



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

SERS: CONCEITOS BÁSICOS E APLICAÇÕES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Ana Paula Langaro¹; Kamylla Balbuena Michelutti¹; Michele Aparecida dos Santos Nobrega¹

¹Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados-MS.

RESUMO

As diferentes técnicas de espectroscopia são ferramentas para o auxílio na caracterização dos mais diversos tipos de materiais. Dentro da espectroscopia vibracional, existem três técnicas que apresentam maior destaque, sendo elas: Espectroscopia no Infravermelho, Raman e SERS. Esta última é considerada nova e seus dados podem complementar os dados das demais técnicas vibracionais. Neste trabalho é apresentada a técnica SERS e algumas aplicações em sistemas biológicos. Com o conhecimento desta técnica surge uma nova possibilidade de detectar traços muito sutis de determinados compostos, podendo a rugosidade do eletrodo aumentar a superfície de contato com a amostra e a adsorção, amplificando o sinal na ordem de milhões de vezes, permitindo a detecção e análise de uma molécula apenas, portanto os mais singelos traços de impureza na água, por exemplo podem ser detectados.

Palavras-chave: Sensibilidade de detecção, Nanoestruturas metálicas, Raman.

INTRODUÇÃO

Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) é uma técnica, descoberta nos anos setenta que consiste em um aumento no sinal do espalhamento inelástico, por meio de moléculas na presença de uma nanoestrutura rugosa de metal (GARCÍA-RAMOS & SÁNCHEZ-CORTÉS, 2006). A amplificação do sinal Raman foi percebida por Fleischmann et al. (1974), analisando a piridina em eletrodos de prata. Através da aplicação de vários ciclos de óxido-redução em um eletrodo, os autores pensaram em aumentar a área superficial eletroquimicamente, permitindo a adsorção de um número maior de moléculas (FARIA, 1999; RU & ETCHEGOIN, 2009). O sinal/ruído observado no espectro da piridina foi excelente, e em 1974 este efeito era justificado pelo aumento da superfície de contato, mas em

1977, foi descoberto que o fator de aumento era na ordem de 10^6 , enquanto que o aumento da área era de duas ordens de grandezas (RU & ETCHEGOIN, 2009).

De acordo com Faria et al. (1998), existem dois modelos principais que explicam o mecanismo responsável pelo aparecimento do efeito SERS: o eletromagnético e o molecular, sendo que, pode-se considerar que a intensidade da radiação espalhada é proporcional ao quadrado do momento de dipolo induzido na molécula espalhadora pela radiação incidente, por outro lado, esse momento de dipolo induzido pode ser escrito como o produto da polarizabilidade molecular pelo campo elétrico da radiação incidente. A teoria do aumento eletromagnético depende das características da superfície utilizada, enquanto a teoria do aumento químico envolve as mudanças que ocorrem quando o analito é absorvido (RU & ETCHEGOIN, 2009).

O desenvolvimento de substratos em SERS continua sendo uma área ativa de pesquisa, com inúmeras publicações dedicadas às descrições de novos substratos bem como com as investigações de substratos convencionais (LYON et al., 1998). De acordo com Faria et al. (1998) os substratos mais empregados são colóides, eletrodos e filmes depositados a vácuo sendo que os dois primeiros oferecem o atrativo de serem facilmente preparados sem equipamentos adicionais e o último, é uma superfície quimicamente limpa e pode ser gerada com alto grau de reprodutibilidade.

Uma vez que a SERS tem o efeito de aumentar os sinais de dispersão de Raman por várias ordens de magnitude, é reconhecida como uma técnica sensível para a detecção da adsorção de moléculas em superfícies metálicas (WANG et al., 2013; HOLLER et al., 2009). Sendo, assim está intimamente relacionada às propriedades e morfologia das superfícies de metal utilizadas para esta técnica.

A utilização do efeito Raman em condições normais não apresenta sensibilidade suficiente para a investigação de monocamadas (FARIA et al., 1998). Devido a probabilidade de ocorrência do espalhamento Raman ser muito menor do que o do espalhamento elástico, seu sinal é fraco. Assim a descoberta do SERS, apresenta a potencialidade de compensar esta baixa intensidade, representando um grande avanço na pesquisa de materiais, a posteriori foi evidenciado que esta técnica não apenas amplifica o sinal do espalhamento, como também pode vir a inibir a luminescência gerada por alguns materiais, como a luminescência geralmente é muito mais intensa que o sinal Raman, pode suprimir todo o sinal (RU & ETCHEGOIN, 2009).

Deste modo, as técnicas de espectroscopia podem ser complementares, visto que cada uma pode fornecer uma informação de embasamento e complemento para as demais. Assim,

são evidenciados os avanços nesta área e a interação complementar entre elas. Neste âmbito, este trabalho teve como objetivo realizar uma previa descrição da técnica Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) e apresentar algumas aplicações em sistemas biológicos.

SOBRE A TÉCNICA SERS

A observação do efeito SERS depende da existência adequada de rugosidade na superfície (FARIA et al., 1998). De acordo com Faria et al. (1998); Lyon et al. (1998); Aroca (2006); Sancı & Volkan (2009) mesmo que a técnica funcione com outros metais, o efeito é registrado com maior intensidade em ouro, prata e cobre, além do mais, estes metais possuem propriedades ópticas específicas que possibilitam a obtenção de ressonâncias na faixa do visível e do infravermelho.

As linhas do espectro Raman da molécula adsorvida na superfície são frequentemente intensificadas por um fator 10^3 a 10^6 (HOLLER et al., 2009). Uma vez que melhorias nessa ordem podem ser obtidas, SERS tornou-se uma ferramenta poderosa para estudos espectroscópicos de detecção, quantificação, estruturação e identificação de pequenas quantidades de amostras em pesquisas de materiais (AROCA, 2006; LYON et al., 1998).

Vários estudos envolvem a elaboração de superfícies que amplifiquem com maior eficiência o sinal. Hao et al. (2010) investigou a evolução dos filmes nanoestruturados de Ag e a relação entre as estruturas da película de Ag e do efeito SERS. Mir et al. (2012), através de microscopia eletrônica, analisou diferentes superfícies sintetizadas sob irradiação de microondas, que resultaram na formação da superfície do tipo nanoflores.

A técnica SERS oferece alto potencial para a obtenção de informações estruturais sobre quantidades extremamente pequenas de biomateriais e, ao mesmo tempo, disponibiliza provas de que a funcionalidade das biomoléculas é preservada na superfície (COTTON et al., 1991). Outra vantagem dessa técnica se deve a sua capacidade de ao interagir a substância com a superfície e suprimir a emissão fluorescente que eventualmente venha apresentar (FARIA et al., 1998).

De acordo com Ru & Etchegoin, (2009) o SERS gera uma resposta de ressonância do substrato, estes, ao contrário do Raman clássico, são dependentes do comprimento de onda de excitação, por isso, um substrato que aumente o sinal Raman em uma determinada faixa de comprimento de onda, pode não revelar as mesmas vantagens em outro, um substrato excitado erroneamente pode resultar em um sinal ineficiente.

O uso combinado do efeito Raman ressonante e do efeito SERS, resultou no efeito SERS (*Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*), o qual permite que espectros

possam ser obtidos em concentrações da ordem de nanomolar ou até menos, uma vez que os fatores de intensificação de cada técnica se somam (FARIA et al., 1998).

APLICAÇÕES DA TÉCNICA SERS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Alguns sistemas biológicos possuem baixa concentração da espécie de interesse (tipicamente de 10^{-4} mol.dm⁻³ a 10^{-5} mol.dm⁻³) e forte emissão fluorescente o que restringe o uso da espectroscopia Raman, porque a pequena seção de choque da técnica exige que amostras concentradas sejam utilizadas e faz com que a fluorescência apresentada sobreponha a intensidade do espalhamento (FARIA et al., 1998).

Em um trabalho desenvolvido por Wang et al. (2013) foi analisada a absorção de cafeína em Albumina de Soro Humano (HSA) e como resultado foi constatado que as mudanças na posição dos picos e a intensidade relativa dos espectros SERS da cafeína, podem ser explicadas pelo aparecimento de diferentes espécies adsorvidas ou pela reorientação da molécula em uma superfície da Ag como formas tautoméricas. A concentração de HSA é constante, e os espectros de SERS do complexo de cafeína apresentam uma alteração na intensidade dos picos, e se atribui essa mudança ao aumento gradual na concentração de cafeína (WANG et al, 2013).

Embora a identificação de células vivas e mortas seja facilmente realizada utilizando corantes fluorescentes, a abordagem adotada para este experimento é concebida para comprovar o conceito de utilização de SERS para identificação. Os espectros SERS de células vivas e mortas resultaram em diferença significativa entre células vivas demonstram muitos picos característicos para as paredes das células de levedura (CHRIMES et al., 2013).

A SERS também foi utilizada em leveduras e através de dois exemplos de células de leveduras com adição de nanopartículas, pode-se observar que células vivas isoladas apresentam nível de atividade diferente àquelas células vivas agrupadas, devido à modificação na estrutura química, o maior índice de atividade se deve ao maior gasto energético destas células quando comparadas com as agrupadas, que por trabalharem juntas, dispõem de um gasto energético menor, deste modo células isoladas são mais SERS “ativas” que as agrupadas (CHRIMES et al., 2013). Dois exemplos de células mortas B1(isoladas) e B2 (agrupadas), demonstram que a taxa de atividade diminuiu em ambos, porém apesar da exposição de tempo similar em B1, a atividade metabólica apresenta índice de atividade maior que B2 (CHRIMES et al., 2013).

Vogel et al. (1999) ao estudar substâncias húmicas perceberam que o sinal Raman foi suprimido pela forte fluorescência causada pela ampla absorção no visível, deste modo SERS

veio auxiliar nas análises, permitindo a visualização do espectro e por consequência, concluir sobre a geometria de adsorção da molécula sobre o substrato de metal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da técnica SERS é fundamental para estudos de sistemas de interesses biológicos além do aumento da sensibilidade, a interação com a superfície também promove a supressão de fluorescência, pois ela amplifica o sinal Raman pela interação da molécula com superfícies nanometricamente rugosas.

O SERS é dependente do comprimento de onda, enquanto o Raman pode ser feito tanto no visível quanto no infravermelho, essa é uma das limitações da técnica, bem como a difícil reprodutibilidade de alguns tipos de nanoestruturas.

Pela técnica SERS é possível detectar traços muito sutis de determinados compostos, podendo a rugosidade do eletrodo aumentar a superfície de contato com a amostra e a adsorção, amplificando o sinal na ordem de milhões de vezes, permitindo a detecção e análise de uma molécula apenas, portanto os mais singelos traços de impureza na água, por exemplo podem ser detectados.

REFERÊNCIAS

AROCA, R. Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy, **John Wiley & Sons: Ltda, Chichester**, 2006.

COTTON, T. M.; KIM, J. H. CHUMANOV, G. D. Application of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy to Biological and Environmental Raman Systems. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 22, p. 729-742, 1991.

FARIA, D. L. A. DE; TEMPERINI, M. L. A.; SALA, O. Vinte anos de efeito SERS. **Química Nova**, vol. 22-4, 1999.

GARCÍA-RAMOS, J.V.; SÁNCHEZ-CORTÉS, S. Espectroscopía vibracional sobre nanoestructuras metálicas (SERS y SEIR): nuevos sustratos y aplicaciones. **Opt. Pura Apl.** v. 39(2), p.125-128, 2006.

HAO, J.; XU, Z.; HAN, M. J.; XU, S.; MENG, X. Surface-enhanced Raman scattering analysis of perchlorate using silver nanofilms deposited on copper foils. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 366, p. 163–169, 2010.

LYON, L. A.; KEATING C. D. A; FOX, P. B. E.; BAKER, H. L.; NICEWARNER, S. R.; MULVANEY, S. P. & NATAN, M. J.) Raman Spectroscopy. **Anal. chem.** v.70, p.341, 1998.

RU, E, L.; ETCHEGOIN, P. Principles of surface enhanced Raman Spectroscopy. **Oxford: Elsevier**, p. 1-663, 2009.

SANCI, R.; VOLKAN, M. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) studies on silver nanorod substrates. **Sensors and Actuators B**, p. 139-150, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre-RS: Bookman, ed.5, p. 566-595, 2002.

WANG, W.; ZHANG, W.; DUAN, Y.; JIANG, Y.; ZHANG, L.; ZHAO, B.; TU, P. Investigation of the binding sites and orientation of caffeine on human serum albumin by surface-enhanced Raman scattering and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.115, p. 57–63, 2013.

WUA, W.; WUA, M.; SUN, Z.; LI, G.; MAA, Y.; LIU, X.; WANG, X.; CHEN, X. Morphology controllable synthesis of silver nanoparticles: Optical properties study and SERS application. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 579, p. 117–123, 2013.

VOGEL, E.; GEBNER R.; HAYES, M.H.B.; KIEFER, W. Characterisation of humic acid by means of SERS. **Journal of Molecular Structure**. 482–483, p. 195–199, 1999.

CHRIMES, A. F.; KHOSHMANESH, K.; SHI-YANG, T.; WOOD, B. R.; STODDART, P. R.; COLLINS, S. S. E. ; MITCHELL, A.; KALANTAR-ZADEH, K. *In situ* SERS probing of nano-silver coated individual yeast cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, 15 November 2013, p. 536–541, 2013.