**Figura 37a**). De acordo com Izquierdo-Lorenzo *et al.* (Izquierdo-Lorenzo *et al.*, 2012) as nanopartículas reduzidas por hidroxilamina são esféricas, com diâmetro de 45 nm, máximo de ressonância do plasmon em 400 nm e possuem uma superfície total disponível em torno de $13,6 \pm 2,6$ cm²/mL. A área por molécula de MBC foi estimada em torno de com $71 \text{ \AA}^2$ utilizando o software GaussView 5.0.8. Então, dividindo a área disponível da nanopartícula pela área da molécula, a concentração teórica máxima está em torno de $3,05 \times 10^{-6}$ mol/L. Este valor está de acordo com o encontrado experimentalmente na **Figura 37a** ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) considerando o desvio padrão das medidas experimentais. Ainda, o baixo valor experimental encontrado pode ser devido ao fato que o MBC adota uma orientação preferencialmente perpendicular à superfície da nanopartícula.

O modelo de Langmuir implica que a adsorção segue um regime linear para baixas concentrações com a saturação acima de um limite. Assim, podemos assumir que para baixas concentrações $K_{ad}[A] \ll 1$ e $1 + K_{ad}[A] \sim 1$. A equação (6) pode ser reduzida a:

$$I_s \cong K_{ad} I_{sm} [A] \quad (7)$$

e o limite de detecção pode ser estimado. A **Figura 37b** mostra o intervalo linear de concentração de MBC. Os valores da sensibilidade ($K_{ad} \cdot I_{sm}$) e o limite de detecção encontrados foram $1,88 \pm 0,14 \times 10^5$ e $6,54 \times 10^{-8}$ mol/L (12,5 ppb), respectivamente. Este último valor foi calculado considerando a menor intensidade SERS (I_s) como $3 \times 0,0041$ (ruído da medida). O limite de ingestão diário de MBC estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é de 0,02 mg/kg p.c. (20 ppb) e o nível máximo de resíduo (MRL, do inglês *Maximum Residues Level*) de MBC permitido em suco de laranja na União Europeia é de 0,2 mg/kg (200 ppb). No caso do limite de detecção, o valor calculado nesta monografia está no mesmo intervalo de detecção de outros trabalhos (Del Pozo *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2013) e abaixo dos valores estabelecidos por agências reguladoras. Além disso, a técnica SERS apresenta a vantagem de ser uma técnica unívoca, isto é, possui habilidade para eliminar interferentes.

Capítulo 5

5.1. Conclusões

Esta tese mostra através de filmes de Langmuir que ocorre interação entre o MBC e lipídios/fosfolipídios e ainda que a interação é de origem eletrostática. Dentre os lipídios estudados o DODAB e o DDAB (ambos catiônicos) mostraram maior interação, seguido do DPPC (zwiteriônico) com uma interação intermediária e o DPPG (aniônico) sendo o que apresentou a menor interação. O DODAB e o DPPG com a ajuda de outros compostos suporte (NiTsPc e perileno) foram depositados via filmes LbL (DODAB/NiTsPc e perileno/DPPG) sobre eletrodos interdigitados formando as unidades sensoriais que compuseram uma língua eletrônica. Nesta configuração diferentes concentrações de MBC ($1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-10}$ mol/L) foram distinguidas através da técnica de projeção IDMAP. Individualmente a unidade sensorial composta pelo filme LbL de NiTsPc/DODAB apresentou os melhores resultados.

Ainda, mostramos que podem ser obtidos espectros SERS de MBC e que a melhor relação sinal/ruído foi obtida com nanopartículas de prata reduzidas por hidroxilamina ao comparar com outras rotas de síntese. Com a ajuda de cálculos teóricos foram identificadas as diferentes espécies químicas adsorvidas na superfície metálica, além da completa atribuição dos modos vibracionais do MBC. Os espectros SERS correspondem às espécies neutra (MBC^0) e desprotonada (MBC^-) de MBC. Ainda, através de modelos teóricos conciliados com resultados experimentais, foi descartada a possibilidade da espécie MBC^+ estar adsorvida na superfície metálica. Para a espécie neutra (MBC^0) o centro de interação entre a molécula e a nanopartícula foi determinado como sendo através do átomo de nitrogênio do grupo imidazólico. Já para a espécie desprotonada há duas configurações para o centro de interação, em que em

uma a interação ocorre entre os átomos de nitrogênio de dois grupos (amídico e imidazólico) e em outra configuração ocorre interação entre o átomo de nitrogênio (imidazólico) e o átomo de oxigênio do grupo carbamato. Esta última configuração é ligeiramente mais estável. As moléculas de MBC adsorvem na superfície metálica seguindo o modelo de Langmuir para adsorção. A sensibilidade e o limite de detecção foram determinados como sendo $1,88 \pm 0,14 \times 10^5$ e $6,54 \times 10^{-8}$ mol/L, respectivamente.

5.2. *Perspectivas futuras*

Os resultados apresentados nesta tese fornecem informações gerais sobre a interação entre lipídios e o MBC e duas técnicas de detecção deste composto. Todavia, o presente projeto abre lacunas que poderão ser supridas com novos projetos e experimentos complementares aos apresentados aqui. Alguns trabalhos sugeridos:

- 1- Utilizar um extrusor nas dispersões dos lipídios (DODAB e DDAB) e fosfolipídios (DPPC e DPPG) para ter controle do tamanho e formação de vesículas unilamelares.
- 2- Utilizar elementos quimicamente ativos nas medidas de eletroquímica para a detecção de MBC.
- 3- Investigar a influência da configuração (tamanho, espaçamento dos dígitos e quantidade de dígitos) dos eletrodos interdigitados utilizados na língua eletrônica.
- 4- Aprofundar os estudos SERS de MBC utilizando nanopartículas de ouro.

5.3. Considerações Finais

Nesta tese de doutorado foram propostos estudos da interação entre MBC e lipídios com diferentes densidades de cargas. Neste sentido inicialmente foi proposto o estudo utilizando diferentes técnicas como filmes de Langmuir, calorimetria diferencial exploratória (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) e espalhamento de luz (LS, do inglês *light scattering*). Contudo os resultados de DSC e LS não foram conclusivos.

As medidas de DSC de DODAB, DDAB, DPPC e DPPG não revelaram qualquer alteração com a presença do MBC. Este resultado pode ser devido a dois fatores principalmente: 1) baixa solubilidade do MBC em água e 2) formação espontânea das vesículas. Em relação ao primeiro fator, a máxima concentração de MBC em água a pH ~5,6 e temperatura 23 °C é em torno de $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Provavelmente, a baixa concentração não pôde ser capaz de induzir qualquer alteração na formação das vesículas dos lipídios e fosfolipídios cuja concentração foi de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L (concentração considerada ótima para a formação de vesículas). No trabalho de Furini *et al.* (Furini et al. 2013) é reportado que a NiTsPc impede a formação das vesículas de DODAB apenas quando a proporção molar é de 1:4 (NiTsPc:DODAB), ou seja, uma molécula de NiTsPc para quatro de DODAB. Quando a concentração de DODAB é maior que esta proporção, as vesículas voltam a se formar. Em nosso caso, para cada molécula de MBC há pelo menos cem de DODAB e por isso, talvez, não seja visto nenhum efeito via DSC. Quanto ao segundo fator, com a formação espontânea das vesículas dos lipídios não é possível controlar se as vesículas são unilamelares ou multilamelares. Desta forma, se o MBC interagir com a lamela mais externa das vesículas haverá outras lamelas internas que não estarão interagindo e

consequentemente a resposta no DSC da lamela externa será muito menos intensa das demais.

As medidas de LS também não foram conclusivas porque houve grande dispersão nos valores dos raios hidrodinâmicos na presença e na ausência do MBC. Nós acreditamos que isso é devido à formação espontânea das vesículas, não havendo controle no tamanho do raio hidrodinâmico. Nosso grupo adquiriu, recentemente, um extrusor (*Avanti Polar Lipids*) que basicamente tem por finalidade controlar o tamanho das vesículas e formar vesículas multilamelares, porém com menos lamelas que as formadas espontaneamente. Neste sistema, as dispersões das vesículas atravessam uma membrana porosa (poros da ordem de μm) que controla o máximo tamanho desejado além de formar vesículas multilamelares durante a extrusão. Assim, acreditamos que o uso do extrusor futuramente possa gerar mais resultados.

Na análise sensorial foi proposto o estudo de detecção de MBC via SERS, espectroscopia de impedância e voltametria cíclica. Contudo, os resultados deste último estudo (voltametria cíclica) não são apresentados porque o MBC não apresentou resposta. Neste estudo, substratos de vidro com uma camada condutora de ITO (óxido de índio estanho) foram recobertos com filmes de lipídios e imersos em solução suporte de KCl ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) com MBC $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Novamente, a ausência de resposta pode ser devido baixa concentração de MBC na solução. Uma alternativa que será considerada para experimentos futuros é a utilização de compostos suporte como ftalocianinas (por exemplo, a NiTsPc) ou perilenos que são elementos ativos nas medidas de eletroquímica.

Vale destacar que para complementar os resultados SERS as nanopartículas foram funcionalizadas a fim de mudar a superfície da prata gerando um ambiente químico

mais favorável à adsorção do MBC. A funcionalização foi feita com moléculas bifuncionais, isto é, moléculas que possuam afinidade tanto pela superfície da prata quanto pelo analito, no caso o MBC. Nesta tese foram testadas três moléculas funcionalizadoras: cucurbiturins, ditióis e lipídios. Contudo, a funcionalização não melhorou os resultados obtidos com as nanopartículas de prata não-funcionalizadas. Além disso, experimentos para obter sinal SERS do MBC em pH ácido (protonado) foram conduzidos utilizando eletrodo rugoso de prata. Uma gota de solução de MBC (pH 2) foi depositada sobre a superfície de um eletrodo. Ao solidificar o MBC cristaliza em grãos relativamente grandes e não foi possível obter espectros SERS.

Anexo

Figura A1: espectro de absorção no UV-Vis (acima) e espectro Raman (abaixo) do perileno utilizado neste trabalho. A estrutura molecular também é mostrada.

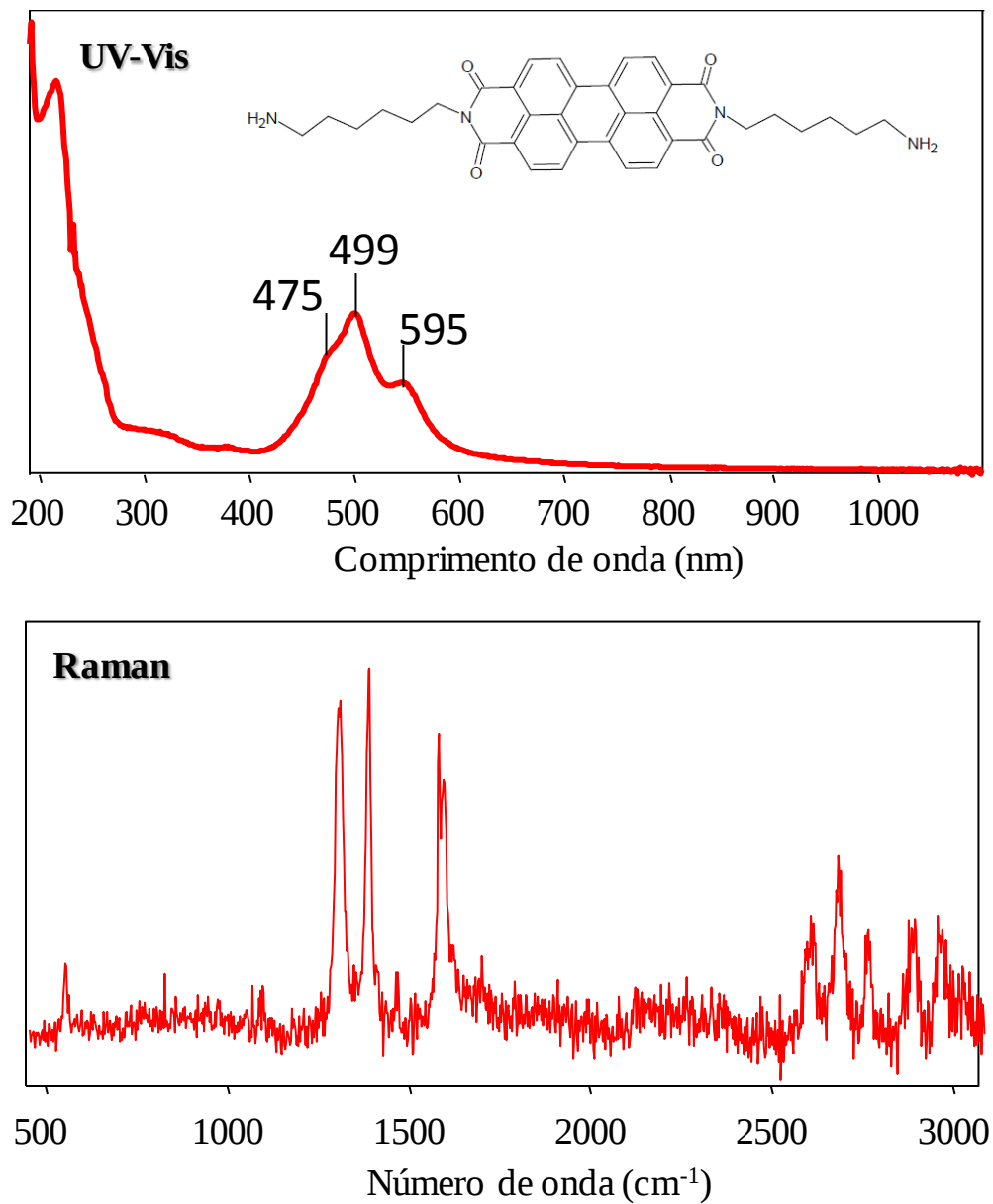
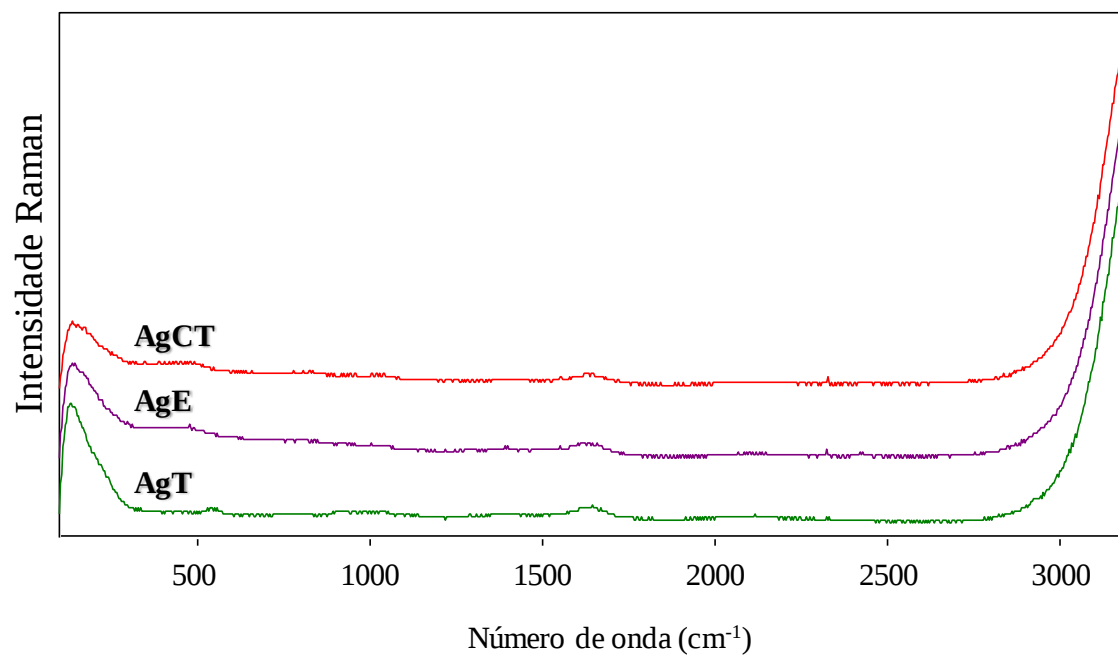


Figura A2: espectros Raman das nanopartículas AgCT, AgE e AgT.



Referências

- A.Riul (1998). Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett de Polianilinas. São Carlos, IFSC-USP.
- Albrecht, M. G. and J. A. Creighton (1977). "ANOMALOUSLY INTENSE RAMAN-SPECTRA OF PYRIDINE AT A SILVER ELECTRODE." *Journal of the American Chemical Society* 99(15): 5215-5217.
- Alula, M. T. and J. Yang (2014). "Photochemical decoration of silver nanoparticles on magnetic microspheres as substrates for the detection of adenine by surface-enhanced Raman scattering." *Analytica Chimica Acta* 812: 114-120.
- Alvarez-Puebla, R. A., Arceo, E., Goulet, P. J., Garrido, J. J., & Aroca, R. F. (2005). Role of nanoparticle surface charge in surface-enhanced Raman scattering. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(9), 3787-3792.
- Alvarez-Puebla, R. A., E. Arceo, et al. (2005). "Role of nanoparticle surface charge in surface-enhanced Raman scattering." *Journal of Physical Chemistry B* 109(9): 3787-3792.
- Ambiente, M. d. M. (2015). "<http://www.ministeriodomeioambiente.gov.br/seguranca-quimica/agrotóxicos> 2015."
- Analytical-Methods-Committee (1987). "RECOMMENDATIONS FOR THE DEFINITION, ESTIMATION AND USE OF THE DETECTION LIMIT." *Analyst* 112(2): 199-204.
- ANVISA (2015). "<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b17ca88047458b58951fd53fbc4c6735/c24.pdf?MOD=AJPERES> 2015."
- Aoki (2011). Filmes nanoestruturados de fosfolipídios como sistemas miméticos de membrana biológica para aplicação em sensores via sers e espectroscopia de impedância. Bauru, FC-UNESP.
- Aoki, P. H. B., L. N. Furini, et al. (2013). "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) applied to cancer diagnosis and detection of pesticides, explosives, and drugs." *Reviews in Analytical Chemistry* 32(1): 55-76.
- Aoki, P., W. Caetano, et al. (2008). "Sensor array made with nanostructured films to detect a phenothiazine compound." *Journal of nanoscience and nanotechnology* 8(9): 4341-4348.
- Aroca, R. (2006). *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*. England, John Wiley e Sons.
- Aroca, R. F. et al. Surface-enhanced Raman spectra of phthalimide. Interpretation of the SERS spectra of the surface complex formed on silver islands and colloids. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 104, n. 42, p. 9500-9505, 2000.
- Aroca, R. F., R. A. Alvarez-Puebla, et al. (2005). "Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures." *Advances in Colloid and Interface Science* 116(1-3): 45-61.
- Avila, F., D. J. Fernandez, et al. (2011). "Modelling the effect of the electrode potential on the metal-adsorbate surface states: relevant states in the charge transfer mechanism of SERS." *Chemical Communications* 47(14): 4210-4212.
- Badawy, A. M. E., Luxton, T. P., Silva, R. G., Scheckel, K. G., Suidan, M. T., & Tolaymat, T. M. (2010). Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental science & technology*, 44(4), 1260-1266.

- Barros, A., A. Dhanabalan, et al. (1999). "Langmuir monolayers of lignins obtained with different isolation methods." *Thin Solid Films* 354(1): 215-221.
- Barth, A. and C. Zscherp (2002). "What vibrations tell us about proteins." *Quarterly Reviews of Biophysics* 35(4): 369-430.
- Basoukov, E. a. J. R. M. (2005). *Impedance Spectroscopy – Theory, Experiment and Applications*. New Jersey, John Wiley & Sons.
- Batista, Elisete A., and Marcia LA Temperini. "Spectroscopic evidences of the presence of hydrogenated species on the surface of copper during CO₂ electroreduction at low cathodic potentials." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 629.1 (2009): 158-163.
- Bellanato, J. (1960). "INFRA-RED SPECTRA OF ETHYLENEDIAMINE DIHYDROCHLORIDE AND OTHER AMINE HYDROCHLORIDES IN ALKALI HALIDE DISKS." *Spectrochimica Acta* 16(11-1): 1344-1357.
- Bencivenni, L., F. Ramondo, et al. (2000). "On the hydrogen bonding in uracil: its effect on the vibrational spectrum." *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions* 2(8): 1685-1693.
- Ben-Zur, R., H. Hake, et al. (2011). "Optical analytical methods for detection of pesticides." *Reviews in Analytical Chemistry* 30(3-4): 123-139.
- Bonora, S., E. Benassi, et al. (2013). "Raman and SERS study on atrazine, prometryn and simetryn triazine herbicides." *Journal of Molecular Structure* 1040: 139-148.
- Bretscher, M. S. (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature*, 236(61), 11-12.
- Brezesinski, G. and H. Möhwald (2003). "Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces." *Advances in colloid and interface science* 100: 563-584.
- Brockman, H. (1999). "Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?" *Current opinion in structural biology* 9(4): 438-443.
- Buch, A. C., G. G. Brown, et al. (2013). "Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Muller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouche, 1972)." *Applied Soil Ecology* 69: 32-38.
- Cai, Z.-Q., Y.-X. Zhu, et al. (2008). "Simultaneous determination of dissolved anthracene and pyrene in aqueous solution by synchronous fluorimetry." *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 69(1): 130-133.
- Canameres, M. V., J. V. Garcia-Ramos, et al. (2005). "Comparative study of the morphology, aggregation, adherence to glass, and surface-enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticles prepared by chemical reduction of Ag⁺ using citrate and hydroxylamine." *Langmuir* 21(18): 8546-8553.
- Carter, D. A. and J. E. Pemberton (1992). "SURFACE-ENHANCED RAMAN-SCATTERING OF THE ACID-BASE FORMS OF IMIDAZOLE ON AG." *Langmuir* 8(4): 1218-1225.
- Caseli, L., Crespilho, F. N., Nobre, T. M., Zaniquelli, M. E. D., Zucolotto, V., & Oliveira, O. N. (2008). Using phospholipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films as matrix for urease immobilization. *Journal of colloid and interface science*, 319(1), 100-108.
- Caseli, L., Moraes, M. L., Zucolotto, V., Ferreira, M., Nobre, T. M., Zaniquelli, M. E. D., ... & Oliveira, O. N. (2006). Fabrication of phytic acid sensor based on mixed phytase-lipid Langmuir-Blodgett films. *Langmuir*, 22(20), 8501-8508.

- Caseli, L., Pascholati, C. P., Teixeira, F., Nosov, S., Vebert, C., Müller, A. H. E., & Oliveira, O. N. (2010). Interaction of oligonucleotide-based amphiphilic block copolymers with cell membrane models. *Journal of colloid and interface science*, 347(1), 56-61.
- Cathcart, N., A. J. Frank, et al. (2009). "Silver nanoparticles with planar twinned defects: effect of halides for precise tuning of plasmon resonance maxima from 400 to > 900 nm." *Chemical Communications*(46): 7170-7172.
- Cathcart, Nicole, Andrew J. Frank, and Vladimir Kitaev. "Silver nanoparticles with planar twinned defects: effect of halides for precise tuning of plasmon resonance maxima from 400 to > 900 nm." *Chem. Commun.* 46 (2009): 7170-7172.
- Centeno, S. P., I. Lopez-Tocon, et al. (2012). "Franck-Condon Dominates the Surface-Enhanced Raman Scattering of 3-Methylpyridine: Propensity Rules of the Charge-Transfer Mechanism under Reduced Symmetry." *Journal of Physical Chemistry C* 116(44): 23639-23645.
- Chinaglia, D., G. Gozzi, et al. (2008). "Impedance spectroscopy used in a teaching lab." *Revista Brasileira de Ensino de Física* 30(4): 4504.4501-4504.4509.
- Constantino, C. J. L., T. Lemma, et al. (2001). "Single-molecule detection using surface-enhanced resonance Raman scattering and Langmuir-Blodgett monolayers." *Analytical Chemistry* 73(15): 3674-3678.
- Constantino, C. J., P. Antunes, et al. (2004). "Nanostructured films of perylene derivatives: high performance materials for taste sensor applications." *sensor letters* 2(2): 95-101.
- Costalonga, B. L., da Silva, R. C., Caseli, L., & Molina, C. (2012). Interaction of chlorhexidine with biomembrane models on glass ionomer by using the Langmuir-Blodgett technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 97, 57-61.
- da Silva, A. M. G., & Romão, R. I. (2005). Mixed monolayers involving DPPC, DODAB and oleic acid and their interaction with nicotinic acid at the air-water interface. *Chemistry and physics of lipids*, 137(1), 62-76.
- Decher, G., J. D. Hong, et al. (1992). "BUILDUP OF ULTRATHIN MULTILAYER FILMS BY A SELF-ASSEMBLY PROCESS .3. CONSECUTIVELY ALTERNATING ADSORPTION OF ANIONIC AND CATIONIC POLYELECTROLYTES ON CHARGED SURFACES." *Thin Solid Films* 210(1-2): 831-835.
- del Pozo, M., L. Hernandez, et al. (2010). "A selective spectrofluorimetric method for carbendazim determination in oranges involving inclusion-complex formation with cucurbit 7 uril." *Talanta* 81(4-5): 1542-1546.
- Dowling, J. E. and G. Wald (1981). "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America." *Nutrition reviews* 39(3): 135-138.
- Dynarowicz, P., Romeu, N. V., & Trillo, J. M. (1998). Stability of dialkyldimethylammonium bromides monolayers spread at the water/air interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 131(1), 249-256.
- Etchegoin, E. L. R. a. P. (2009). *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*. Amsterdam, Elsevier.
- Fan, M., G. F. S. Andrade, et al. (2011). "A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry." *Analytica Chimica Acta* 693(1-2): 7-25.

- Fang, H., X. Zhang, et al. (2015). "Ultrasensitive and quantitative detection of paraquat on fruits skins via surface-enhanced Raman spectroscopy." *Sensors and Actuators B-Chemical* 213: 452-456.
- Ferreira, M., W. Caetano, et al. (2005). "Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)." *Química Nova* 28(3): 502-510.
- Fleischmann, M., P. J. Hendra, et al. (1974). "RAMAN-SPECTRA OF PYRIDINE ADSORBED AT A SILVER ELECTRODE." *Chemical Physics Letters* 26(2): 163-166.
- Foo, K. Y. and B. H. Hameed (2010). "Insights into the modeling of adsorption isotherm systems." *Chemical Engineering Journal* 156(1): 2-10.
- Frens, G. (1973). "CONTROLLED NUCLEATION FOR REGULATION OF PARTICLE-SIZE IN MONODISPERSE GOLD SUSPENSIONS." *Nature-Physical Science* 241(105): 20-22.
- Garcia-Leis, A., J. Vicente Garcia-Ramos, et al. (2013). "Silver Nanostars with High SERS Performance." *Journal of Physical Chemistry C* 117(15): 7791-7795.
- Garcia-Leis, Adianez, Jose Vicente Garcia-Ramos, and Santiago Sanchez-Cortes. "Silver nanostars with high SERS performance." *The Journal of Physical Chemistry C* 117.15 (2013): 7791-7795.
- Giffin, G. A., S. Boesch, et al. (2009). "Vibrational Spectroscopy of Secondary Amine Salts: 1. Assignment of NH₂⁺ Stretching Frequencies in Crystalline Phases." *Journal of Physical Chemistry B* 113(49): 15914-15920.
- Goto, T. E., & Caseli, L. (2014). The interaction of mefloquine hydrochloride with cell membrane models at the air–water interface is modulated by the monolayer lipid composition. *Journal of colloid and interface science*, 431, 24-30.
- Gupta, S. K., Taylor, D. M., Dynarowicz, P., Barlow, E., Wainwright, C. E. A., & Underhill, A. E. (1992). Behavior of pure divalent bis (didodecyldimethylammonium) bis (4, 5-dimercapto-1, 3-dithiole-2-thionato) metalate complexes at the air-water interface. *Langmuir*, 8(12), 3057-3062.
- Huda, M. N., and A. K. Ray. "A correlation study of small silver clusters." *The European Physical Journal D-Atomic, Molecular, Optical and Plasma Physics* 22.2 (2003): 217-227.
- IBAMA. (2015). "<http://ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-grotoxicos/pagina-3> 2015."
- Iler, R. K. (1966). "MULTILAYERS OF COLLOIDAL PARTICLES." *Journal of Colloid and Interface Science* 21(6): 569-&.
- Izquierdo-Lorenzo, I., I. Alda, et al. (2012). "Adsorption and Detection of Sport Doping Drugs on Metallic Plasmonic Nanoparticles of Different Morphology." *Langmuir* 28(24): 8891-8901.
- Izquierdo-Lorenzo, I., S. Sanchez-Cortes, et al. (2011). "Trace detection of aminoglutethimide drug by surface-enhanced Raman spectroscopy: a vibrational and adsorption study on gold nanoparticles." *Analytical Methods* 3(7): 1540-1545.
- Jeanmaire, D. L. and R. P. Vanduyne (1977). "SURFACE RAMAN SPECTROELECTROCHEMISTRY .1. HETEROCYCLIC, AROMATIC, AND ALIPHATIC-AMINES ADSORBED ON ANODIZED SILVER ELECTRODE." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 84(1): 1-20.
- Jensen, L., C. M. Aikens, et al. (2008). "Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering." *Chemical Society Reviews* 37(5): 1061-1073.

- Jolliffe, I. T. (2002). *Principal Component Analysis*. New York, Springer-Verlag.
- Kim, M. S., M. K. Kim, et al. (2009). "Surface-enhanced Raman Spectroscopy of Benzimidazolic Fungicides: Benzimidazole and Thiabendazole." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 30(12): 2930-2934.
- Koner, A. L., I. Ghosh, et al. (2011). "Supramolecular encapsulation of benzimidazole-derived drugs by cucurbit 7 uril." *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 89(2): 139-147.
- Krajewska, B., Wydro, P., & Jańczyk, A. (2011). Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films. *Biomacromolecules*, 12(11), 4144-4152.
- Krimm, S. and J. Bandekar (1986). "VIBRATIONAL SPECTROSCOPY AND CONFORMATION OF PEPTIDES, POLYPEPTIDES, AND PROTEINS." *Advances in Protein Chemistry* 38: 181-364.
- Krishnan, R. S. and R. K. Shankar (1981). "RAMAN EFFECT - HISTORY OF THE DISCOVERY." *Journal of Raman Spectroscopy* 10(JAN): 1-8.
- Kudelski, Andrzej, and Bruno Pettinger. "SERS on carbon chain segments: monitoring locally surface chemistry." *Chemical Physics Letters* 321.5 (2000): 356-362.
- Langmuir, I. (1916). "The constitution and fundamental properties of solids and liquids Part I Solids." *Journal of the American Chemical Society* 38: 2221-2295.
- Lasic, D. and D. Papahadjopoulos (1995). "Liposomes revisited." *Science* 267(5202): 1275.
- Lasic, D. D. (1995). *Structure And Dynamics Of Membranes*. Amsterdam.
- Lee, P. C. and D. Meisel (1982). "ADSORPTION AND SURFACE-ENHANCED RAMAN OF DYES ON SILVER AND GOLD SOLS." *Journal of Physical Chemistry* 86(17): 3391-3395.
- Leopold, N. and B. Lendl (2003). "A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride." *Journal of Physical Chemistry B* 107(24): 5723-5727.
- Liu, B., G. Han, et al. (2012). "Shell Thickness-Dependent Raman Enhancement for Rapid Identification and Detection of Pesticide Residues at Fruit Peels." *Analytical Chemistry* 84(1): 255-261.
- Liu, B., P. Zhou, et al. (2013). "Detection of Pesticides in Fruits by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Coupled with Gold Nanostructures." *Food and Bioprocess Technology* 6(3): 710-718.
- Lobo, R., M. Pereira-da-Silva, et al. (2003). "The morphology of layer-by-layer films of polymer/polyelectrolyte studied by atomic force microscopy." *Nanotechnology* 14(1): 101.
- Loo, B. H., Y. Tse, et al. (2006). "Surface-enhanced Raman spectroscopy of imidazole adsorbed on electrode and colloidal surfaces of Cu, Ag, and Au." *Journal of Raman Spectroscopy* 37(1-3): 299-304.
- Lopez-Tobar, E., M. Antalík, et al. (2013). "Adsorption and Detection of Amyloid Marker Thioflavin T on Ag Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering." *Journal of Physical Chemistry C* 117(8): 3996-4005.
- Lorena Roldan, M., S. Sanchez-Cortes, et al. (2012). "Cucurbit 8 uril-stabilized charge transfer complexes with diquat driven by pH: a SERS study." *Physical Chemistry Chemical Physics* 14(14): 4935-4941.

- Luo, S., Y. Wu, et al. (2013). "A voltammetric sensor based on GO-MWNTs hybrid nanomaterial-modified electrode for determination of carbendazim in soil and water samples." *Ionics* 19(4): 673-680.
- M. J. Frisch, G. W. T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, (2009). Gaussian 09. USA, Inc., Wallingford, CT.
- Maier, S. A. (2007). *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. United Kingdom, Springer.
- Majoube, M., M. Henry, et al. (1993). "PRERESONANCE RAMAN-SPECTRA FOR IMIDAZOLE AND IMIDAZOLIUM ION - INTERPRETATION OF THE INTENSITY ENHANCEMENT FROM A PRECISE ASSIGNMENT OF NORMAL-MODES." *Chemical Physics* 169(2): 231-241.
- Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1286(3), 183-223.
- Martina, Irene, et al. "Micro-Raman characterization of silver corrosion products: Instrumental set up and reference database." *e-Preserv. Sci* 9 (2012): 1-8.
- Metraux, G. S. and C. A. Mirkin (2005). "Rapid thermal synthesis of silver nanoprisms with chemically tailorable thickness." *Advanced Materials* 17(4): 412-+.
- Millstone, Jill E., et al. "Colloidal gold and silver triangular nanoprisms." *Small* 5.6 (2009): 646-664.
- Montanha, E. A., Pavinatto, F. J., Caseli, L., Kaczmarek, O., Liebscher, J., Huster, D., & Oliveira, O. N. (2010). Properties of lipophilic nucleoside monolayers at the air–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2), 161-165.
- Morsy, M. A., M. A. Al-Khaldi, et al. (2002). "Normal vibrational mode analysis and assignment of benzimidazole by ab initio and density functional calculations and polarized infrared and Raman spectroscopy." *Journal of Physical Chemistry A* 106(40): 9196-9203.
- Moskovits, M. and J. S. Suh (1984). "SURFACE SELECTION-RULES FOR SURFACE-ENHANCED RAMAN-SPECTROSCOPY - CALCULATIONS AND APPLICATION TO THE SURFACE-ENHANCED RAMAN-SPECTRUM OF PHTHALAZINE ON SILVER." *Journal of Physical Chemistry* 88(23): 5526-5530.
- Moskovits, M. and J. S. Suh (1988). "SURFACE GEOMETRY CHANGE IN 2-NAPHTHOIC ACID ADSORBED ON SILVER." *Journal of Physical Chemistry* 92(22): 6327-6329.
- Munro, C. H., W. E. Smith, et al. (1995). "CHARACTERIZATION OF THE SURFACE OF A CITRATE-REDUCED COLLOID OPTIMIZED FOR USE AS A SUBSTRATE FOR SURFACE-ENHANCED RESONANCE RAMAN-SCATTERING." *Langmuir* 11(10): 3712-3720.

- Musio, F. and M. C. Ferrara (1997). "Low frequency ac response of polypyrrole gas sensors." *Sensors and Actuators B: Chemical* 41(1): 97-103.
- Nassar, A. E. F., Rusling, J. F., & Kumosinski, T. F. (1997). Salt and pH effects on electrochemistry of myoglobin in thick films of a bilayer-forming surfactant. *Biophysical chemistry*, 67(1), 107-116.
- Nassar, A. E. F., Willis, W. S., & Rusling, J. F. (1995). Electron transfer from electrodes to myoglobin: facilitated in surfactant films and blocked by adsorbed biomacromolecules. *Analytical chemistry*, 67(14), 2386-2392.
- Negi, G., Pankaj, A. S., & Sharma, A. In situ Biodegradation of Endosulfan, Imidacloprid, and Carbendazim Using Indigenous Bacterial Cultures of Agriculture Fields of Uttarakhand, India.
- Ni, N., T. Sanglivi, et al. (2002). "Solubilization and preformulation of carbendazim." *International Journal of Pharmaceutics* 244(1-2): 99-104.
- Nufarm (2015).
["http://www.nufarm.com/assets/28213/1/HojaTcnicaCarbendazim50Nufarm.pdf"](http://www.nufarm.com/assets/28213/1/HojaTcnicaCarbendazim50Nufarm.pdf)
 2015."
- Olivati, C. A., A. Riul Jr, et al. (2009). "Detection of phenolic compounds using impedance spectroscopy measurements." *Bioprocess and biosystems engineering* 32(1): 41-46.
- Oliveira Jr, O. N., F. J. Pavinatto, et al. (2012). "Information visualization to enhance sensitivity and selectivity in biosensing." *Biointerphases* 7(1): 53.
- Otto, A., A. Bruckbauer, et al. (2003). "On the chloride activation in SERS and single molecule SERS." *Journal of Molecular Structure* 661: 501-514.
- Otto, M. and J. Thomas (1985). "Model studies on multiple channel analysis of free magnesium, calcium, sodium, and potassium at physiological concentration levels with ion-selective electrodes." *Analytical Chemistry* 57(13): 2647-2651.
- Palanikumar, L., A. K. Kumaraguru, et al. (2014). "Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*." *International Journal of Environmental Science and Technology* 11(3): 765-774.
- Paul C. Cross, E. B. W., Jr., J. C. Decius (1955). *Molecular Vibrations: The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra* New York : McGraw-Hill.
- Paulovich, F. V., C. T. Silva, et al. (2010). "Two-phase mapping for projecting massive data sets." *Visualization and Computer Graphics, IEEE Transactions on* 16(6): 1281-1290.
- Paulovich, F. V., M. L. Moraes, et al. (2011). "Information visualization techniques for sensing and biosensing." *Analyst* 136(7): 1344-1350.
- Perinoto, A. C., R. M. Maki, et al. (2010). "Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease." *Analytical Chemistry* 82(23): 9763-9768.
- Pillai, Zeena S.; Kamat, Prashant V. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method?. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 3, p. 945-951, 2004.
- Raposo, M. and O. N. Oliveira (1998). "Adsorption mechanisms in layer-by-layer films." *Brazilian Journal of Physics* 28(4): 392-404.
- Riul Jr, A., C. A. Dantas, et al. (2010). "Recent advances in electronic tongues." *Analyst* 135(10): 2481-2495.
- Riul, A., A. G. Soto, et al. (2003). "An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline." *Synthetic Metals* 132(2): 109-116.

- Riul, A., A. M. G. Soto, et al. (2003). "An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline." *Synthetic Metals* 132(2): 109-116.
- Riul, A., D. S. dos Santos, et al. (2002). "Artificial taste sensor: Efficient combination of sensors made from Langmuir-Blodgett films of conducting polymers and a ruthenium complex and self-assembled films of an azobenzene-containing polymer." *Langmuir* 18(1): 239-245.
- Rivas, L., A. Murza, et al. (2001). "Adsorption of acridine drugs on silver: surface-enhanced resonance Raman evidence of the existence of different adsorption sites." *Vibrational Spectroscopy* 25(1): 19-28.
- Rubira, R. J. G., S. A. Camacho, et al. (2014). "Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization." *Colloid and Polymer Science* 292(11): 2811-2820.
- Rubira, R. J., Camacho, S. A., Aoki, P. H., Maximino, M. D., Alessio, P., Martin, C. S., ... & Constantino, C. J. (2014). Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization. *Colloid and Polymer Science*, 292(11), 2811-2820.
- SALA, O. (1996). *FUNDAMENTOS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN E NO INFRAVERMELHO*, Editora Unesp.
- Sallum, L. F., F. L. Felipe Soares, et al. (2014). "Optimization of SERS scattering by Ag-NPs-coated filter paper for quantification of nicotinamide in a cosmetic formulation." *Talanta* 118: 353-358.
- Sardo, M., C. Ruano, et al. (2009). "Surface-enhanced Raman scattering of 5-fluorouracil adsorbed on silver nanostructures." *Physical Chemistry Chemical Physics* 11(34): 7437-7443.
- Saute, B., R. Premasiri, et al. (2012). "Gold nanorods as surface enhanced Raman spectroscopy substrates for sensitive and selective detection of ultra-low levels of dithiocarbamate pesticides." *Analyst* 137(21): 5082-5087.
- Scampicchio, M., S. Benedetti, et al. (2006). "Amperometric electronic tongue for the evaluation of the tea astringency." *Electroanalysis* 18(17): 1643-1648.
- Schlücker, S. (2010). *Surface Enhanced Raman Spectroscopy, Analytical, Biophysical and Life Science Applications*. Germany, WILEY-VCH
- Schneider, S., H. Grau, et al. (1993). "KINETIC EFFECTS IN SURFACE-ENHANCED RAMAN-SPECTROSCOPY - DOES IT HAVE POTENTIAL AS AN ANALYTICAL TOOL." *Analyst* 118(6): 689-694.
- Shafer-Peltier, K. E., C. L. Haynes, et al. (2003). "Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering." *Journal of the American Chemical Society* 125(2): 588-593.
- Sigma-Aldrich "Material Safety Data Sheet."
- Singer, S. (1977). The fluid mosaic model of membrane structure. *Structure of biological membranes*, Springer: 443-461.
- Siqueira, J. R., L. Caseli, et al. (2010). "Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing." *Biosensors and Bioelectronics* 25(6): 1254-1263.
- SKOOG, D. A. H., F. J.; CROUCH, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Brooks/Cole.
- Soto, J., D. J. Fernandez, et al. (2002). "Surface orientation of pyrazine adsorbed on silver from the surface-enhanced Raman scattering recorded at different electrode potentials." *Langmuir* 18(8): 3100-3104.
- Steck, E. A., F. C. Nachod, et al. (1948). "ABSORPTION SPECTRA OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS .3. SOME BENZIMIDAZOLE

- DERIVATIVES." *Journal of the American Chemical Society* 70(10): 3406-3410.
- Tang, L., S. Li, et al. (2015). "SERS-active Au@Ag nanorod dimers for ultrasensitive dopamine detection." *Biosensors & bioelectronics* 71: 7-12.
- Tejada, E., R. Minghim, et al. (2003). "On improved projection techniques to support visual exploration of multi-dimensional data sets." *Information Visualization* 2(4): 218-231.
- Tolaieb, B., C. J. L. Constantino, et al. (2004). "Surface-enhanced resonance Raman scattering as an analytical tool for single molecule detection." *Analyst* 129(4): 337-341.
- Umemura, J., Kawai, T., Takenaka, T., Kodama, M., Ogawa, Y., & Seki, S. (1984). Fourier transform infrared study on the phase transitions of a water-dioctadecyldimethylammonium chloride system. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 112(3-4), 293-309.
- Umemura, J., Kawai, T., Takenaka, T., Kodama, M., Ogawa, Y., & Seki, S. (1984). Fourier transform infrared study on the phase transitions of a water-dioctadecyldimethylammonium chloride system. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 112(3-4), 293-309.
- Venancio, E. C., N. Consolin Filho, et al. (2005). "Studies on the interaction between humic substances and conducting polymers for sensor application." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(1): 24-30.
- Vlasov, Y., A. Legin, et al. (1997). "Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions." *Sensors and Actuators B: Chemical* 44(1): 532-537.
- Volpati, D., P. Alessio, et al. (2008). "Exploiting distinct molecular architectures of ultrathin films made with iron phthalocyanine for sensing." *The Journal of Physical Chemistry B* 112(48): 15275-15282.
- Wu, F. G., Wang, N. N., & Yu, Z. W. (2009). Nonsynchronous change in the head and tail of dioctadecyldimethylammonium bromide molecules during the liquid crystalline to coagel phase transformation process. *Langmuir*, 25(23), 13394-13401.
- Wu, F. G., Yu, Z. W., & Ji, G. (2011). Formation and transformation of the subgel phase in dioctadecyldimethylammonium bromide aqueous dispersions. *Langmuir*, 27(6), 2349-2356.
- Yoshida, C. M., T. B. Freedman, et al. (1975). "RESONANCE RAMAN STUDY OF COBALT(II) - IMIDAZOLE COMPLEXES AS MODELS FOR METALLOPROTEINS." *Journal of the American Chemical Society* 97(5): 1028-1032.
- Yu, G., Q. Guo, et al. (2009). "Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats." *Toxicology and Industrial Health* 25(1): 41-47.
- Zaretsky, M. C., L. Mouayad, et al. (1988). "Continuum properties from interdigital electrode dielectrometry." *Electrical Insulation, IEEE Transactions on* 23(6): 897-917.