

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA**

Linus Pauling de Faria Peixoto

**Síntese e caracterização de nanobastões e nanobipirâmides de Au para aplicação
em biossensores plasmônicos**

Juiz de Fora

2015

Linus Pauling de Faria Peixoto

Síntese e caracterização de nanobastões e nanobipirâmides de Au para aplicação em biossensores plasmônicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Professor Doutor Gustavo Fernandes Souza Andrade

**Juiz de Fora
2015**

Dedico aos meus pais, Aparecida e Júlio e aos meus irmãos Aleksey e Lawrence por todo apoio incondicional e pela confiança depositada em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus porque sem ele nada seria possível.

Aos meus pais Júlio e Aparecida por todos ensinamentos de vida, pelo apoio incondicional, por dar todas as condições possíveis para que eu me dedicasse ao meus estudos. E principalmente por todo amor e carinho.

Aos meus irmãos Aleksey e Lawrence pelo carinho e amor, todo apoio e confiança.

À Gabriela, pela paciência nos momentos de estresse, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo companheirismo nos momentos de tristeza, pelo carinho e amor em todos outros momentos.

Ao meu orientador Prof. Gustavo F. S. Andrade pela oportunidade de desenvolver este trabalho entre outros, por todos ensinamentos, pelos incentivos, pela paciência e, principalmente, por toda amizade durante os bons anos de parceria.

À minha coorientadora Profa. Jacqueline Ferreira Leite Santos pela oportunidade de trabalharmos juntos, por todos ensinamentos passados, pela paciência, pelo carinho e por ter aberto as portas de seu laboratório para realização de experimentos.

Ao Prof. Antônio Carlos Sant'Ana pelos ensinamentos passados, pelo interesse em sempre ajudar e colaborar com meu aprendizado.

Aos meus colegas de estudo Raffaella e Pedro, sem vocês não teria nem entrado no mestrado.

À todos colegas e ex-colegas do departamento de Química e do ICE por ajudarem em minha formação.

Aos grandes amigos de laboratório Aline e Bruno pelos grandes momentos passados, pela ajuda nos momentos de necessidade e, principalmente, pela amizade durante toda nossa convivência.

Aos colegas e ex-colegas do LabNano: Dhieniffer, Tatiana, Flávia, Michelly, Caroline, Priscila, Pedro, Stefany, Paty BarSan, Hudson, Mariana, Erix, Ana Carolina, Tailine, Eduarda, Lucas, Frann, Andressa, Antônio Pedro, Rodrigo, Lara, Débora, Patrícia Lopes, Letícia, Nathalia, Luiz, Álvaro, Beatriz, e nossa querida agregada Tamires pela amizade, companheirismo e pela ajuda,

Ao Prof. Marcos José Leite Santos e todo grupo da Profa. Jacqueline pela ótima hospitalidade e por toda ajuda durante minha estadia em Porto Alegre.

À Fernanda por toda amizade e carinho ao longo de tantos anos e também por todas as soluções tampão.

Ao Prof. Renato Camargo Matos pelo fornecimento das soluções tampão.

Ao Prof. Luiz Fernando Cappa de Oliveira e seu grupo pela utilização de vários reagentes.

Aos pesquisados do INMETRO, Dra. Lídia Ágata Sena e Dr. Bráulio Soares Archanjo por todas as microscopias obtidas e pela oportunidade de utilizar o microscópio FEG-SEM FEI-Magellan.

À Profa. Fernanda Irene Bombonato e ao doutorando Mathias pela ajuda na síntese dos surfactantes.

À todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho ou para minha formação acadêmica.

À CAPES por todos os anos de bolsa de mestrado.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

“A melhor maneira de se ter uma boa ideia e ter várias ideias”

(Linus Pauling)

RESUMO

O presente trabalho visou a síntese e caracterização de nanopartículas de ouro (AuNPs) e sua aplicação na construção de biossensores plasmônicos utilizando para a detecção as técnicas de LSPR (ressonância de plasmon de superfície localizado) e SERS/SEF (espalhamento Raman intensificado por superfície / fluorescência intensificada por superfície). As AuNPs foram sintetizadas na forma de nanobastões (AuNRs) e nanobipirâmides (AuNBs) utilizando o método de crescimento por partículas precursoras (*seed*) e utilizando surfactantes para direcionamento do crescimento das mesmas. Devido ao melhor rendimento obtido para AuNRs, avaliou-se apenas sua sensibilidade em suspensão ou imobilizadas em lâminas de vidro. Para a imobilização em vidro, o 3-mercaptopropiltrimetoxisilano foi utilizado como molécula ligante entre o vidro e as AuNPs e posteriormente os substratos modificados foram caracterizados por espectroscopia UV-VIS, microscopia eletrônica de varredura e voltametria cíclica. A superfície dos AuNRs foi modificada para a detecção de duas biomoléculas-prova: (1) estreptavidina, realizada pelo mecanismo de interação por bioafinidade com a biotina, utilizando cisteamina como ligante entre as AuNPs e a biotina; (2) anti-BSA, através do mecanismo de interação antígeno-anticorpo, ativando a superfície das AuNPs (previamente modificada com ácido mercaptoundecanóico) com N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida e N-hidroxisuccinimida. A sensibilidade LSPR foi monitorada pelo deslocamento do máximo da banda do plasmon longitudinal dos AuNRs frente ao aumento do índice de refração local devido às modificações na superfície dos AuNRs, alcançando 297 nm RIU⁻¹. A detecção por SERS foi realizada através do modo extrínseco, utilizando um corante (IR-820) como molécula marcadora sobre a superfície dos AuNRs. Os biossensores construídos tiveram desempenho satisfatório na detecção de moléculas provas, além de boa sensibilidade frente a modificações no índice de refração do meio; isso foi observado tanto para AuNPs em suspensão ou imobilizadas em lâminas de vidro. Os procedimentos reportados são simples, rápidos e eficientes para a aplicação em biossensores. Adicionalmente, a integração das AuNPs em suspensão (modificadas com moléculas marcadoras) com as AuNPs imobilizadas nas lâminas de vidro, se mostrou um método interessante para a detecção de biomoléculas utilizando SERS/SEF.

Palavras-chave: Biossensores. Plasmônica. Nanopartículas. LSPR. SERS/SEF.

ABSTRACT

This work was focused on the synthesis and characterization of gold nanoparticles (AuNPs) for applying as LSPR (localized surface plasmon resonance) and SERS/SEF (surface enhanced Raman spectroscopy / surface enhanced fluorescence) based biosensors. AuNPs were synthesized in two different forms, nanorods (AuNRs) and nanobipyramids (AuNBs), controlling the growth of seeds by using surfactants. A better yield was obtained to AuNRs and therefore, only the sensitivity of these nanoparticles was evaluated either using the AuNRs in suspension or immobilized on glass slides. A monolayer of 3-mercaptopropylmetoxisilane was used as a linker between AuNPs and glass surface, and after the modified glass slides were characterized with UV-VIS spectroscopy, scanning electronic microscopy and cyclic voltammetry. AuNRs surface was modified aiming the detection of two probe molecules: (1) streptavidin allowed by the bioaffinity for biotin, using cysteamine as monolayer between AuNPs and biotin; (2) anti-BSA allowed by an antigen-antibody interaction activating the surface (previously modified with mercaptoundecanoic acid) with N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide and N-hydroxysuccinimide. The LSPR sensitivity was evaluated by monitoring shifts in the longitudinal plasmon mode of AuNRs with changes in local refractive index due to surface binding events, reaching 297 nm RIU⁻¹. SERS sensitivity was carried out in an extrinsic mode using a dye (IR-820) as SERS label on AuNRs surface. The biosensors developed in this work (AuNPs in suspension and adsorbed on glass slides) are efficient as biosensor as they presented good sensitivity for change in refractive index and for surface binding with probe molecules. The main advantages of these biosensors is the simple methodology summed to the short time of analysis. In addition, coupling the labeled AuNPs in suspension with the AuNPs adsorbed on glass slides is an interesting methodology for SERS/SEF detection of biomolecules.

Keywords: Biosensor. Plasmonic. Nanoparticle. LSPR. SERS/SEF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de detecção através de um biossensor	18
Figura 2: Métodos para manter a conservação do momento angular utilizando prismas.	20
Figura 3: Esquema dos tipos de plasmon	21
Figura 4: Intensificação do campo local próximo a superfície de nanoesferas de Ag ...	23
Figura 5: Exemplo de excitação do LSPR para nanoesferas	24
Figura 6: Exemplo de excitação do LSPR para nanobastões	24
Figura 7: Estudo da sensibilidade para AuNRs e AuNBs	26
Figura 8: Tipos de espalhamento.....	29
Figura 9: Gráfico do Q x comprimento de onda para vários metais.....	32
Figura 10: Esquema de funcionalização de um AuNR para a detecção de Estreptavidina por LSPR	41
Figura 11: Esquema de funcionalização de um AuNR para a detecção de anti-BSA por LSPR.....	42
Figura 12: Esquema de um imunoenensaio sanduíche para detecção SERS	43
Figura 13: Estrutura proposta para o CTBAB	44
Figura 14: RMN de ^1H do composto CTBAB em CDCl_3	45
Figura 15: Estrutura proposta para o CTPAB	46
Figura 16: RMN de ^1H do composto CTPAB em CDCl_3	46
Figura 17: Espectro de extinção para os AuNRs.....	48
Figura 18: Espectros de extinção de AuNRs preparados com e sem controle fino de temperatura, utilizando banho maria e banho termostático, respectivamente.	49
Figura 19: Espectro de extinção para os AuNBs.....	50
Figura 20: Microscopia eletrônica de Varredura para os AuNRs	51
Figura 21: Microscopia eletrônica dos AuNRs	52
Figura 22: :Microscopia eletrônica de Varredura para as AuNBs.....	53
Figura 23: Espectros de extinção dos AuNRs imobilizados sobre lâminas de vidro. Método (1).	55
Figura 24: Espectros de extinção dos AuNRs imobilizados sobre lâminas de vidro. Método (2).	56
Figura 25: Voltametria cíclica de 1 mmol L^{-1} de ferricianeto de potássio em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} , utilizando como eletrodo de trabalho um substrato de FTO	58
Figura 26: Espectros de extinção do Filme de AuNRs (5 camadas) imerso em soluções de glicose com diferentes índices de refração.	60
Figura 27: Gráfico analítico do deslocamento do máximo da banda LSPR em relação ao índice de refração.....	60
Figura 28: Espectros de extinção dos AuNRs em suspensão redispersos em soluções de THF com diferentes índices de refração.....	61
Figura 29: Espectro LSPR dos AuNRs com o excesso de CTAB e após três ciclos de centrifugação (8500 rpm e 30 min) e redispersão em água deionizada, para retirada do excesso de CTAB.	62
Figura 30: Detecção por LSPR de estreptavidina na superfície de AuNRs imobilizados em superfície de vidro.	64
Figura 31: Gráfico de barras do deslocamento de biotina e estreptavidina em relação aos AuNRs imobilizados sem modificações na superfície.	64
Figura 32: Espectros de extinção da região do plasmon longitudinal dos AuNRs imobilizados sobre vidro e da modificação da superfície dos AuNRs com MUA.....	66
Figura 33: Detecção de anti-BSA na superfície dos AuNRs imobilizados em vidro.....	67

Figura 34: Gráfico de barras do deslocamento de BSA e Anti-BSA em relação a superfície das AuNRS modificadas com MUA.....	68
Figura 35: Espectros LSPR das modificações na superfície dos AuNRs em suspensão até a imobilização de BSA.....	69
Figura 36: Gráfico de barras do deslocamento do máximo da banda LSPR para MUA e BSA em relação aos AuNRs sem modificações.....	69
Figura 37: Detecção de Anti-BSA na superfície de AuNRs em suspensão	70
Figura 38: Gráfico de barras do deslocamento de BSA e Anti-BSA em relação aos AuNRs sem modificação.....	71
Figura 39: Espectro Raman do IR-820 em solução (em preto) e Espectro SERS do IR-820 utilizando os AuNRs em suspensão (em azul), comprimento de onda de excitação do laser em 633nm.....	72
Figura 40: Espectro SEF de IR-820 adsorvido sobre os filmes de AuNRs imobilizados	73
Figura 41: Espectro SERS/SEF dos AuNRs em suspensão modificados com BSA e com a molécula repórter. Laser com excitação em 785nm	74
Figura 42: Espectros SERS/SEF dos substratos na presença e na ausência de Anti-BSA no substrato de vidro. Laser com excitação em 785nm.....	75
Figura 43: Gráfico de barras para o somatório da área dos espectros da Figura 42.	76
Figura 44: Mapeamento SEF de 25 pontos dos espectros mostrados na Figura 41.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tempo de análise para cada tipo de substrato e analito.....	78
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNPs	Nanopartículas de Au
AuNRs	Nanobastões de Au
AuNBs	Nanobipirâmides de Au
BSA	Albumina de Soro Bovino
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CTBAB	Brometo de cetiltributilamônio
CTPAB	Brometo de cetiltripropilamônio
ELISA	Análise de Enzima-Imuno-Adsorvida
EDC	N-etil N-(3 dietilaminopropil) carbodiimida
FOM	Figura de mérito
FTO	Óxido de estanho dopado com flúor
FWHM	Largura a meia altura
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IDH	Índice de desenvolvimento humano
SP	Plasmon de superfície
LSP	Plasmon de superfície localizado
SPR	Ressonância de plasmon de superfície
LSPR	Ressonância de plasmon de superfície localizado
MPTMS	3-mercaptopropiltrimetoxisilano
MUA	Ácido mercaptoundecanóico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NHS	N-hidroxisuccinimida
PEG-SH	Polietileno glicol-tiolado
PdC	Prova de conceito
PET	Politereftalato de etileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RIU	Unidade de índice de refração
SERS	Espalhamento Raman Intensificado por Superfície
SEF	Fluorescência intensificada por superfície
SAM	Camadas auto organizadas
THF	Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. NANOCIÊNCIA – NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	15
1.2. SENSORES	16
1.3. BIOSENSORES	17
1.4. BIOSENSORES PLASMÔNICOS	19
1.4.1. Materiais plasmônicos	19
1.4.2 Biossensores utilizando LSPR	21
1.4.3. Espectroscopia Raman	28
1.4.4. Biossensores SERS	30
1.5. FILMES METÁLICOS	33
1.6. POTENCIAL APLICAÇÃO DE BIOSSENSORES PLASMÔNICOS	34
2. OBJETIVOS	35
3. METODOLOGIA	36
3.1 MATERIAIS	36
3.2 SÍNTESE DOS SURFACTANTES	37
3.3. SÍNTESE DAS AUNPS	37
3.3.1. Nanobastões	37
3.3.2. Nanobipirâmides	37
3.4. CONSTRUÇÃO DE FILMES DE AUNPS SOBRE LÂMINAS DE VIDRO	38
3.5. ESTUDO DA SENSIBILIDADE.....	39
3.6. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	39
3.7. DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR LSPR.....	40
3.7.1. Biotina-Estreptavidina	40
3.7.2 Antígeno – Anticorpo: Detecção de anti-BSA	41
3.8. ATIVIDADE SERS.....	43
3.9. DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR SERS.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1. SÍNTESE DOS SURFACTANTES	44
4.1.1. CTBAB	44
4.1.2. CTPAB	46
4.2. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	47
4.2.1. Nanobastões de Au (AuNRs)	47
4.2.2. Nanobipirâmides de Au (AuNBs)	50
4.3. CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.	51
4.3.1. Nanobastões de Au (AuNRs)	51
4.3.2. Nanobipirâmides de Au	53
4.4. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DOS FILMES DE NANOBASTÕES DE OURO SOBRE LÂMINAS DE VIDRO	54
4.5. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS FILMES DE NANOBASTÕES DE OURO	57
4.6. ESTUDO DA SENSIBILIDADE.....	58
4.6.1. Filmes de AuNRs sobre lâminas de vidro	59
4.6.2. Suspensões coloidais de AuNRs	61
4.7. DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR LSPR.....	63
4.7.1. Biotina-Estreptavidina	63

4.7.2. Antígeno – Anticorpo: Detecção de anti-BSA	65
4.8. ATIVIDADE SERS.....	71
4.9. DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR SERS/SEF.....	73
4.10. TEMPO NECESSÁRIO PARA CADA DETECÇÃO.....	77
5. CONCLUSÕES	79
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	80
REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. NANOCIÊNCIA – NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanomaterial é qualquer estrutura que tenha ao menos uma de suas dimensões entre 1 e 100 nm. A cada dia a importância desses materiais para a ciência e tecnologia vem aumentando fortemente (CONDE et al., 2014). Nanociência é a ciência que envolve o design, síntese, caracterização e aplicação desses nanomateriais (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Hoje em dia é muito frequente o uso do termo nanotecnologia, e já é possível observar constantemente na literatura, a utilização de nanomateriais em diferentes áreas como na produção de medicamentos, cosméticos, catálise, geração de energia solar, diagnóstico e cura de doenças (SAHOO et al., 2007). Apesar das nanopartículas serem usadas desde os tempos antigos como um método para coloração de vidro, no exemplo da famosa taça de Lycurgus (FREESTONE et al., 2007); foi apenas com Faraday que as nanopartículas de ouro (AuNPs) tiveram maior atenção na ciência, caracterizando o nascimento da ciência moderna de coloides (FARADAY, 1857). Faraday estudou o comportamento da luz incidida em uma suspensão coloidal (sal de ouro reduzido utilizando fósforo) e observou que havia uma diferença entre a luz incidente e a luz refletida (EDWARDS; THOMAS, 2007). Deste então o interesse em tais partículas tem aumentado, novas metodologias foram desenvolvidas, Turkevich propôs um método de redução do sal de ouro utilizando citrato de sódio (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Algum tempo depois Frens aprimorou esse método, sintetizando AuNPs esféricas e com tamanho controlado através da variação da concentração de citrato utilizado (FRENS, 1973). Frens mostrou isso sintetizando vários tamanhos de esferas com diferentes concentrações de citrato: quanto maior a concentração de citrato, era menor o tamanho das esferas. O citrato de sódio também pode atuar como estabilizante, pois forma uma camada em volta das AuNPs, causando repulsão eletrostática, evitando a agregação.

Nos dias de hoje é possível obter AuNPs das mais diversas formas e ainda com controle de tamanho como: nanobastões (NIKOBAKHT; EL-SAYED, 2003), nanobipirâmides (KOU et al., 2007), *nanobranches* (CHEN et al., 2008), entre outros. Devido às suas propriedades Físico-Químicas particulares, as AuNPs têm sido bastante utilizadas recentemente para a construção de vários tipos de biossensores, principalmente baseados na ressonância de plasmon de superfície localizado (do inglês *localized surface plasmon resonance*, LSPR) (DORIA et al., 2012). O estudo da plasmônica se tornou uma poderosa

maneira de incorporar a óptica na nanociência e na nanotecnologia (MURRAY; BARNES, 2007).

As AuNPs, possuem a razão superfície/volume muito grande, isso implica em uma enorme reatividade, podendo ser utilizadas para várias propriedades catalíticas. Devido ao bloqueio de Coulomb podem ser aplicadas como transistores, comutadores, eletrômetros e sensores (LI; ZHAO; ASTRUC, 2014). O desenvolvimento de sensores biológicos bastante sensíveis e seletivos para o monitoramento de biomarcadores de doenças é uma grande motivação para a pesquisa em nanociência (HAES et al., 2005).

1.2. SENSORES

O sensor é um dispositivo que mede ou detecta uma informação, convertendo-a em um sinal que pode ser lido ou observado por um instrumento (KRESS-ROGERS, 1997). Por exemplo, o termômetro de mercúrio é um dos sensores mais comumente utilizados e funciona convertendo o calor (temperatura) em expansão e contração do líquido, registrando a resposta em um tubo de vidro graduado.

Sensores são constituídos basicamente por duas partes muito importantes, o receptor e o transdutor:

- Receptor: é a parte onde a informação é transformada em forma de energia para que possa ser medida pelo transdutor. Podendo ser seletivo.

-Transdutor: é a parte que transforma a energia contendo a informação da amostra em um sinal analítico mensurável.

Sensores químicos são aqueles em que a informação dada pela amostra é uma informação química, diferente do termômetro onde a informação é uma propriedade física do sistema, chamado de um sensor físico. Os sensores químicos podem ser classificados de acordo com o tipo de transformação da informação química em sinal analítico, ou seja, pelo princípio de operação do transdutor em: (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991).

Sensores óticos: a informação é transformada em sinal analítico por um fenômeno óptico, e são divididos de acordo com a propriedade óptica utilizada como absorção, reflexão, luminescência, fluorescência, índice de refração, ou espalhamento de luz;

Sensores eletroquímicos: a informação é transformada em sinal analítico pela interação eletroquímica entre o analito e um eletrodo. Também são divididos em subgrupos de acordo com a técnica utilizada como: sensores voltamétricos, potenciométricos ou amperométricos.

Sensores elétricos: o sinal analítico é dado por mudanças nas propriedades elétricas causadas pela interação com o analito. Podem ser sensores de semicondutores de óxidos metálicos, semicondutores orgânicos, sensores utilizando de condutividade eletrolítica e de permissividade elétrica.

Sensores de massa: o sinal analítico é dado pela diferença de massa que causa a modificação na propriedade de um material suporte. São os sensores piezelétricos e sensores de ondas acústicas de superfície.

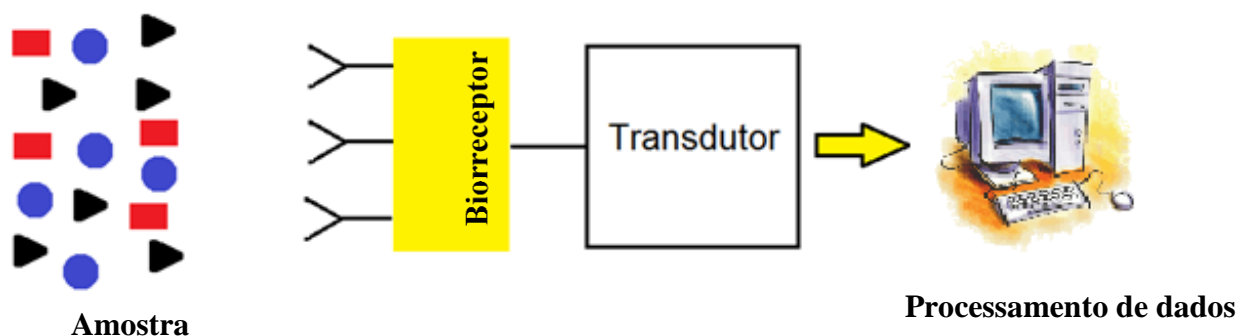
Existem ainda várias outras classificações, como sensores magnéticos e termométricos. Além disso, podem ser classificados de acordo com a aplicação ou o analito a ser determinado, como sensores de pH, íons metálicos, para determinação de oxigênio entre outros gases. (HULANICKI et al., 1991).

1.3. BIOSSENSORES

O primeiro a definir os conceitos sobre biossensores foi Leyland C. Clark em 1962, em sua descrição sobre um eletrodo de enzima. Baseado no eletrodo de oxigênio, sua antiga invenção, Clark argumentou que a detecção eletroquímica de oxigênio ou peróxido de hidrogênio poderia servir como base para instrumentos bioanalíticos, utilizando da imobilização de enzimas apropriadas. Um exemplo clássico é o biossensor para detecção de glicose em amostras humanas de pessoas com diabetes, que utiliza a imobilização da enzima glicose oxidase, e que permite a conversão de um simples eletrodo de platina em uma poderosa ferramenta analítica (TURNER, 2013).

Os biossensores são sensores muito parecidos com sensores químicos, porém em seu receptor são utilizados elementos biológicos, chamados bioreceptor. Um bioreceptor pode ser um microrganismo, organela, enzima, célula, anticorpo, ácido nucleico entre outros. (VELUSAMY et al., 2010). Na Figura 1 temos um esquema simples de um processo de detecção por um biossensor, o bioreceptor reconhece o analito dentro da matriz da amostra gerando um sinal biológico, este sinal é então transformado em um sinal analítico mensurável pelo transdutor e assim o sinal é processado.

Figura 1: Esquema de detecção através de um biossensor



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Biossensores são de grande importância para diferentes áreas científicas, como diagnósticos clínicos, biomedicina, detecção de drogas ilícitas, análise ambiental, indústria farmacêutica, qualidade e segurança alimentar. (CAO; SUN; GRATTAN, 2014; PÉREZ-LÓPEZ; MERKOÇI, 2011). Devido a esse fato, o estudo e desenvolvimento de biossensores para a detecção de compostos químicos tem atraído o interesse de pesquisadores de várias áreas como a química, física, ciência dos materiais e biologia (HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999). Hoje em dia, a utilização de biossensores tem uma série de vantagens sobre métodos convencionais como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) e Análise de Enzima-Imuno-Adsorvida (ELISA, do inglês *enzyme-linked-immunosorbent assay*). Biossensores requerem menor para análises, muitos estão em tamanhos miniaturizados e utilizam instrumentação menor; sendo fáceis de manusear e portáteis, aumentam a facilidade de análises de campo e, dependendo da técnica utilizada, ainda podem ser de baixo custo.

Dentro desse contexto essas características dos biossensores são importantes para novos cuidados com a saúde, tratamentos clínicos e diagnósticos em tempo real, principalmente em países em desenvolvimento. A biomedicina necessita atualmente desses dispositivos miniaturizados e automatizados. Nos últimos anos as pesquisas em biossensores plasmônicos têm evoluído significativamente (BROLO, 2012). A variedade de sensores e diferentes sistemas de detecção indicam que biossensores plasmônicos podem ser a solução para uma grande gama de problemas bioquímicos e biomédicos. As aplicações podem variar desde a detecção de sistemas proteína – proteína até a detecção de fragmentos de DNA na concentração de attomolar (FERREIRA et al., 2009).

1.4. BIOSENSORES PLASMÔNICOS

1.4.1. Materiais plasmônicos

Materiais plasmônicos são tipicamente metais, que apresentam condução elétrica e alta refletividade óptica. Porém, há alguns anos surgiu também o interesse na parte óptica, além da natureza reflexiva dos metais. Do ponto de vista eletromagnético, o metal é um plasma de estado sólido, consistindo na mobilidade dos elétrons do metal (elétrons de condução) em um fundo fixo de íons positivos. O estudo das oscilações coletivas desse plasma e sua excitação óptica se chamou plasmônica (MURRAY; BARNES, 2007).

A excitação coletiva dos elétrons da superfície de um material metálico é chamada de plasmon de superfície (SP, do inglês *Surface Plasmon*). A ressonância ocorre para comprimentos de onda de excitação em que modos de oscilação dos elétrons de superfície coincidem com a radiação eletromagnética incidente (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). A energia e o momento total do sistema (luz + metal) devem ser conservados para que haja a excitação de SP. Na equação 1 temos a dispersão de um plasmon de superfície em um filme plano:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_{eff}} \quad (1)$$

Onde k_x é o vetor de onda do campo eletromagnético propagante paralelo a superfície, ω é a frequência angular e c a velocidade da luz. ε_{eff} é a constante dielétrica efetiva, mostrada na equação 2

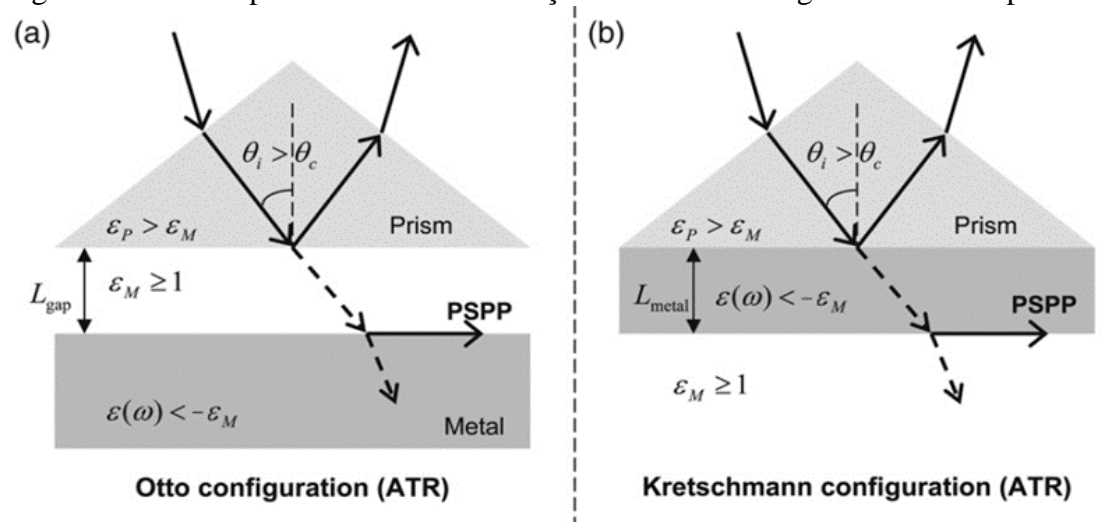
$$\varepsilon_{eff} = \frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m} \quad (2)$$

ε_d e ε_m são as constantes dielétricas do meio adjacente ao metal e do metal respectivamente. Essas equações nos mostram que a constante dielétrica do meio adjacente ao metal afeta as condições da ressonância do plasmon de superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*). As propriedades dielétricas do meio são fortemente modificadas na presença de um adsorbato. Essa característica é a principal contribuição para a aplicação do SPR para sensoriamento (BROLO, 2008).

No final da década de 1960, Kretschmann (KRETSCHMANN; RAETHER, 1968) e Otto (OTTO, 1968) resolveram independentemente, de maneiras diferentes, o famoso problema eletromagnético, que consistia no fato da excitação SP por luz não ocorrer devido à não conservação do momento no processo. O momento do SP é maior que o momento do fóton

de energia excitante, e a maneira de resolver o problema é aumentando o momento da luz. Os dois métodos envolvem a utilização de prismas, como mostrado Figura 2. O método de Otto, aprimorado por Krestschmann, utiliza a reflexão total da luz incidente, quando essa sofre reflexão total pelo prisma a mesma cria uma onda evanescente na interface do prisma e esta onda permite a excitação de um plasmon na interface metal/dielétrico com um momento maior do que o permitido pelo fóton propagante. A metodologia torna possível variar tanto o ângulo de incidência como o comprimento de onda de excitação para realizar a excitação de SP. O método de Otto possuía uma grande dificuldade, pois utilizava um gap de ar entre a superfície metálica e o prisma para a propagação da onda evanescente; porém, o controle da espessura da camada de ar era muito difícil. Krestschmann utilizou o próprio filme metálico para propagação da onda evanescente. Esse método se mostrou vantajoso porque o controle sobre a espessura de filmes metálicos é muito maior do que o controle sobre a separação entre partes do substrato e, sendo assim, a configuração de Krestschmann se tornou a mais utilizada pelos interessados no SPR (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Além dos métodos de Otto e Krestschmann, existem outros métodos para resolver o problema eletromagnético como a utilização de estruturas periódicas como superfícies rugosas, grades, nanoburacos (ESCOBEDO et al., 2013; MENEZES et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012). Desde então os SP são amplamente estudados para várias aplicações.

Figura 2: Métodos para manter a conservação do momento angular utilizando prismas.



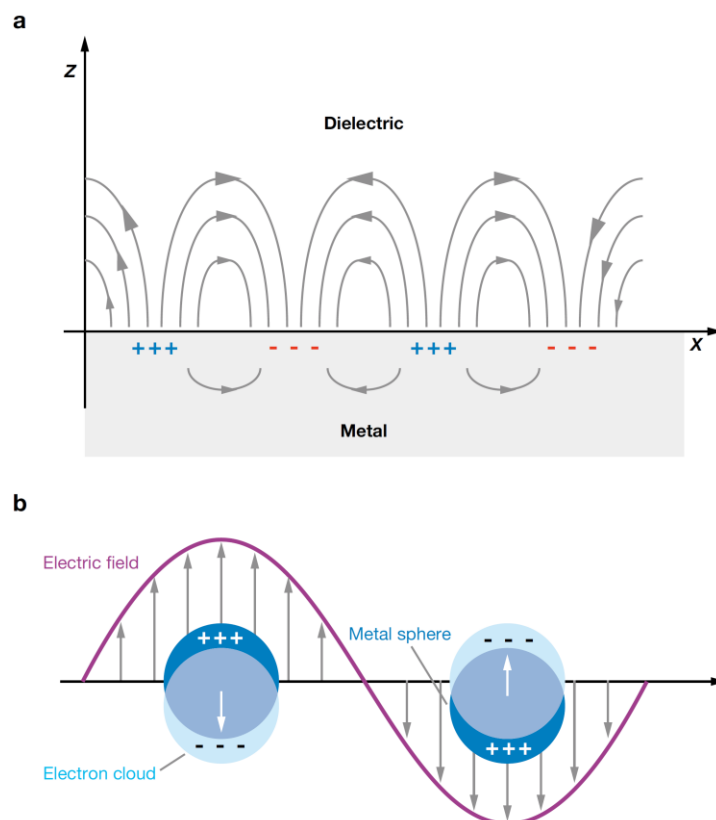
(a) Configuração de Otto e (b) Configuração de Krestschmann

Fonte: LE RU; ETCHEGOIN, 2009

1.4.2 Biossensores utilizando LSPR

O SP pode ser localizado, ou seja, plasmons de superfície localizados (LSP, do inglês *Localized Surface Plasmon*), quando se tem objetos metálicos com dimensões comparáveis ou menores que o comprimento de onda. O interessante é que nesse caso o vetor de onda, k , se torna irrelevante devido ao fato de que nessas dimensões o campo elétrico pode ser considerado homogêneo em toda a nanoestrutura (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Na Figura 3 pode-se observar a diferença entre os diferentes modos de SPs e LSPs. A Figura 3A ilustra o plasmon de superfície estendido. Os SPs se propagam nas direções x e y na interface do metal e do dielétrico, essas distâncias de propagação em x e y podem chegar a mais de 100 microns. No entanto na direção z há um decaimento evanescente e as distâncias de propagação nesse eixo são no máximo de aproximadamente 200 nm. Na Figura 3B tem-se os LSPs, onde é mostrado o dipolo elétrico gerado devido a nuvem eletrônica que oscila na direção oposta ao vetor do campo elétrico da radiação eletromagnética incidente. A frequência desta oscilação corresponde ao LSPR (WILLETS; VAN DUYNE, 2007).

Figura 3: Esquema dos tipos de plasmon



(a) Plasmon de superfície (b) Plasmon de superfície Localizado

Fonte: WILLETS; VAN DUYNE, 2007

O uso do LSPR como ferramenta de sensoriamento está ligado à dependência da posição da banda de ressonância com o índice de refração do meio dielétrico no qual as nanopartículas estão imersas; essa variação do índice de refração causa mudanças no comprimento de onda de máximo e na intensidade da banda LSPR (STEWART *et al.*, 2008).

É possível relacionar a frequência da banda LSPR com a constante dielétrica do meio. A partir do modelo de Drude para a estrutura eletrônica dos metais, temos que:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} \quad (3)$$

Onde ω_p é a frequência do plasma e γ o parâmetro de amortecimento, ambos para o metal bulk. Em frequências na região do visível e do infravermelho próximo, $\gamma \ll \omega_p$, pode-se então simplificar a equação 3 para (MAYER; HAFNER, 2011):

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (4)$$

Por outro lado, o campo elétrico dentro de uma esfera metálica é proporcional ao campo elétrico incidente (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

$$E_{in} = \frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} E_0 \quad (5)$$

Onde E_{in} é o campo elétrico dentro da esfera e E_0 é o campo elétrico incidente. Desta equação podemos chegar a uma condição de ressonância para este sistema, onde o maior valor de E_{in} será quando $\varepsilon(\omega) \approx -2\varepsilon_m$. Voltando a equação 4 e utilizando desta condição de ressonância temos que:

$$\omega_{max} = \frac{\omega_p}{\sqrt{2\varepsilon_m + 1}} \quad (6)$$

ω_{max} é a frequência da banda LSPR, podemos convertê-la em comprimento de onda utilizando a relação $\lambda = 2\pi c/\omega$. A constante dielétrica está relacionada com o índice de refração $\varepsilon_m = n^2$, substituindo essas duas relações na equação 6 (MAYER; HAFNER, 2011):

$$\lambda_{max} = \lambda_p \sqrt{2n_m^2 + 1} \quad (7)$$

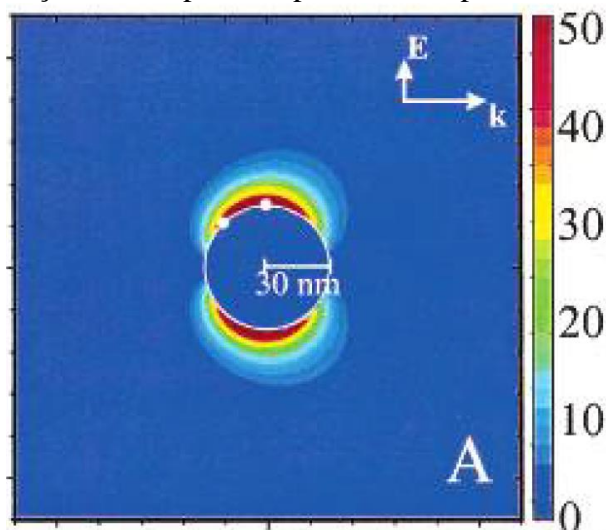
Onde λ_{max} é o comprimento de onda do LSPR e λ_p é o comprimento de onda correspondente ao plasma do metal bulk e n_m é o índice de refração do meio.

A espectroscopia utilizando SPR ainda domina a instrumentação comercial, porém a espectroscopia LSPR oferece várias vantagens para sensoriamento, permitindo vários

benefícios adicionais, como a utilização de nanopartículas de tamanhos e formas variados, facilidade de transporte, miniaturização e menores custos (HAES, A.; VAN DUYNÉ, 2004). Além disso, a LSPR abre a possibilidade de utilizar espectroscopias intensificadas por superfície.

A ressonância entre a radiação incidente e o LSP resulta em uma grande intensificação do campo eletromagnético próximo à superfície das nanopartículas, ou campo elétrico local. Essa intensificação do campo local permite a ocorrência de fenômenos espectroscópicos intensificados por superfície, como o efeito de espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS, do inglês *surface enhanced Raman scattering*) e a fluorescência intensificada por superfície (SEF, do inglês *surface enhanced fluorescence*) (AROCA, 2006). Na Figura 4 podemos observar uma ilustração do resultado de um cálculo teórico sobre o campo elétrico local na superfície de uma nanoesfera excitada na LSPR, com as configurações da radiação excitante como indicado. A região em vermelho escuro mostra uma intensificação de até 50 vezes do campo local em relação ao elétrico incidente. É possível observar também que essa intensificação decai bruscamente com a distância em relação à superfície, mostrando que este é um fenômeno que acontece muito próximo da superfície (KELLY et al., 2002).

Figura 4: Intensificação do campo local próximo a superfície de nanoesferas de Ag

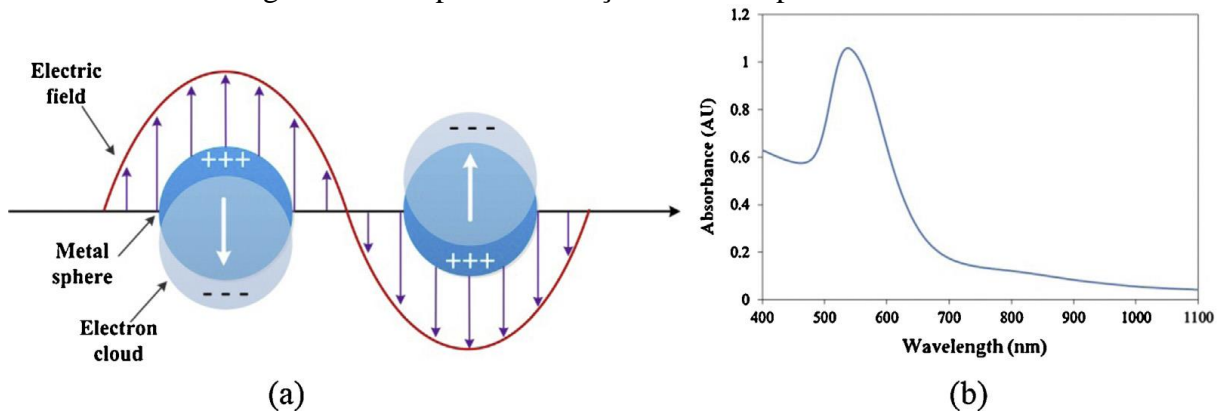


Fonte: KELLY et al., 2002

O LSPR pode ser visto em diferentes nanoestruturas, porém para alguns metais como Au, Ag e Cu, metais de cunhagem, o LSPR é visto como uma banda de absorção e espalhamento (comumente absorção + espalhamento é chamado de extinção) na região espectral do visível-infravermelho próximo. Nas Figura 5 e Figura 6 são mostradas as excitações LSPR e os espectros de extinção característicos de nanoesferas e de nanobastões de

Au (CAO et al., 2014). Para nanoestruturas esféricas apenas uma banda de extinção é observada, porém para nanobastões são observadas duas bandas de extinção relativas às oscilações dos elétrons ao longo dos dois eixos dos nanobastões, são as bandas do plasmon longitudinal e do plasmon transversal. O espalhamento de luz característico de micro/nanoestruturas é chamado de efeito Tyndall ou Rayleigh, dependendo do tamanho das partículas envolvidas (EDWARDS; THOMAS, 2007).

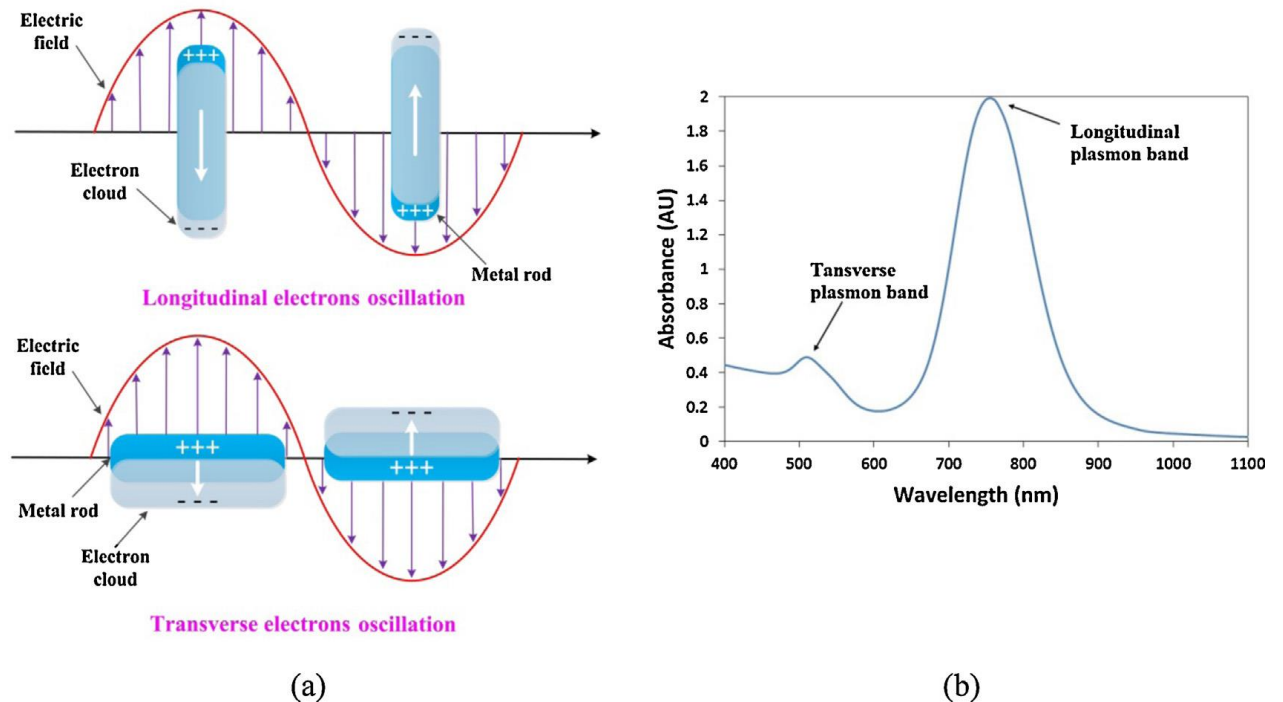
Figura 5: Exemplo de excitação do LSPR para nanoesferas



(a) Excitação do LSPR para uma esfera metálica (b) Espectro de extinção característico de nanoesferas.

Fonte: CAO, SUN E GRATTAN, 2014

Figura 6: Exemplo de excitação do LSPR para nanobastões



(a) Excitação do LSPR para nanobastões metálicos (b) Espectro de extinção característico para nanobastões.

Fonte: CAO, SUN E GRATTAN, 2014

As propriedades do LSPR estão diretamente ligadas ao tamanho e à forma das nanoestruturas, devido às mudanças da polarizabilidade da superfície causadas por essas propriedades. Há várias formas de nanoestruturas que podem ser obtidas a partir de métodos avançados de preparação, variando desde nanoesferas, que são as nanoestruturas de preparação mais simples, até outras mais complexas como *nanobranched*, nanobipirâmides, nanobastões, *nanoshells* entre outros (CHEN et al., 2008). A variação do tamanho ou da forma das nanoestruturas causa o deslocamento da banda LSPR no espectro de extinção, enquanto o aumento da simetria das nanoestruturas pode causar o aumento da intensidade, pois nanoestruturas de mesma simetria e tamanho possuem bandas LSPR muito semelhantes, aumentando então a intensidade média. Além disso, a menor distribuição de tamanho das nanoestruturas diminui a largura da banda LSPR (PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

Do ponto de vista analítico, o LSPR pode ser utilizado para detectar a captura de biomoléculas, já que a variação da banda LSPR depende da concentração do analito na superfície do sensor e também das propriedades da molécula a ser detectada, uma vez que esses afetem o índice de refração da região próxima à superfície da nanopartícula plasmônica. A mudança no índice de refração para uma camada de analito adsorvida pode ser expressa segundo a equação 8: (HOMOLA, 2008).

$$\Delta n = \left(\frac{dn}{dc} \right) \frac{\Gamma}{h} \quad (8)$$

Onde (dn/dc) é o incremento do índice de refração pelas moléculas do analito, h é a espessura da camada molecular formada sobre a superfície do sensor e Γ é a concentração da superfície em massa/área.

O deslocamento do comprimento de onda máximo da banda LSPR causado por variações do índice de refração do meio onde se encontra as nanopartículas pela presença do analito ou algum adsorbato, é dado pela equação 9: (PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

$$\Delta \lambda_{max} = S \Delta n \left[1 - e^{\left(\frac{-2h}{l_d} \right)} \right] \quad (9)$$

Onde l_d é o decaimento característico do campo eletromagnético das nanopartículas de metais de cunhagem. Com o aumento da distância da superfície do metal esse decaimento é exponencial, para nanopartículas está entre 5 e 6 nm (HAES; VAN DUYNE, 2002), no entanto, esse valor depende da forma e tamanho das mesmas, podendo chegar em uma distância de detecção de 10 nm (MAYER; HAFNER, 2011). Um fator importante na análise do desempenho de um biossensor é o fator de sensibilidade LSPR, S , que mede a variação da posição da banda

de ressonância plasmônica com a variação do índice de refração do meio, sem levar em consideração a presença da interface. S é dado em nm/unidade de índice de refração (RIU), e pode ser calculado pela equação 10: (MAYER; HAFNER, 2011).

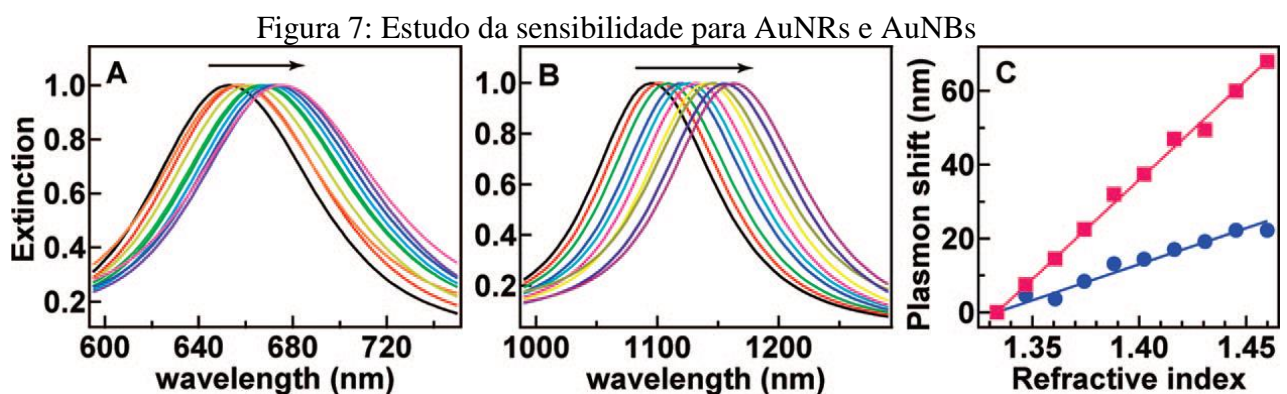
$$S = \frac{d\lambda_p}{dn} \quad (10)$$

Onde λ_p é o comprimento de onda correspondente à frequência do plasmon do metal.

Outra maneira de analisar um biossensor é utilizando a figura de mérito (FOM) (MAYER; HAFNER, 2011), dada pela razão entre a sensibilidade e a largura à meia altura (fwhm) da banda LSPR, mostrada na equação 11.

$$FOM = \frac{S}{fwhm} \quad (11)$$

Na Figura 7 é possível observar a variação do máximo da banda LSPR de nanobastões de Au (AuNRs, Figura 7A) e de nanobipirâmides de Au (AuNBs, Figura 7B) com a variação do índice de refração do meio, devido a variação da concentração de glicerol em uma mistura de água-glicerol (as setas indicam o aumento da concentração de glicerol). De acordo com a C, pode-se verificar que ambas as estruturas apresentam sensibilidade à mudança do índice de refração (curvas em azul e vermelho para os nanobastões e nanobipirâmides, respectivamente). No entanto, é interessante ressaltar que a sensibilidade das nanoestruturas aumenta quando as mesmas se tornam estruturas anisotrópicas e também quando a excitação dos plasmons ocorrem em maiores comprimentos de onda (CHEN et al., 2008).



(a) e (b) Deslocamento do máximo da banda LSPR para AuNRs e AuNBs respectivamente, em soluções com diferentes índices de refração. As setas indicam o sentido do aumento do índice de refração. (c) Dependência do plasmon com o índice de refração em azul para os AuNRs e em vermelho para as AuNBs.

Fonte: CHEN *et al.*, 2008

Os biossensores, assim como outros tipos de sensores, possuem várias características necessárias para que sua capacidade de sensoriamento seja avaliada. Uma dessas características é a sensibilidade (S , equação 10), que corresponde à inclinação de uma curva de calibração/analítica, obtida da resposta do sistema *versus* concentração analítica ou *versus* índice de refração para biossensores SPR e LSPR. Um bom sensor deve possuir grande sensibilidade, ou seja, elevadas respostas frente a pequenas variações da concentração do analito ou índice de refração do meio (VALSECCHI; BROLO, 2013). Nesse mesmo contexto, é interessante que o sensor possua uma ampla faixa de linearidade. Ao obter uma boa curva analítica, é possível que o sensor produza resultados que são diretamente proporcionais a concentração do analito, apenas analisando a curva analítica.

O tempo de vida é outra característica importante principalmente para sensores de baixo custo. É interessante que o dispositivo possa ser utilizado mais de uma vez antes de ser descartado. Isso nem é sempre possível trabalhando com sensores utilizando nanopartículas em suspensão, devido à sua instabilidade. Uma maneira de contornar essas instabilidades é utilizando nanopartículas imobilizadas (ENDO et al., 2006; FAN et al., 2010). Além disso é importante que os sensores possuam um tempo de resposta rápido, para que todo processo de análise seja feito em um curto espaço de tempo, permitindo que as análises sejam rotineiras.

Uma das mais importantes características de um biossensor é sua especificidade, ou a capacidade de medir com exatidão e unicamente o analito ou composto de interesse dentro de uma matriz com possíveis interferentes, impurezas ou produtos de degradação. Hoje em dia este é um dos desafios na construção dos biossensores. A proteção da superfície das AuNPs para uma adsorção não específica pode ser feita com proteínas tipo BSA (albumina de soro bovino) ou com polímeros como o PEG-SH (polietileno glicol-tiolado) (CAO et al., 2012; MACLAUGHLIN et al., 2013).

Na construção dos biossensores geralmente são utilizados alguns experimentos para prova-de-conceito (PdC) da capacidade de sensoriamento. Esses testes são feitos antes da detecção de fato das biomoléculas de interesse, e são feitos com sistemas bem conhecidos, para otimização do biossensor; após tais testes são utilizadas para estudo das biomoléculas de interesse. Um sistema bastante utilizado para PdC em biossensores LSPR, envolve a interação de biotina com estreptavidina. Esse sistema é bastante utilizado pois a ligação entre as duas espécies é muito forte e específica (HAES; VAN DUYNE, 2004). A biotina, que é uma molécula orgânica pequena, pode ser ligada a superfície da nanopartícula, seguido pela interação com a estreptavidina (uma proteína tetramétrica, que pode ser ligada a quatro moléculas biotiniladas, como anticorpos, ácido nucleicos, com mínimo impacto na sua

atividade biológica) (GREEN, 1975). A interação com a estreptavidina causa mudança do índice de refração local (próximo à superfície das nanoestruturas), que será detectada como um deslocamento no espectro de extinção dessas nanoestruturas. Já foram reportadas na literatura detecções de estreptavidina em concentrações da ordem de attomolar (FERREIRA et al., 2009). Além disso, foi demonstrado ser possível detectar essa proteína mesmo quando exposta a substância com interações não específicas com a biotina, como a BSA (MAYER; HAFNER, 2011).

A interação anticorpo–antígeno é outro sistema-modelo interessante, sendo a base dos chamados imunossaios. Os anticorpos são ligados às nanopartículas via um processo de várias etapas. Inicialmente formam-se SAM (camadas auto-organizadas) de tiois sobre a superfície das nanopartículas e a seguir, conectam-se ligantes com interação específica com a biomolécula de interesse (em geral, anticorpos); por último, esse sistema é exposto ao antígeno de interesse. Nesse caso, a sensibilidade é baseada em uma curva entre concentração do antígeno e o sinal analítico. A sensibilidade desse sistema depende da constante de ligação antígeno-anticorpo e da relação sinal-ruído no espectro LSPR. Além dessa figura-de-mérito, a distância entre a nanopartícula e o antígeno a ser detectado também é importante, uma vez que quanto maior essa distância, menor será a sensibilidade desse sensor e maior será o limite de detecção. Em condições otimizadas, porém, este pode ser encontrado na ordem de picomolar (MAYER; HAFNER, 2011).

As aplicações do LSPR em biossensoriamento são as mais variadas; a primeira detecção de uma ligação antígeno-anticorpo, utilizando o deslocamento do comprimento de onda máximo da banda LSPR, foi feita em 1998 por Englebienne (ENGLEBIENNE, 1998). Sete anos depois Haes et al. (HAES et al., 2005) fizeram a primeira descrição de um diagnóstico clínico utilizando LSPR (WILLETS; VAN DUYNNE, 2007). A utilização do LSPR nos permite, além da construção de biossensores utilizando a própria técnica como forma de transdução, utilizar espectroscopias intensificadas por superfície, como os fenômenos SERS e SEF na construção de biossensores.

1.4.3. Espectroscopia Raman

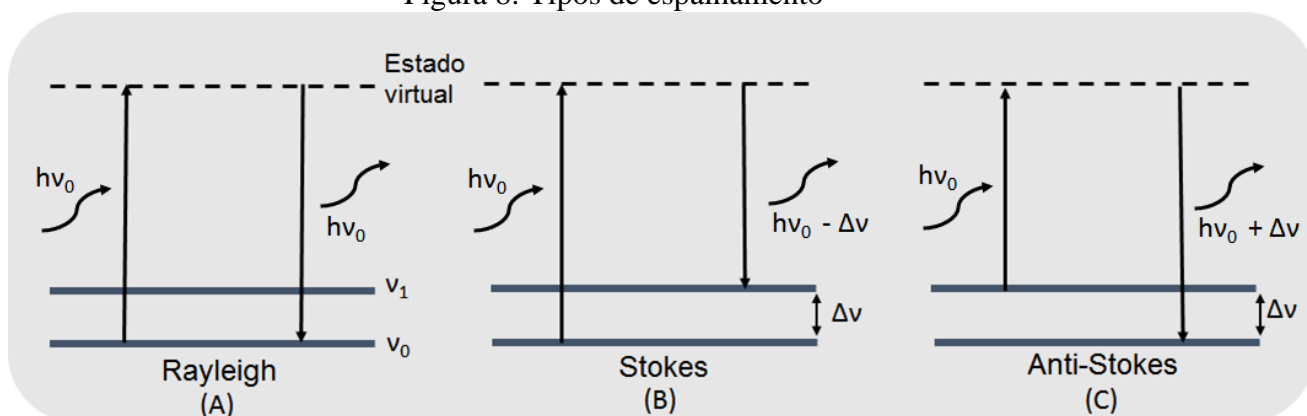
O efeito SERS é baseado na intensificação do espalhamento Raman na presença de nanoestruturas metálicas. O hoje chamado espalhamento Raman foi descoberto em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman. A diferença entre a frequência da radiação monocromática excitante e a radiação espalhada dá informações sobre transições vibracionais de uma molécula,

que também podem ser obtidas da espectroscopia no infravermelho. Apesar de ambos os efeitos, Raman e absorção no infravermelho, mostrarem as transições vibracionais, o efeito Raman envolve o espalhamento de fótons de forma inelástica, enquanto que a absorção no infravermelho envolve a absorção de fótons em ressonância com as transições vibracionais (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

Os espectros Raman e infravermelho muitas vezes divergem consideravelmente, devido às regras de seleção diferentes entre os dois fenômenos. A quantidade de bandas, suas frequências e intensidades relativas são associadas a cada modo normal de vibração e isso gera diferentes padrões espectrais. É possível obter impressões digitais de materiais químicos e biológicos, relacionados às bandas no espectro Raman características dos diferentes grupos químicos. Essa característica faz com que a técnica sirva para a identificação de espécies específicas, além de ser possível realizar medidas quantitativas (GRAHAM; GOODACRE, 2008).

O efeito Raman é observado devido ao espalhamento inelástico de uma radiação monocromática que está sendo incidida em uma molécula. A radiação incidente também pode se espalhar elasticamente (espalhamento Rayleigh). Na Figura 8 podemos observar os três possíveis espalhamentos da luz incidente para uma mesma transição vibracional (SALA, 1996).

Figura 8: Tipos de espalhamento



(a) espalhamento Rayleigh (b) espalhamento Raman Stokes (c) espalhamento Raman anti-Stokes

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

No espalhamento Rayleigh (Figura 8A), a molécula é perturbada pela radiação incidente do estado inicial de energia ao estado virtual e retorna para o mesmo estado, espalhando um fóton com a mesma energia do fóton incidente. Porém, nas Figura 8B e C ocorrem espalhamentos inelásticos, nos quais a molécula é perturbada a um estado virtual e retorna para um nível de energia diferente do inicial. Para o espalhamento Raman Stokes a molécula é perturbada a partir de um estado inicial fundamental e retorna para um estado

excitado, o fóton incidente tem maior energia que o espalhado. No caso do espalhamento anti-Stokes, a molécula já está em um estado de energia vibracional excitado e após a interação com a radiação fica no estado vibracional fundamental, de modo que o fóton espalhado tem maior energia que o fóton incidente (SALA, 1996).

Um dos fatores contribuintes para a intensidade Raman é a seção de choque da molécula em questão, para o Raman a seção de choque é normalmente muito baixa (da ordem de 10^{-30} a 10^{-25}cm^2 por molécula) são necessárias 10^8 moléculas para que uma tenha espalhamento Raman (FARIA; TEMPERINI; SALA, 1999). Em comparação a outras espectroscopias utilizadas na análise de substâncias químicas e biológicas como a fluorescência, a seção de choque Raman é cerca de 10 a 15 ordens de grandeza menor: a fluorescência, por exemplo, possui seção de choque entre 10^{-17} e 10^{-16}cm^2 por molécula (KNEIPP; KNEIPP; KNEIPP, 2008). Devido à necessidade de melhorar o sinal Raman vários efeitos de intensificação, como o efeito SERS, se apresentam como ferramentas poderosas para o estudo da espectroscopia Raman.

1.4.4. Biossensores SERS

A baixa secção de choque para o espalhamento Raman faz com que o mesmo não tenha sensibilidade suficiente para a investigação de monocamadas (FARIA et al., 1999). Fleischmann *et al.*, sabendo que a intensidade Raman depende do número de espalhadores, tentaram aumentar o sinal Raman aplicando vários ciclos de oxi-redução em um eletrodo de prata, para aumentarem sua área superficial. Assim obtiveram o espectro Raman com alta relação sinal/ruído da piridina adsorvida neste eletrodo, que foi a primeira observação do efeito SERS. Alguns anos depois, Jeanmaire *et al.* e Albrecht *et al.*, mostraram independentemente que a alta relação sinal/ruído não poderia ser atribuída apenas pelo aumento da área superficial do eletrodo que era de 10^2 vezes, uma vez que o aumento da seção de choque da piridina adsorvida era da ordem de 10^6 vezes, efeito posteriormente denominado SERS (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977; JEANMAIRE; VANDUYNE, 1977).

Após a descoberta do efeito SERS, a comunidade científica se mobilizou para entender o efeito, surgindo alguns trabalhos teóricos da década de 80 para tentar explicá-lo. Após um esforço da comunidade, o efeito SERS foi explicado com base em dois modelos, o modelo eletromagnético e modelo químico, (SHARMA et al., 2012) embora ainda não haja certeza sobre a contribuição de cada um para o efeito, nos últimos anos alguns autores também

vêm trabalhando na construção de uma teoria conjunta, que leve em consideração os dois modelos anteriormente propostos (LOMBARDI; BIRKE, 2012).

- Modelo Eletromagnético: esse modelo envolve a intensificação do campo eletromagnético na superfície das nanopartículas metálicas, sendo possível intensificar o sinal Raman das moléculas adsorvidas sobre o metal. O espectro SERS obtido deve ser bastante similar ao espectro Raman das moléculas em solução, pois não é necessário que a molécula esteja em contato com a superfície metálica (MCNAY et al., 2011).

- Modelo Químico: Neste modelo são consideradas as interações entre a molécula espalhadora e a superfície. Acontecem modificações na polarizabilidade molecular, devido à formação de um complexo de superfície, podendo ocorrer transferência de carga. O contato com a superfície é necessário e devido a essas interações os espectros SERS podem divergir dos espectros Raman das soluções (MCNAY et al., 2011).

A intensificação na intensidade do espalhamento Raman observada no efeito SERS é cerca de 10^5 a 10^6 vezes a intensidade do espalhamento Raman (FAN; ANDRADE; BROLO, 2011), porém no regime de uma única molécula (*single-molecule-SERS*, ou SM-SERS) é possível alcançar intensificações de 10^7 a 10^8 vezes (LE RU et al., 2007). A intensificação SERS é dada pela média dos “*hot spots*”, que se caracterizam por duas nanopartículas metálicas muito próximas, de maneira que os modos do plasmon de superfície localizado interajam, provocando grandes intensificações do campo eletromagnético local. Assim, se uma molécula estiver entre duas ou mais nanopartículas terá seu sinal Raman ainda mais intensificado do que quando próximo apenas de uma nanopartícula (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

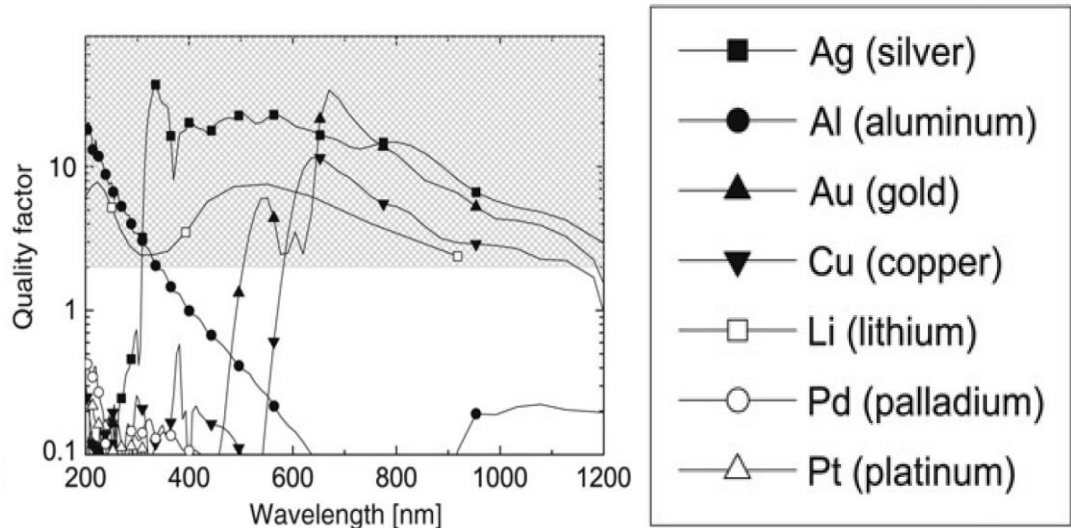
Na seção 1.4.2 foi dito que a banda LSPR para metais de cunhagem (Au, Ag e Cu) é normalmente encontrada na região do visível e infravermelho próximo. Estes metais também são os mais utilizados para a prática do SERS, e isso pode ser explicado utilizando a constante dielétrica destes metais: esta é um número complexo e, portanto possui uma parte real e uma parte imaginária. A parte real é responsável pela posição da banda de ressonância do plasmon destes metais em escala nanométrica e valores negativos indicam alta eficiência no espalhamento de luz, enquanto a parte imaginária está ligada a intensidade dessa banda, pois nos dá informação sobre a absorção de luz do metal. O chamado fator de Qualidade (Q) relaciona essas duas partes da constante dielétrica e é dado por:

$$Q = \frac{\omega(d\varepsilon'/d\omega)}{2(\varepsilon''(\omega))^2} \quad (12)$$

Onde $\varepsilon' = \text{Re}(\varepsilon)$ e $\varepsilon'' = \text{Im}(\varepsilon)$. Para que um metal seja um bom substrato SERS é necessário que Q seja maior que 2, porém é preferível que seja maior que 10. Como a parte

imaginária está relacionada a absorção de luz, sua diminuição implica em menores perdas do campo elétrico; também é desejável que a parte real possua um valor mais negativo possível, normalmente para LSPs está entre $-20 \leq Re(\epsilon) \leq -1$. Na Figura 9 é mostrado um gráfico de Q em relação ao comprimento de onda para vários metais (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

Figura 9: Gráfico do Q x comprimento de onda para vários metais.



Fonte: LE RU; ETCHEGOIN, 2009

A Figura 9 nos mostra que todos os metais de cunhagem podem ser utilizados para comprimentos de onda maiores que 600nm e a prata ainda pode ser usada a partir de 300nm, porém todos esses possui Q baixo em maiores comprimentos de onda. Outros metais como o Lítio possuem um bom valor de Q, porém é difícil a construção de nanoestruturas utilizando metais tão reativos (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

O SERS tem atraído grande atenção recentemente para a construção de biossensores específicos (BELL; SIRIMUTHU, 2008). A sua utilização para o biossensoriamento possui uma grande vantagem em comparação ao LSPR, porque o SERS permite identificar diretamente a substância química ou biológica analisada, além de ter alta sensibilidade (BANTZ et al., 2011). Ainda é possível citar outras vantagens do uso do espalhamento Raman em relação a outras técnicas espectroscópicas como SPR, LSPR e fluorescência. Entre essas vantagens, podemos citar a minimização de possíveis interferências de fluorescência com o emprego de nanopartículas de ouro e a excitação no vermelho. O espalhamento Raman com excitação na região do vermelho é pouco susceptível a causar fotodegradação das amostras. Além disso, a largura das bandas Raman é de 10 a 100 vezes mais estreitas do que as mesmas de fluorescência ou LSPR, o que reduz uma potencial sobreposição de bandas. Esses atributos facilitam a utilização da técnica SERS para várias aplicações (PORTER et al., 2008).

Entre as possibilidades de substratos SERS, a utilização de coloides metálicos possui algumas vantagens: grande área superficial e grande dispersão em líquidos, que permite uma melhora na interação entre o analito e o substrato; movimento Browniano, causado pela presença do solvente, que minimiza os danos sofridos pela amostra devido a exposição à radiação laser. Os coloides de nanopartículas metálicas podem ser usados ainda para a preparação de filmes finos sobre vidro, materiais poliméricos, entre outros, o que dá portabilidade e versatilidade para os biossensores (ABALDE-CELA et al., 2010).

Existem duas abordagens para a utilização do efeito SERS para detecção e estudo de interação em biossensores que envolvem os métodos intrínseco e extrínseco. O método intrínseco pode ser utilizado quando o sinal Raman do próprio analito de interesse é intensificado, a partir da proximidade com uma nanoestrutura metálica, produzindo assim um sinal intensificado SERS que permite a detecção direta. Já no método extrínseco o sinal SERS do analito é pouco intenso e, nesse caso a nanoestrutura é modificada com uma molécula repórter, que em geral possui sinal SERS intenso e bem conhecido (HOWES; RANA; STEVENS, 2014). Após a modificação com a molécula repórter, as nanoestruturas serão funcionalizadas para ter afinidade com o analito em questão e, quando em contato com o analito, a molécula repórter fornecerá um sinal analítico SERS indireto (PORTER et al., 2008) .

1.5. FILMES METÁLICOS

A fabricação de estruturas em duas e três dimensões de coloides metálicos nanoestruturados é interessante por causa das possíveis aplicações em várias áreas, entre elas a área de sensores, proporcionando sensores que possam ser reutilizados, com grande tempo de vida, e com alta estabilidade (FAN et al., 2010). Essas nanoestruturas permitem o controle do tamanho e do espaçamento entre os constituintes, permitindo manter as propriedades únicas dos nanomateriais em um sistema organizado de grande dimensão. Uma estratégia interessante para a preparação desse tipo de sistema é a da construção de multicamadas, onde se realiza a construção de camadas auto-organizadas de nanopartículas metálicas utilizando um ligante molecular (TSENG; LIN; CHAU, 2001). Uma maneira interessante já reportada de montar essas estruturas é a construção de filmes metálicos em lâminas de vidro, utilizando silanos substituídos com grupos de alta afinidade com as nanopartículas, como o 3-mercaptopropil-trimetoxissilano (MPTMS), para ligar as camadas de nanopartículas entre si e ao substrato, permitindo a obtenção de várias camadas de nanopartículas sobre o vidro modificado (FAN; BROLO, 2009).

Também é possível a utilização de substratos ainda mais baratos que lâminas de vidro, como substratos de politereftalato de etileno (PET), que, além de baratos, são flexíveis, não são degradados pela luz e são transparentes na região do visível. Vários biossensores têm sido feitos utilizando esse polímero na intenção de utilizar algumas dessas propriedades. Esses dispositivos podem ser usados em *displays* flexíveis e transparentes, dispositivos eletrônicos orgânicos e dispositivos biomédicos (FAN et al., 2010).

1.6. POTENCIAL APLICAÇÃO DE BIOSSENSORES PLASMÔNICOS

Biossensores com elevada sensibilidade na detecção de biomoléculas são promissores para a aplicação no diagnóstico de doenças. Um grupo de doenças a se destacar compreende as chamadas “Doenças Negligenciadas”, que afetam cerca de 1 bilhão de pessoas em 149 países. Estão presentes na maioria dos países em desenvolvimento e principalmente em populações pobres (LOUREIRO; HASSELMANN; GASSER GOUVÊA, 2011). Recebem esse nome devido ao fato de serem doenças que não interessam aos países mais ricos, detentores das maiores empresas farmacêuticas, já que são doenças que não apresentam alto potencial de retorno financeiro. O baixo retorno financeiro é devido ao fato das populações de baixa renda não poderem comprar os remédios, resultando em necessidade de apoio governamental, ou aos custos muito baixos destes remédios (DE SOUZA, 2010).

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico rápido, preciso e, principalmente, barato é de grande importância no combate dessas doenças. Sendo assim, o desenvolvimento de biossensores plasmônicos para esse tipo de doença pode ser um grande avanço para a biomedicina e para o combate dessas doenças. Mas nem tudo se resolve apenas com o desenvolvimento de novas drogas, ou maiores investimentos em pesquisa; há a necessidade de melhor saneamento básico, infraestrutura e condições mínimas de saúde (O'CONNELL, 2007).

Cerca de 80% da população mundial está vivendo em países em desenvolvimento. Países com baixo padrão de vida, indústria fraca e baixo IDH (índice de desenvolvimento humano). Grande parte das técnicas utilizadas nos dias de hoje envolvem processos complicados de detecção, precisam de muita amostra e instrumentação cara e complexa. Devido a todas características já mostradas, o LSPR é uma proposta interessante para o desenvolvimento de sensores econômicos e eficazes, gerando qualidade de vida para países em desenvolvimento (HAMMOND et al., 2014).

2. OBJETIVOS

Esta dissertação teve como objetivo geral a construção de biossensores nanoestruturados baseados nas técnicas de LSPR e SERS, utilizando AuNPs, para a futura aplicação no diagnóstico de doenças negligenciadas.

Para atingir o objetivo geral, diversos objetivos específicos foram necessários:

- a) Síntese e otimização das AuNPs anisotrópicas com tamanhos e formas controladas;
- b) Construção de filmes de AuNPs sobre lâminas de vidros;
- c) Estudo da sensibilidade das AuNPs imobilizadas frente a modificações do índice de refração do meio dielétrico;
- d) Funcionalização das AuNPs com sistemas de biomoléculas modelo;
- e) Funcionalização das AuNPs otimizadas e realização de testes de desempenho de biossensoriamento utilizando SERS;

3. METODOLOGIA

Na construção de biossensores plasmônicos, o desempenho dos sensores depende da forma e do tamanho das nanoestruturas empregadas, ou seja, antes de qualquer detecção há a necessidade do estudo das técnicas de síntese de nanopartículas de forma e tamanho diferentes de maneira controlada. Neste trabalho de mestrado, tais nanoestruturas foram caracterizadas utilizando a espectroscopia no UV-VIS (Espectrômetro Ocean Optics 2000 ou Espectrômetro Ocean Optics 2000 com microscópio óptico acoplado disponível no IQ-UFRGS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio eletrônico de varredura, tipo Field Emission Gun (FEG-MEV), de marca FEI, modelo Magellan. As principais formas utilizadas foram AuNRs, AuNBs de ouro. Para as medidas utilizando SERS, o espectrômetro Raman utilizado foi Raman Bruker, modelo Senterra, com radiações excitantes em 532nm, 633nm e 785nm, acoplado ao microscópio óptico permitindo a realização de medidas de microscopia e mapeamento Raman.

A detecção de proteínas modelo foi realizada de duas maneiras diferentes: (1) modificações superficiais nas nanopartículas em suspensão coloidal ou (2) utilizando nanopartículas fixadas em lâminas de vidro. Foram utilizados dois sistemas de proteínas modelo: biotina-estreptavidina e albumina de soro bovino (BSA)

3.1 MATERIAIS

Tripropilamina (Sigma Aldrich; $\geq 98\%$) ; Tributilamina (Sigma Aldrich; $\geq 98,5\%$); Bromohexadecano (Sigma Aldrich; 97%); Brometo de Cetiltrimetilamônio, CTAB (Fluka; 96%); Borohidreto de Sódio (Fluka; $\geq 99\%$); Ácido tetracloroáurico (Sigma Aldrich; $\geq 99,9\%$); citrato de sódio (Merck; $\geq 99\%$); Nitrato de prata (Sigma Aldrich; $\geq 95\%$); Ácido Ascórbico (Sigma Aldrich; $\geq 99\%$); 3-Mercaptopropil Trimetoxisilano (Sigma Aldrich; 95%); Glicose (Merck); Ferricianeto de Potássio; Cloreto de Potássio (Sigma Aldrich; $\geq 99\%$); Cisteamina (Sigma Aldrich; $\geq 95\%$); Biotina N-Hidroxissuccinimidil ester (Sigma Aldrich; $\geq 98\%$); Estreptavidina (Sigma Aldrich); Ácido mercaptoundecanóico, MUA (Sigma Aldrich; 95%); N-hidroxissuccinimida, NHS (Fluka; $\geq 97\%$); N-etil-N-(3-dietilaminopropil) carbodiimida, EDC (Sigma Aldrich; $\geq 98\%$); Dihidrogenofostato de potássio (Riedel de Haën AG; 95%); Hidrogenofostato de potássio (Vetec; 99%) Albumina de Soro Bovino (Sigma Aldrich; $\geq 98\%$); Anti Albumina de Soro Bovino (Sigma Aldrich); corante IR-820 (Sigma Aldrich); Tetrahidrofurano (Sigma Aldrich); Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich; 99,5%). As soluções foram preparadas utilizando água desionizada ($R = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

3.2 SÍNTESE DOS SURFACTANTES

Para a síntese de nanobipirâmides utilizou-se surfactantes com estruturas muito semelhantes à do CTAB, porém não comerciais. Houve então a necessidade de sintetizá-los, Esta etapa foi realizada em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Fernanda I. Bombonato e o estudante de doutorado Mathias P. Pereira.

Uma quantidade estequiométrica (ou 1:2) de bromohexadecano e trialquilamina foram colocados em refluxo em acetonitrila ($T \approx 90^\circ\text{C}$) por 24 h, a uma razão de 1:2,2 de reagentes:solvente. A mistura foi rotaevaporada para remover a acetona e deixada no congelador para solidificar. Após a solidificação foi adicionado éter etílico para fazer a recristalização da mistura, e o sólido resultante foi filtrado utilizando também éter etílico para remover as impurezas (KOU et al., 2007).

A caracterização dos compostos obtidos foi realizada utilizando espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de H^1 e C^{13} , utilizando o espectrômetro de RMN Bruker Avance III HD 500MHz.

3.3. SÍNTESE DAS AuNPs

3.3.1. Nanobastões

Uma suspensão de nanopartículas precursoras (*seed*) foi preparada a partir de uma solução de CTAB (5,00 mL, $0,20 \text{ mol L}^{-1}$) e de HAuCl_4 (5,00 mL, $0,0005 \text{ mol L}^{-1}$). Foi então adicionado 0,60 mL de $0,010 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaBH}_4$ em banho de gelo, sob agitação. A solução ficou sob agitação vigorosa por 2 min e deixada em temperatura ambiente após a agitação, por até 30 min. A solução de crescimento dos nanorods consiste na adição de CTAB (5 mL, $0,20 \text{ mol L}^{-1}$) a solução de AgNO_3 (0,15 mL, $0,0040 \text{ mol L}^{-1}$). A essa solução foi adicionado HAuCl_4 (5,00 mL, $0,001 \text{ mol L}^{-1}$) e solução de ácido ascórbico (0,070 mL; $0,07888 \text{ mol L}^{-1}$). Finalmente, foi adicionado 0,012 mL da solução *seed* na temperatura controlada entre $27\text{-}30^\circ\text{C}$, a coloração da solução mudou em cerca de 10-20 minutos (NIKOBAKHT; EL-SAYED, 2003).

3.3.2. Nanobipirâmides

Suspensão de nanopartículas *seed* foram adicionadas soluções de HAuCl_4 (0,25 mL; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e citrato de sódio (0,25 mL; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) em água (9,62 mL), seguido

por uma solução recentemente preparada de NaBH_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $0,15 \text{ mL}$), sob agitação vigorosa em banho de gelo. A suspensão *seed* foi mantida em temperatura ambiente por até a preparação da solução de crescimento.

A solução de crescimento foi preparada pela adição de HAuCl_4 ($0,3 \text{ mL}$; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$), AgNO_3 ($0,45 \text{ mL}$; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido ascórbico ($0,10 \text{ mL}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em uma solução aquosa de CTBAB (brometo de cetiltributilamônio) ($7,12 \text{ mL}$; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$). A seguir, $0,075 \text{ mL}$ da solução *seed* foi adicionada e a mistura foi deixada em repouso por 24 h a temperatura de 65°C em banho termostático. Foram utilizados outros surfactantes como o CTAB e CTPAB (brometo de cetiltripropilamônio), que resultam em mudanças na razão de aspecto e na taxa de crescimento das nanobipirâmides (KOU et al., 2007).

3.4. CONSTRUÇÃO DE FILMES DE AuNPs SOBRE LÂMINAS DE VIDRO

Para obtenção de filmes de Au sobre lâminas de vidro, foi necessária a deposição de várias camadas de AuNPs para que fosse possível obter um sinal LSPR significativo, esse processo foi feito a partir do procedimento proposto por Fan e Brolo com pequenas adaptações (FAN; BROLO, 2009).

Antes das deposições das AuNPs, as lâminas foram limpas com solução piranha ($75\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ e $25\% \text{ H}_2\text{O}_2$) e enxaguadas com água ultrapura ($R = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Em seguida, foram seguidos dois procedimentos distintos: (1) o substrato foi imerso em uma solução metanólica de mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS) 10 mmol L^{-1} por 24 h , sendo posteriormente lavado com metanol para remover o excesso de MPTMS não adsorvido e novamente com água ultrapura, e foi a seguir imerso em uma suspensão de AuNPs por 24 h , as AuNPs foram centrifugados 3 vezes a 8500 RPM por 30 minutos e redispersos em água ultrapura para retirada de todo o excesso de CTAB; (2) o substrato foi imerso em uma solução etanólica de MPTMS 10 mmol L^{-1} por 24 h , sendo as duas primeiras horas aquecido a 60°C e depois o restante a temperatura ambiente, foi lavado com etanol para remover o excesso de MPTMS não adsorvido e depois com água ultrapura, a seguir foi deixado em aquecimento ($T = 120^\circ\text{C}$) por 2 h , chamado tempo de cura. Depois foi imerso em uma suspensão de AuNPs por 24 h , devidamente centrifugados como no primeiro procedimento. Ocorreu a formação da camada de AuNPs. Para deposição de um número maior de camadas com o objetivo de aumentar o sinal LSPR, utilizou-se MPTMS para ligar uma camada de AuNPs à outra. Uma solução de $300 \mu\text{L}$ de MPTMS e $250 \mu\text{L}$ de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em 25 mL de água ultrapura foi deixada em agitação por no mínimo 1 h . O substrato já contendo uma camada de AuNPs foi

imerso nessa solução por cerca de 20 minutos, lavado com água ultrapura e imerso novamente na solução de AuNPs por 1h, seguido por lavagem; essa série de procedimentos foi considerado como a deposição de uma camada adicional de AuNPs. Esse procedimento foi feito até se obter o número de camadas desejado, sendo monitorado através da aquisição de espectros UV-Vis (utilizando o *ar* como branco) objetivando acompanhar o sinal LSPR do substrato com o aumento do número de camadas de AuNPs.

3.5. ESTUDO DA SENSIBILIDADE

Estudou-se a sensibilidade tanto das AuNPs imobilizadas em lâminas de vidro quanto em suspensão coloidal. Para o primeiro caso, a sensibilidade foi estudada utilizando soluções de glicose com diferentes concentrações (variação de 6% m/v até 30% m/v) e consequentemente índices de refração diferentes, os índices de refração variaram de 1,3390 e 1,3365 e foram medidos utilizando um refratômetro de Abbè de bancada. No segundo caso, a sensibilidade foi estudada utilizando os AuNPs redispersos em soluções aquosas de diferentes concentrações de tetrahidrofurano (THF), solvente este que permitiu a redispersão sem agregação nas concentrações utilizadas, antes da redispersão final dos AuNPs em THF, são feitos no mínimo três ciclos de centrifugação à 8500 rpm por 30 min e posterior redispersão em água deionizada.

3.6. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

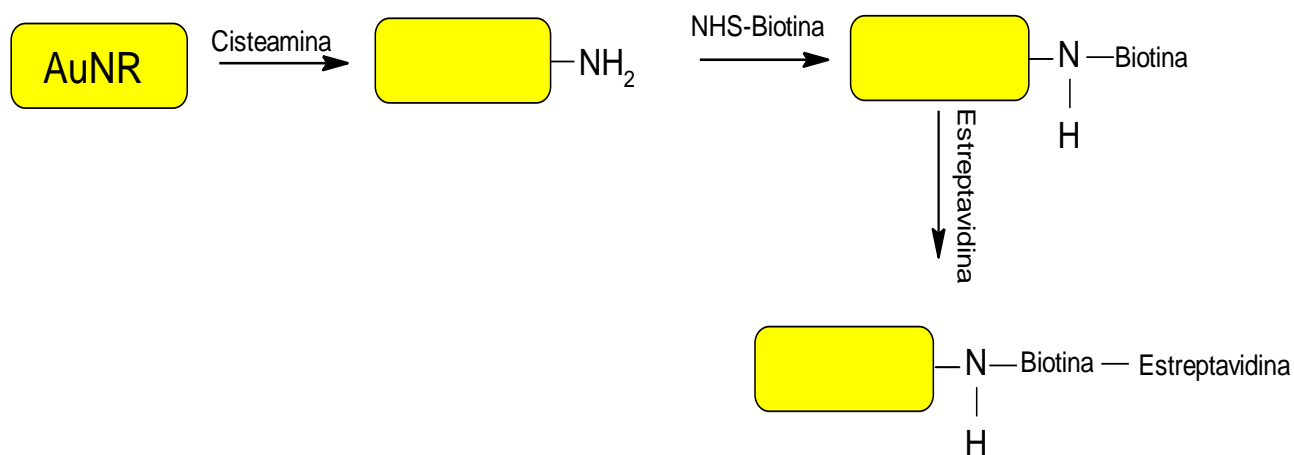
A caracterização eletroquímica foi realizada utilizando voltametria cíclica de bloqueio (feita no LAMAI, IQ-UFRGS utilizando o pontenciostato AUTOLAB 302N) em um intervalo de -0,2 V a +0,5 V, com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. A solução eletrolítica utilizada foi ferricianeto de potássio (1,0 mmol L⁻¹) em KCl 0,1 mol L⁻¹ em meio aquoso. Foi utilizada uma cela eletroquímica de três eletrodos, sendo utilizado como contra eletrodo uma lâmina de platina, eletrodo de referência Ag|AgCl(sat.) e eletrodo de trabalho um substrato comercial de vidro recoberto com óxido de estanho dopado com flúor (FTO). O substrato de vidro foi substituído pelo FTO nestas análises, uma vez que é necessário um substrato condutor. É importante ressaltar que o procedimento utilizado para modificar o FTO é idêntico ao utilizado nos substratos de vidro.

3.7. DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR LSPR

3.7.1. Biotina-Estreptavidina

A detecção de proteínas por LSPR envolve o desenvolvimento de uma série de etapas relacionadas com a química de superfície do filme de nanopartículas. O procedimento utilizado nesse trabalho consiste de três etapas e foi baseado com algumas modificações no reportado por De Leebeeck et al. (DE LEEBEECK et al., 2007). Na Figura 10 é mostrado um esquema da funcionalização das AuNPs imobilizadas para a detecção de estreptavidina. O substrato foi imerso em uma solução aquosa de 6,2 mmol L⁻¹ de cisteamina por cerca de 36 h. A cisteamina possui um grupo tiol, que se liga fortemente ao Au, e possui um grupo amino que são reativos frente ao grupo N-hidroxisuccinimil (NHS) da biotina modificada com este grupo. O substrato foi lavado com água ultrapura para a retirada de moléculas não adsorvidas e o espectro UV-Vis foi registrado com este imerso em tampão fosfato de pH=7,5 (PBS). O substrato modificado com cisteamina foi então imerso em uma solução contendo 5 mg mL⁻¹ de biotina-NHS em dimetilsufóxido por 45 minutos (o que foi repetido para os dois lados do slide de vidro). Novamente o substrato foi lavado, agora com tampão PBS e o espectro UV-Vis foi registrado. Após esse procedimento, o substrato estava pronto para a interação com estreptavidina, e sendo assim foram feitas duas detecções com concentrações diferentes da proteína, o substrato foi imerso em solução contendo 0,125 mg mL⁻¹ da proteína por 15 minutos (para cada lado da lâmina) em PBS e o espectro UV-Vis foi registrado, depois foi novamente imerso em uma solução de 0,250 mg mL⁻¹ e o espectro novamente registrado.

Figura 10: Esquema de funcionalização de um AuNR para a detecção de Estreptavidina por LSPR



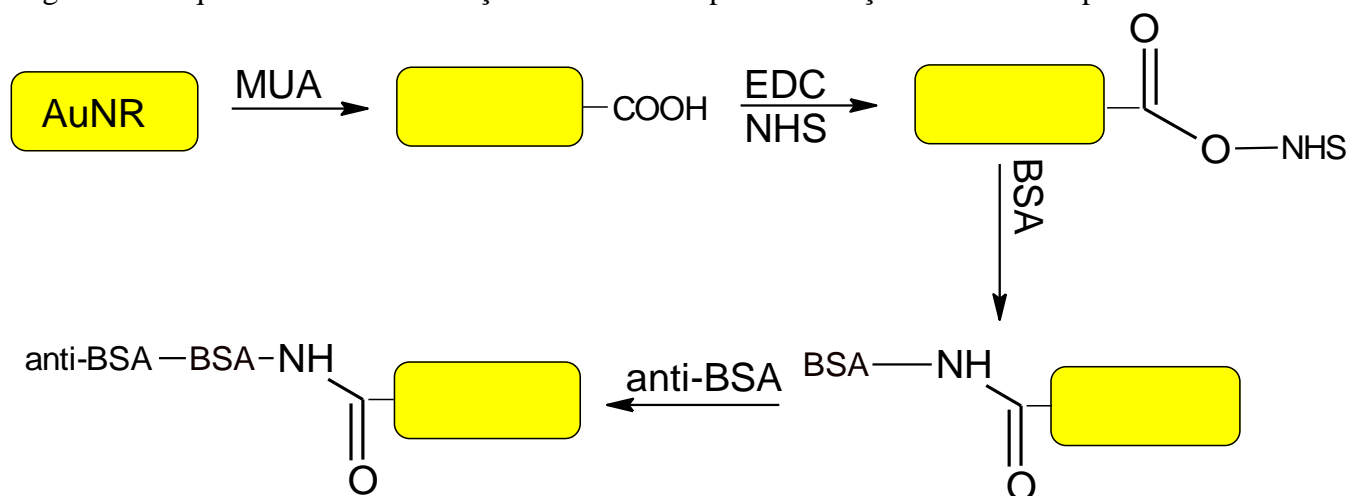
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

3.7.2 Antígeno – Anticorpo: Detecção de anti-BSA

Filmes de AuNRs

O procedimento utilizado para a detecção de anti-BSA foi diferente, devido à especificidade do sistema. Na Figura 11 é mostrado um esquema para a detecção de anti-BSA por LSPR e também por SERS, a química de superfície foi realizada em 4 passos nesse caso (MONTEIRO et al., 2012). O substrato foi imerso em uma solução etanólica de 1 mmol L^{-1} de MUA por cerca de 72 h. Depois foi lavado com etanol e água e incubado em uma solução 1:1 de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NHS e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de EDC por 3 h. Em seguida, o substrato foi imerso em uma solução de BSA $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS por 6 h. Para a detecção de anti-BSA, o substrato foi imerso em uma solução de anti-BSA 1 mg mL^{-1} em PBS por cerca de 12 h. Os espectros UV-Vis foram retirados em cada passo da modificação das lâminas de vidro com AuNRs.

Figura 11: Esquema de funcionalização de um AuNR para a detecção de anti-BSA por LSPR



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Suspensões coloidais de Au

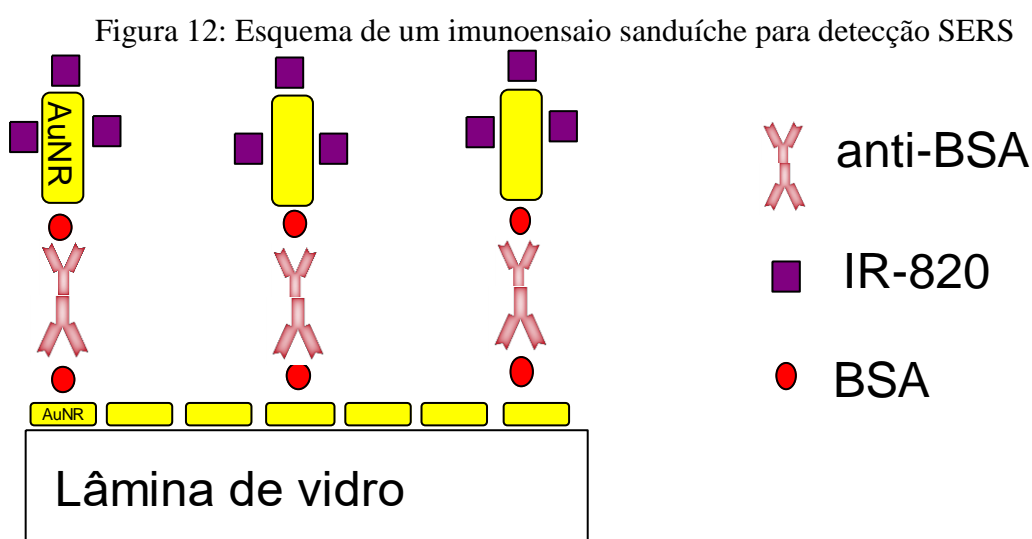
Para as suspensões coloidais o procedimento para a utilização da BSA sofreu alterações nas concentrações de alguns reagentes e no tempo necessário para cada modificação, porque as nanopartículas são mais sujeitas à agregação em suspensão, o que interfere diretamente na observação das modificações espectrais. O método utilizado foi adaptado de Cao *et al* (CAO *et al.*, 2012) assim como para a deposição de camadas de Au em lâminas de vidros, as AuNPs em forma de bastões foram centrifugadas (8500 RPM, 30 minutos por no mínimo três vezes) até a retirada do excesso de CTAB, seguido pela redispersão em água ultrapura; a seguir a 5,0 mL de AuNRs foram adicionados a 2,0 mL de MUA $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação vigorosa, que foi mantida por 24 h. Depois dessa etapa, a suspensão foi novamente centrifugada (8000 RPM durante 20 minutos) para a retirada do excesso de MUA. Após a retirada de excesso de MUA, os AuNRs foram redispersos em PBS e a 1,0 mL dessa solução de AuNPs modificadas com MUA foram adicionados 20 μL de uma solução recém-preparada de EDC ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$)/NHS ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), que ficou sob agitação em vórtex por 25 min; a seguir, 50 μL de uma solução de BSA 1 mg mL^{-1} em PBS foi adicionada à solução resultante. A suspensão modificada com BSA foi centrifugada para retirada do excesso de BSA, foi redispersada em PBS e a essa suspensão foram adicionados 50 μL de uma solução com concentração conhecida de anti-BSA para análise. Os espectros UV-Vis foram obtidos após cada passo da modificação superficial.

3.8. ATIVIDADE SERS

Para os testes de atividade SERS, foram preparadas soluções de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do corante IR-820. Para as suspensões coloidais foi feita uma diluição de uma solução $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de IR-820 com a suspensão. Para as lâminas de vidro, a solução do corante foi adicionada sobre a superfície destas previamente modificadas, e após secagem, a lâmina foi lavada com água ultrapura para obtenção do espectro/imagem SERS.

3.9. DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR SERS

A detecção de biomoléculas utilizando SERS foi feita utilizando o método de imunoensaio sanduíche adaptado de (QIAN et al., 2008) mostrado no esquema da Figura 12. O substrato foi o mesmo que o utilizado para a detecção de anti-BSA por LSPR, mostrado em 3.7.2. O procedimento para a modificação da suspensão de AuNPs também foi o mesmo utilizado em 3.7.2, porém com a adição do corante IR-820 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ na proporção de 1:10 de suspensão AuNRs + MUA e foi deixado reagir durante aproximadamente 6 h até completar as 24 h de agitação com MUA, porém o procedimento ocorre apenas até a imobilização de BSA. Sendo assim, o substrato modificado com anti-BSA é imerso na suspensão de AuNPs imobilizados com BSA e IR-820 por cerca de 1h ou mais e então lavado com água ultrapura. O espectro SERS deste substrato é então obtido. Para garantir a imobilização do IR-820 nas AuNPs, espectros SERS foram obtidos da suspensão de AuNPs funcionalizados com IR-820 e BSA.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

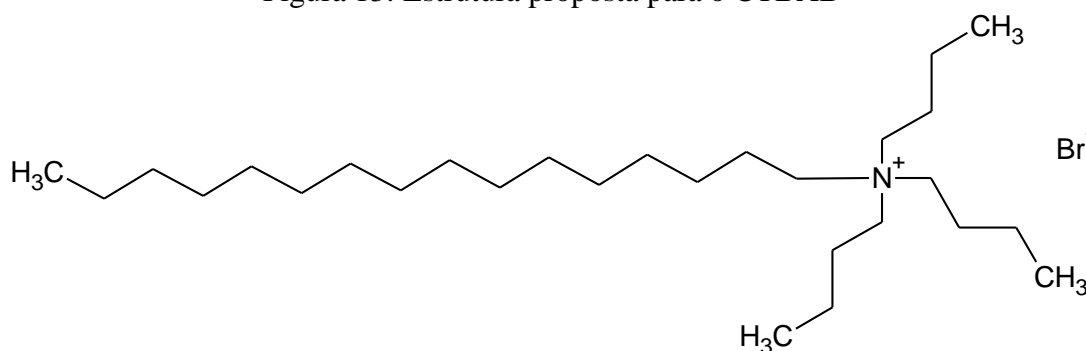
4.1. SÍNTESE DOS SURFACTANTES

Os dois surfactantes derivados do CTAB não comerciais (CTPAB (Brometo de cetiltripropilamônio) e CTBAB (Brometo de cetiltributilamônio)) utilizados foram sintetizados, purificados e posteriormente caracterizados por RMN. Durante a síntese, a formação do produto foi controlada a partir de cromatografia em camada delgada, retirando alíquotas em tempos periódicos e utilizando os precursores como padrão, e através da mistura reacional, o progresso da reação era visualizado. Com a formação satisfatória do produto, este era purificado através de recristalização utilizando éter dietílico e então caracterizado por RMN, adotando CDCl_3 como solvente. Nessas reações era esperada a formação de um sal de amônio quaternário a partir de uma amina terciária. O bromohexadecano deve se ligar ao nitrogênio da respectiva trialquilamina, liberando o Br^- .

4.1.1. CTBAB

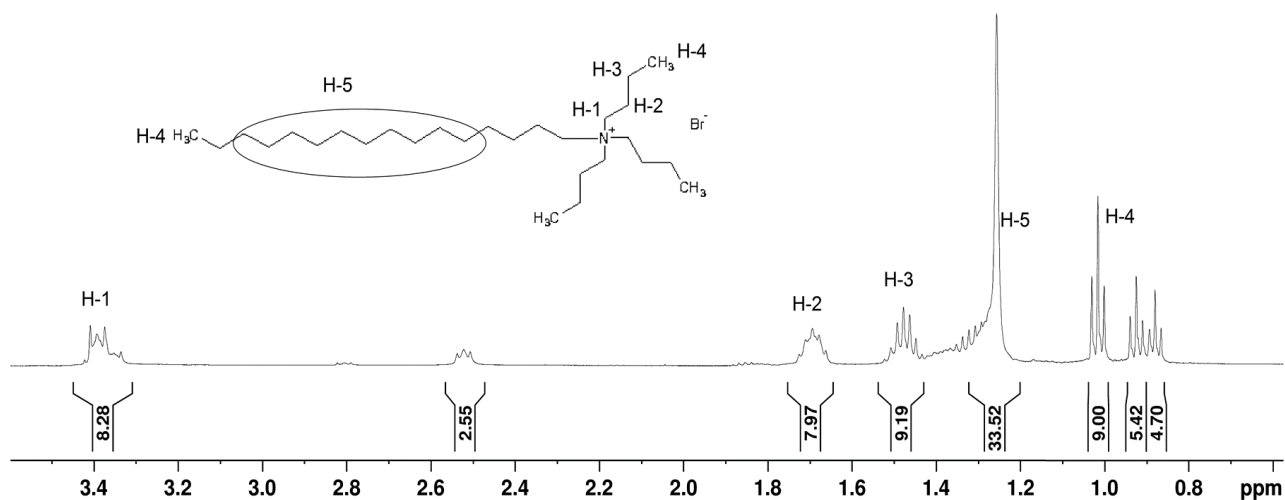
Na reação da tributuilamina e o bromohexadecano, o produto esperado foi o CTBAB e a estrutura proposta está apresentada na Figura 13.

Figura 13: Estrutura proposta para o CTBAB



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A confirmação da obtenção dessa estrutura foi obtida através da caracterização de RMN de ^1H e ^{13}C . Na Figura 14 é possível observar o espectro de RMN de ^1H para o produto purificado obtido na reação.

Figura 14: RMN de ^1H do composto CTBAB em CDCl_3 

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

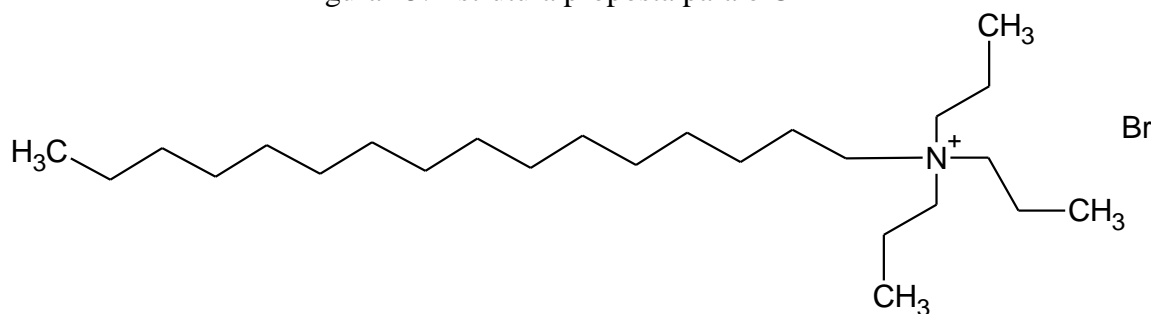
A indicação dos deslocamentos químicos medidos junto com a atribuição dos diferentes átomos de hidrogênios na molécula do CTBAB, mostrada como inserto, são vistos na Figura 14. Como pode-se observar, os átomos de hidrogênio marcado como 1 (H-1) possuem o maior deslocamento químico e são encontrados na região de 3,4 ppm, esses são os hidrogênios mais desblindados, pois estão ligados ao carbono mais próximo do nitrogênio (átomo mais eletronegativo). Os hidrogênios H-2 não estão ligados ao carbono mais próximo do nitrogênio, porém ainda sofrem seu efeito, são mais desblindados que H-3 e H-5, se encontrando na região de 1,7 ppm. A utilização de um equipamento com 500 MHz ajuda, por exemplo, na diferenciação dos hidrogênios H-3 próximo a 1,5 ppm e os hidrogênios H-5 na região de 1,3 ppm. Os hidrogênios H-4 das metilas são os menos desblindados, pois são os hidrogênios do carbono mais distante do nitrogênio e estão na região de 0,9 e 1,0 ppm. Sendo assim o espectro de RMN de ^1H nos permite demonstrar a obtenção do composto de interesse. Os dados de ^{13}C também corroboram a obtenção do composto proposto.

É possível notar um sinal em 2,5 ppm, este sinal não pôde ser atribuído. Acredita-se ser alguma impureza do processo de síntese que não foi completamente eliminada na recristalização e lavagem do produto. Ainda há necessidade de melhor otimização dos processos de purificação. Apesar das impurezas, os resultados indicam a formação do produto proposto.

4.1.2. CTPAB

Utilizando a tripropilamina como amina terciária, o composto a ser obtido foi o CTPAB, conforme estrutura proposta na Figura 15:

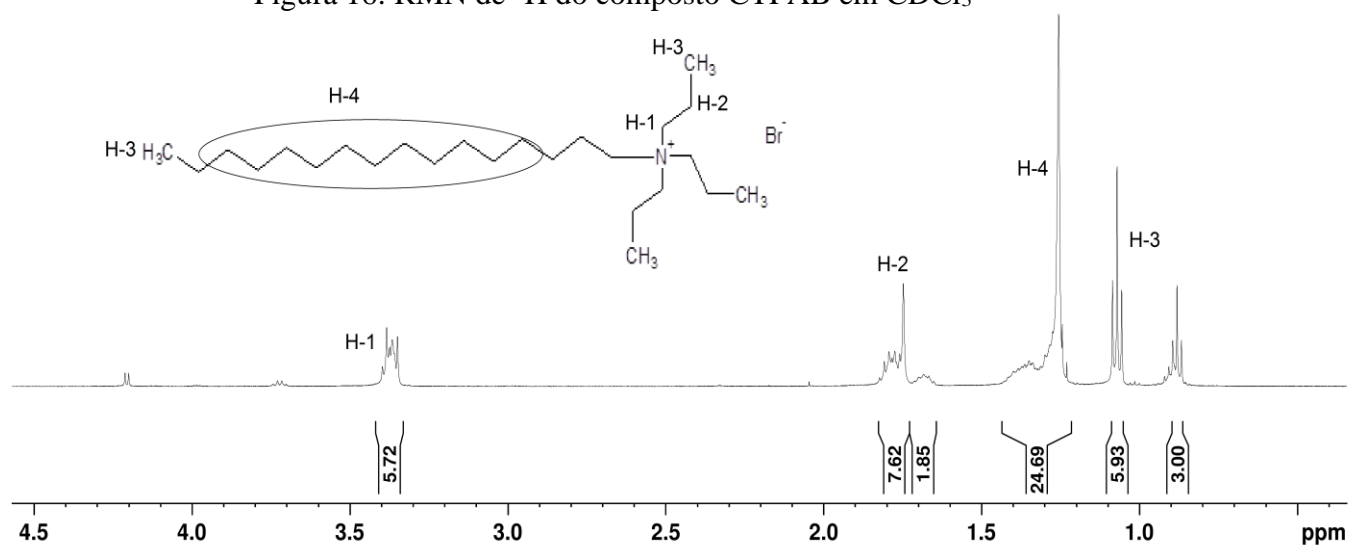
Figura 15: Estrutura proposta para o CTPAB



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Pelo espectro de RMN de ^1H mostrado na Figura 16, pode-se confirmar que o produto formado na reação entre a tripropilamina e o bromohexadecano é o CTPAB.

Figura 16: RMN de ^1H do composto CTPAB em CDCl_3



Os deslocamentos químicos estão indicados e a atribuição aos hidrogênios é mostrada na estrutura como inserto no espectro, assim como a Figura 14, os hidrogênios H-1 são os hidrogênios ligados ao carbono mais próximo do nitrogênio, portanto os mais desblindados, aparecendo em cerca de 3,4 ppm. Os hidrogênios H-2 já estão ligados a um carbono mais distante do nitrogênio, porém ainda sofrem seu efeito, se encontrando entre 1,7 e 1,8 ppm. Os hidrogênios H-4 estão mais blindados e se encontram na região de 1,3 ppm.

Enquanto os hidrogênios H-3 das metilas, são os hidrogênios mais blindados e portanto se encontram na região de 0,9 e 1,1 ppm.

Novamente é possível observar alguns sinais bem fracos na região de 3,7 e 4,3 ppm, atribuído a possíveis impurezas; porém, são sinais muito fracos em relação ao resto do espectro, notando-se que para esse composto o processo de purificação foi mais eficaz. Os resultados de RMN de ^1H , aliados aos resultados de RMN de ^{13}C , indicam a formação do produto com a estrutura proposta na Figura 15.

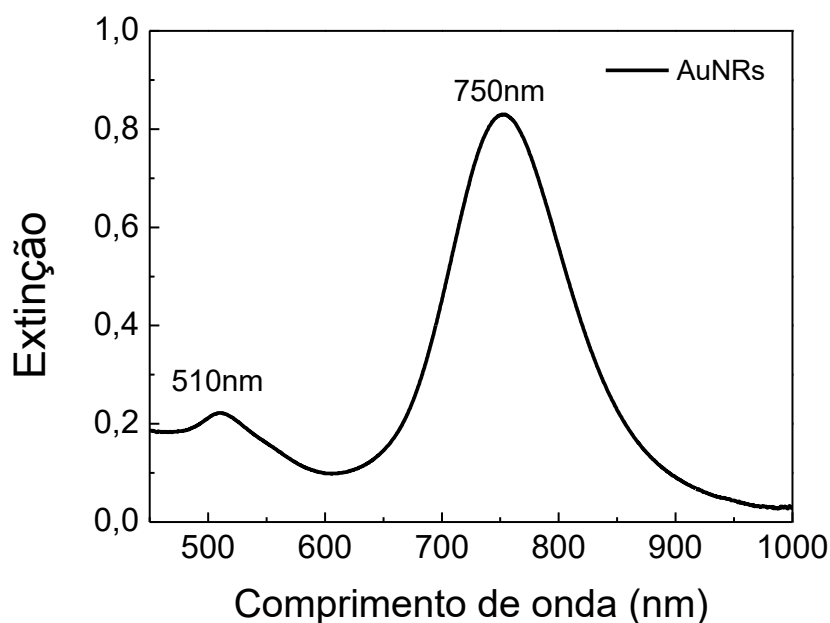
4.2. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.2.1. Nanobastões de Au (AuNRs)

A caracterização dos AuNRs foi feita primeiramente através da espectroscopia no UV-VIS e as amostras que apresentaram os melhores resultados indicados por esta técnica foram caracterizadas por FEG-MEV.

Os AuNRs foram sintetizadas utilizando o método descrito em 3.3.1, o método permite adições de quantidades diferentes de AgNO_3 , agente este que controla a razão de aspecto nos AuNRs sintetizados na metodologia adotada, sendo utilizado 150 μL de AgNO_3 0,0040 mol L^{-1} nesse trabalho. Como discutido na seção 1.4.2, as nanopartículas de Au apresentam bandas de extinção na região do visível que são fortemente dependentes da forma e do tamanho das nanopartículas. Na Figura 17 é mostrado o espectro no UV-VIS dos AuNRs obtidos nesse trabalho, apresentando duas bandas de extinção em 510 e 750 nm. Este espectro é típico de AuNRs obtidos por outras metodologias (NIKOBAKHT; EL-SAYED, 2003). A banda em 510 nm é atribuída ao plasmon transversal enquanto a banda em 750 nm ao plasmon longitudinal dos AuNRs. A partir desses resultados tem-se indícios da formação de AuNRs na síntese (NIKOBAKHT; EL-SAYED, 2003).

Figura 17: Espectro de extinção para os AuNRs



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

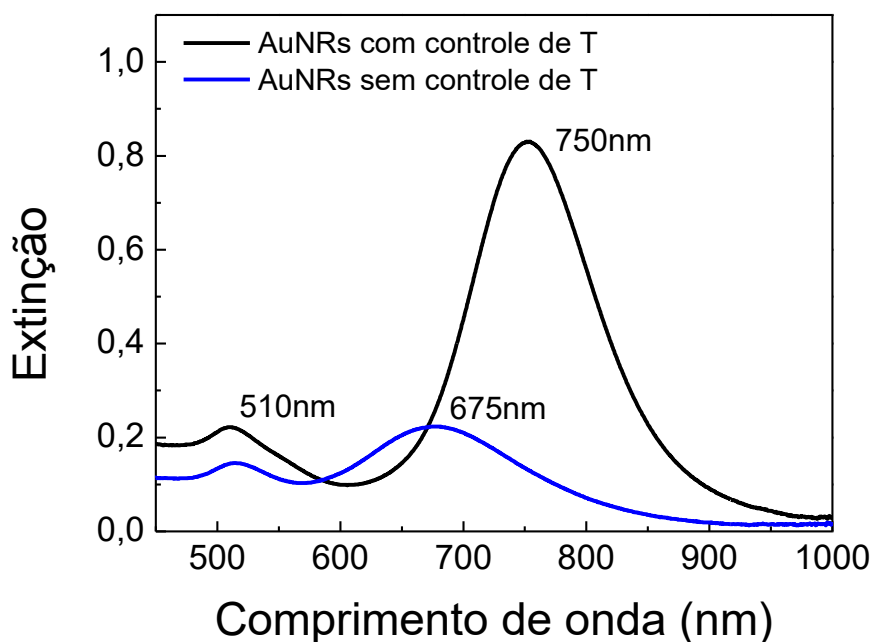
A intensidade da banda em 750 nm (Figura 17) pode ser utilizada para indicar se na reação há um bom rendimento para a produção de AuNRs: quanto maior for a razão de intensidade entre a banda do plasmon longitudinal sobre o transversal, maior será a produção de AuNRs. No caso do espectro apresentado na Figura 17, a banda em 750 é *ca.* 5 vezes mais intensa do que a banda em 510 nm, o que nos indica a formação de uma boa proporção de AuNRs frente a outras possíveis estruturas, como esferas de Au que possuem uma banda LSPR na região próxima de 510 nm.

É interessante ressaltar que a banda em maior comprimento de onda possui uma largura à meia altura (FWHM) pequena em comparação com muitas outras preparações de AuNPs. Esse fato é bastante importante para o sensoriamento, já que há a necessidade de observar os deslocamentos dessa banda com as modificações na superfície dos nanobastões, e assim, quanto mais fina a banda LSPR melhor será para observar esses deslocamentos. Além disso, como já foi discutido, a banda em maior comprimento de onda é mais sensível às modificações do índice de refração do meio.

Na preparação de AuNRs, o controle da temperatura é muito importante, principalmente para um melhor rendimento da síntese. O controle é ainda mais essencial pelo fato da síntese ocorrer muito próxima da temperatura ambiente. As primeiras tentativas de preparação de AuNRs foram feitas a temperatura ambiente sem um controle fino da

temperatura, o que resultou em sínteses com baixo rendimento de AuNRs, como observado no espectro UV-VIS da Figura 18; com a utilização do banho termostático, com resolução de temperatura de 0,1°C, foi observado uma grande melhora no rendimento da síntese, visto no espectro UV-VIS da Figura 18. O melhor rendimento é atribuído à grande diferença na razão de intensidade entre plasmons longitudinal e transversal, sendo *ca.* 140% maior após o controle fino de temperatura, somada a maior quantidade de material (maior intensidade da banda). Esse aumento se deu devido à menor formação de nanoesferas que apresentam uma banda de plasmon na região de 530 nm para o Au e também em um maior controle da razão de aspecto dos AuNRs.

Figura 18: Espectros de extinção de AuNRs preparados com e sem controle fino de temperatura, utilizando banho maria e banho termostático, respectivamente.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

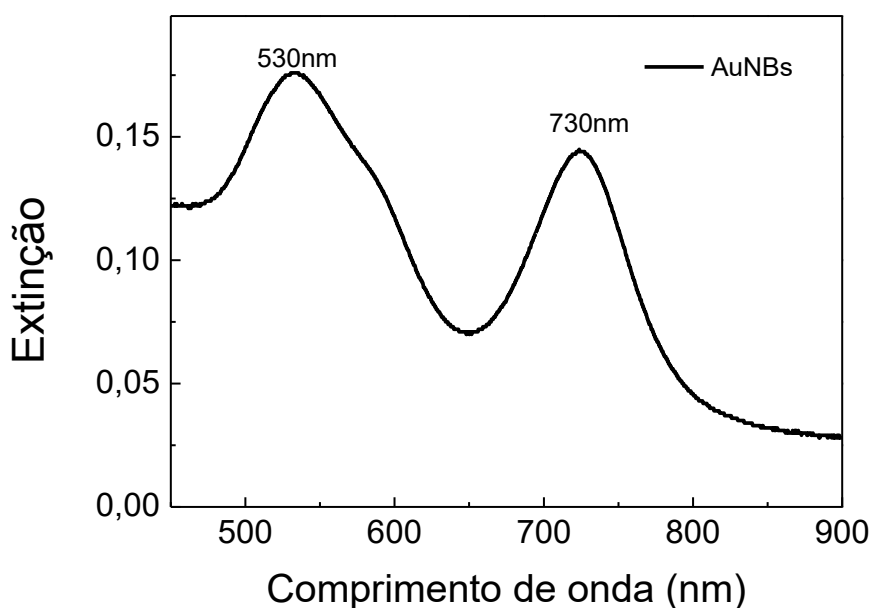
Outra grande diferença observada na Figura 18, é o deslocamento da banda do plasmon longitudinal para maior comprimento de onda com o controle fino de temperatura, o que nos indica a formação de AuNRs com maiores comprimentos e maior razão de aspecto. Esses dados nos mostram que o controle da temperatura é essencial no processo de síntese de nanobastões, pois mantém a reprodutibilidade da síntese, essa reprodutibilidade é em relação aos resultados de espectroscopia no UV-VIS e de MEV, um rendimento aceitável, o que torna o procedimento interessante para a utilização em biossensores.

4.2.2. Nanobipirâmides de Au (AuNBs)

O procedimento para a caracterização das AuNBs é o mesmo para os AuNRs, inicialmente é feita a caracterização por UV-VIS e as amostras que apresentaram melhores resultados por essa técnica foram caracterizados por FEG-MEV.

As AuNBs foram sintetizadas utilizando vários surfactantes, conforme descrito no procedimento citado em 3.3.2. No entanto, somente houve resultados satisfatórios para o procedimento utilizando o CTPAB no direcionamento do crescimento das AuNPs. Na Figura 19 é mostrado o espectro para as AuNBs sintetizadas com CTPAB.

Figura 19: Espectro de extinção para os AuNBs.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

O espectro mostrado na Figura 19 apresenta duas bandas de extinção, uma atribuída ao plasmon transversal (530 nm) e a outra ao plasmon longitudinal (730 nm), sugerindo a formação de AuNBs. (KOU et al., 2007). No entanto, este método deverá ser aprimorado para que se obtenha uma maior proporção de bipirâmides frente aos outros formatos e também deve ser feito com controle fino de temperatura. Para isso, será necessário aumentar a relação entre as intensidades das duas bandas, do mesmo modo que para os AuNRs este é um indicador de uma maior proporção de bipirâmides. Apesar da presença das duas bandas indicar a formação das AuNBs, a maior intensidade da banda em 530 nm frente a banda em 730 nm indica uma possível formação de estruturas esféricas, pois a banda em 530nm é característica dessas estruturas para o Au (FRENS, 1973).

Embora haja a necessidade de otimização do método de síntese para melhores resultados e melhor rendimento na formação de AuNBs, este resultado mostra que o surfactante

sintetizado nesse trabalho é promissor no controle de direcionamento do crescimento de AuNPs, permitindo que haja a formação de nanobipirâmides.

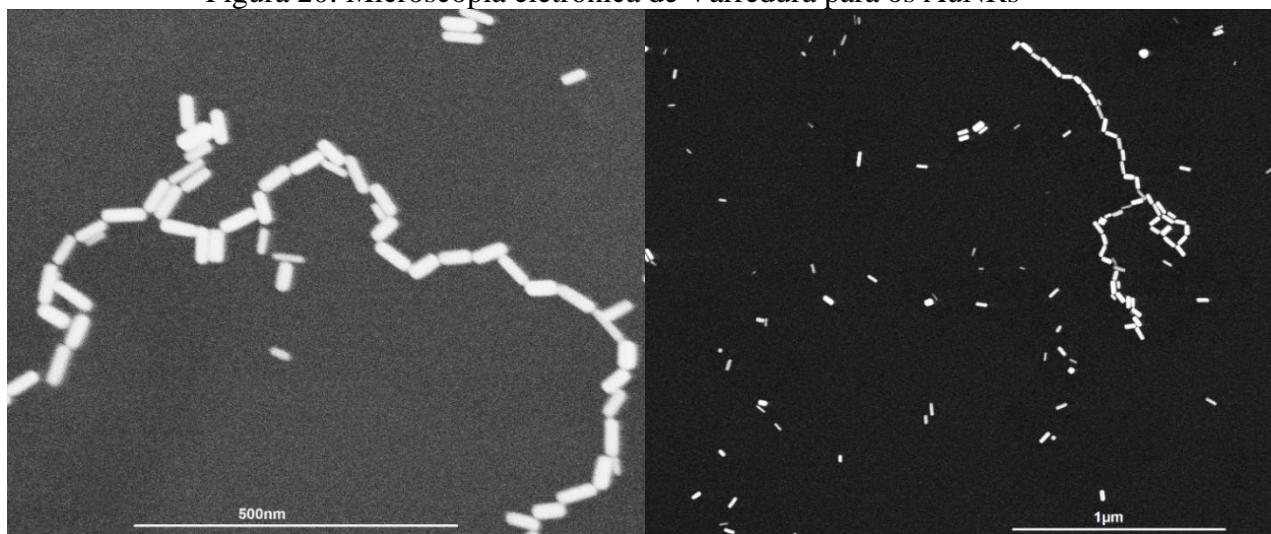
4.3. CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.

Através da caracterização óptica temos apenas uma indicação sobre a possível morfologia das AuNPs sintetizadas. Para uma confirmação da morfologia e do tamanho é necessário a utilização de técnicas de microscopia eletrônica. Micrografias para diversas preparações foram obtidas através de FEG-MEV, e verificou-se que as AuNPs apresentaram a morfologia desejada, tamanho e razão de aspecto similares aos reportados na literatura. (KOU et al., 2007; NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003)

4.3.1. Nanobastões de Au (AuNRs)

Na Figura 20 são mostradas as micrografias para as nanoestruturas sintetizadas com controle fino de temperatura que resultaram em uma relação alta entre as bandas longitudinal/transversal no espectro UV-Vis da Figura 17. Nas micrografias apresentadas na Figura 20 é possível observar um alto rendimento de AuNRs frente a outras possíveis nanoestruturas como esferas. Os AuNRs possuem comprimento longitudinal médio de $63,4 \pm 7,6$ nm e transversal médio de $23,4 \pm 3,7$ nm, a razão de aspecto que é a relação entre o comprimento longitudinal sobre o transversal é cerca de $2,8 \pm 0,5$. Sendo assim, os AuNRs mostrados na Figura 20 apresentam alta homogeneidade no tamanho e na forma.

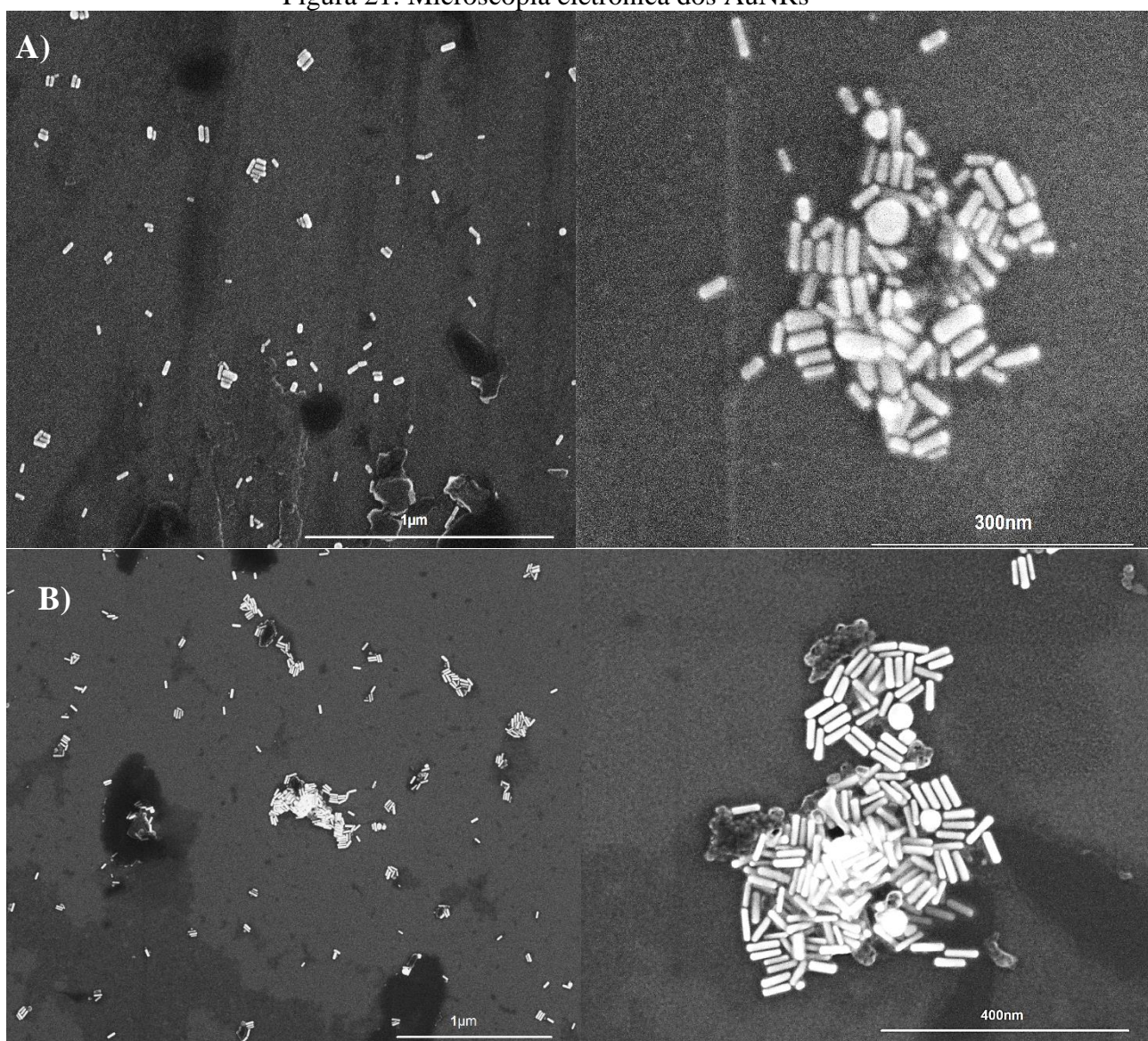
Figura 20: Microscopia eletrônica de Varredura para os AuNRs



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Como mostrado nos resultados de espectroscopia de UV-VIS na Figura 18, o controle de temperatura tem grande influência nos resultados da síntese, fazendo com que haja um melhor rendimento na quantidade de AuNRs. Em resumo, um maior número de AuNRs em relação a outras estruturas foi formado com boa homogeneidade de tamanho. A Figura 21 apresenta as micrografias para as duas condições de preparações abordadas nos resultados de espectroscopia de UV-VIS: com controle fino de temperatura e controle limitado de temperatura.

Figura 21: Microscopia eletrônica dos AuNRs



(a) Síntese dos AuNRs sem controle fino da temperatura (b) Síntese dos AuNRs com controle fino da temperatura.

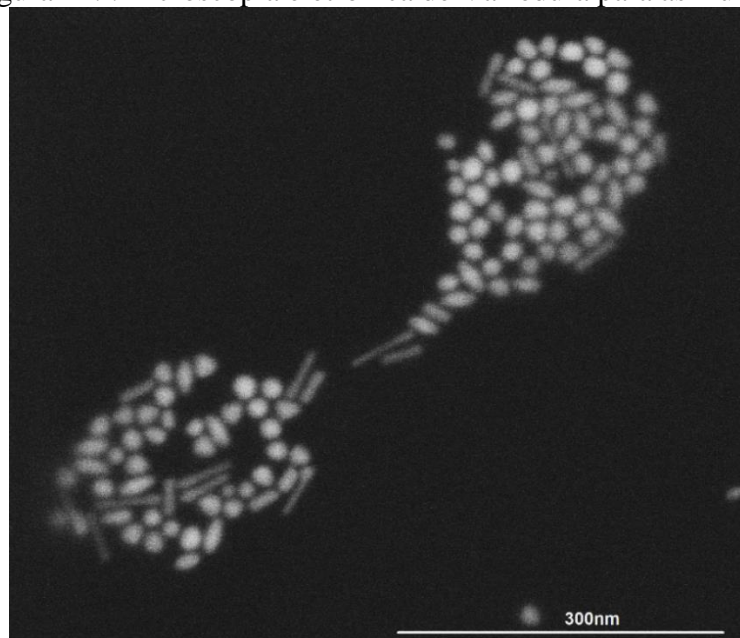
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

De acordo com a Figura 21B, verifica-se que de fato o controle fino de temperatura promove uma grande proporção de AuNRs em comparação a nanoestruturas de outras formas. Além disso, na Figura 21A é possível verificar a presença de algumas nanoestruturas esféricas além de outras formas. Os AuNRs observados na Figura 21A são mais heterogêneos, possuem tamanhos variados, diferente do mostrado na Figura 21B onde se tem uma boa homogeneidade de tamanho e forma. Tais resultados de FEG-MEV corroboram com os resultados mostrados na espectroscopia no UV-VIS. Sendo assim, o controle fino da temperatura no processo de síntese, é essencial para se ter uma síntese com boa quantidade de AuNRs, e principalmente com boa homogeneidade e reprodutibilidade.

4.3.2. Nanobipirâmides de Au

Para confirmar a possível estrutura de nanobipirâmides, utilizou-se FEG-MEV para obter a micrografia apresentadas na Figura 22. Esta imagem corresponde às AuNPs sintetizadas utilizando o CTPAB como direcionador do crescimento para a preparação de nanobipirâmides (espectros de UV-VIS da Figura 19).

Figura 22: :Microscopia eletrônica de Varredura para as AuNBs



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

É possível observar na Figura 22 nanoestruturas de várias formas, como esferas, bastões e também bipirâmides em pequena proporção. Também é importante ressaltar que algumas das estruturas parecidas com esferas, podem ser bipirâmides orientadas perpendicularmente ao feixe de elétrons do microscópio. De acordo com os resultados de espectroscopia UV-VIS

mostrados na Figura 19, era esperado um baixo rendimento de AuNBs e, além disso, baixa homogeneidade de forma e tamanho. Sendo assim os resultados de FEG-MEV corroboram os resultados de espectroscopia UV-VIS, como pode ser verificado na Figura 22. Contudo, este ainda é um resultado interessante que nos mostra possibilidade de sintetizar AuNBs utilizando um dos surfactantes preparados no laboratório. Acredita-se que este método pode ser melhorado através de um melhor controle de temperatura e otimização da síntese dos surfactantes, assim como da síntese das AuNBs.

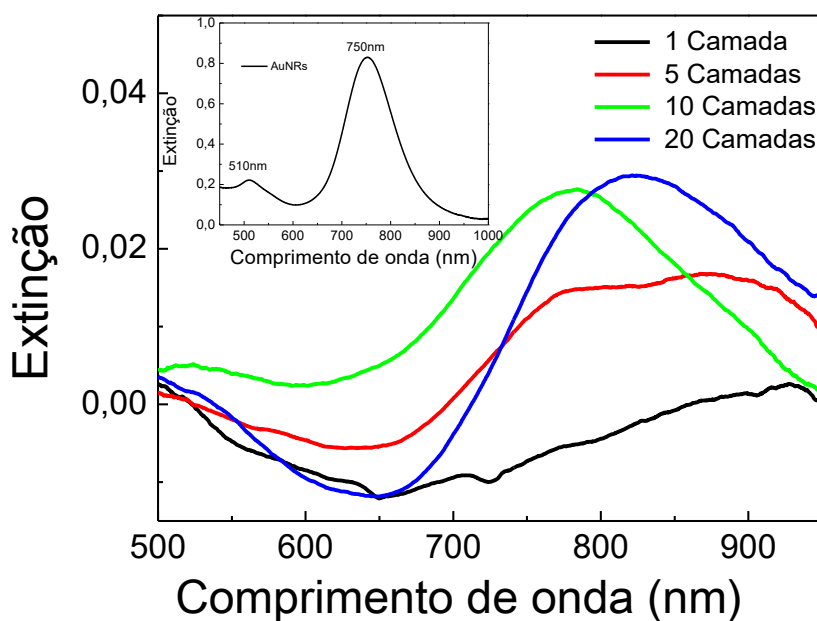
4.4. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DOS FILMES DE NANOBASTÕES DE OURO SOBRE LÂMINAS DE VIDRO

A construção de substratos LSPR e SERS baseados na imobilização das nanopartículas sobre lâminas de vidro foi realizada a partir de dois métodos diferentes de preparação de acordo com a seção 3.4: (1) a adsorção de MPTMS sobre vidro foi feita em temperatura ambiente, seguida pela deposição de uma camada de AuNRs; (2) a adsorção do MPTMS sobre o vidro foi feita em temperaturas diferentes, nas duas primeiras horas, a temperatura foi mantida em 60°C e a seguir, durante as outras 22 h, o sistema foi mantido em temperatura ambiente. Após a adsorção do MPTMS, foi realizada uma etapa de cura (2 h à 120°C) da camada do silano sobre o vidro antes da adição de AuNRs. Os dois métodos de imobilização dos AuNRs geraram resultados bastante diferentes em relação ao número de camadas necessárias para a obtenção de um sinal LSPR significativo, e também na obtenção do sinal LSPR das duas bandas características dos bastões.

Na Figura 23 são mostrados os resultados para a construção do substrato utilizando do método (1), onde é possível observar a necessidade de 10 camadas de AuNRs para a obtenção de um sinal LSPR apreciável. De acordo com a Figura 23, até 5 camadas não é observável um sinal LSPR significativo, observando-se baixa intensidade das bandas LSPR características, sem nenhuma definição. Com 10 camadas surge um sinal LSPR apreciável, com banda bem definida em 777 nm. Esta banda está bem próxima da região onde se encontra a banda do plasmon longitudinal dos AuNRs utilizados (como mostra o inserto na Figura 23), e sua intensidade aumenta de acordo com o acréscimo de camadas de AuNRs adsorvidas sobre o vidro. Com a adição de 20 camadas há um sinal LSPR característico e satisfatório para as medidas LSPR, havendo um deslocamento da banda LSPR para maior comprimento de onda. Isso se deve ao fato de que essas nanopartículas se aglomeram e interagem entre si ao serem depositadas, de maneira que o plasmon de superfície pode sofrer acoplamento e assim deslocar

a banda LSPR para maiores comprimentos de onda, se comportando então como partículas maiores. Ou seja, aglomerados de nanopartículas de vários tamanhos diferentes, podem causar tanto o deslocamento do máximo como também o alargamento da banda LSPR, como observado na Figura 23.

Figura 23: Espectros de extinção dos AuNRs imobilizados sobre lâminas de vidro. Método (1).

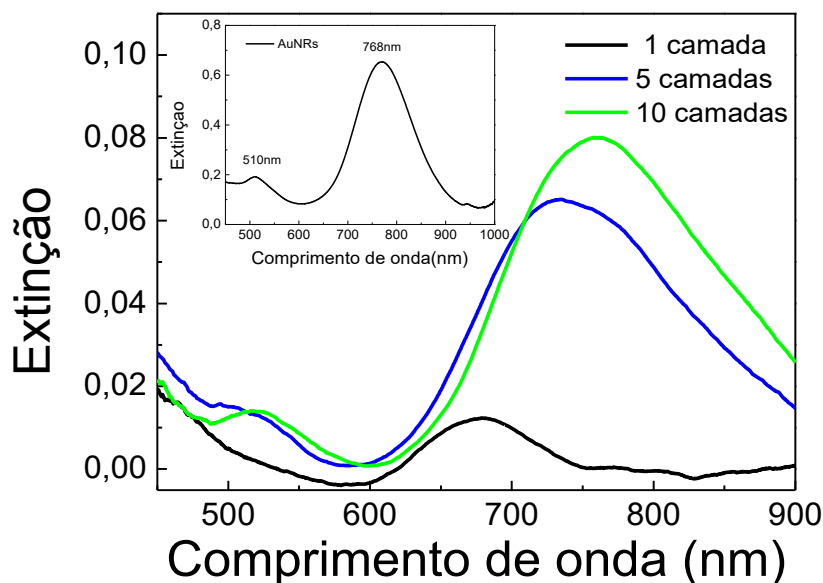


Inserto: Espectro LSPR dos AuNRs em suspensão coloidal

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Na Figura 24 são mostrados os espectros UV-Vis dos substratos construídos a partir do método (2). O processo de aquecimento no início da adsorção MPTMS e a etapa de cura fazem com que as moléculas do MPTMS tenham uma melhor adsorção ao vidro e também aos AuNRs resultando em uma melhor imobilização dos nanobastões sobre o vidro.

Figura 24: Espectros de extinção dos AuNRs immobilizados sobre lâminas de vidro. Método (2).



Inserto: Espectro LSPR dos AuNRs em suspensão coloidal.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Os substratos construídos a partir do método (2) apresentam resultados melhores do que os obtidos pelo método (1) (Figura 23), onde uma banda LSPR característica e bem definida é observada apenas com 10 camadas ou mais. Na primeira camada de AuNRs immobilizados já é possível observar uma banda LSPR bem definida no espectro de extinção da Figura 24. Com a adição de mais camadas é notado um aumento da intensidade LSPR e, com apenas 5 camadas é perceptível o aparecimento de uma banda atribuída ao plasmon transversal dos AuNRs, o que não é possível observar com clareza nos substratos modificados pelo método (1). A partir de 5 camadas as bandas se tornam ainda mais definidas e com a deposição de 10 camadas o substrato apresenta um sinal LSPR intenso tanto do plasmon longitudinal quanto do transversal. Observa-se também uma boa relação entre as duas bandas do espectro LSPR dos AuNRs, além da semelhança do espectro dos AuNRs immobilizados nas lâminas de vidro com o espectro de extinção dos AuNRs em suspensão, mostrado no inserto da Figura 24, indicando assim a presença dos AuNRs na superfície da lâmina de vidro. Assim como na Figura 23 os espectros apresentam deslocamento das bandas LSPR com a adição sucessiva de camadas de AuNRs, que pode ser devido ao acoplamento entre as nanopartículas.

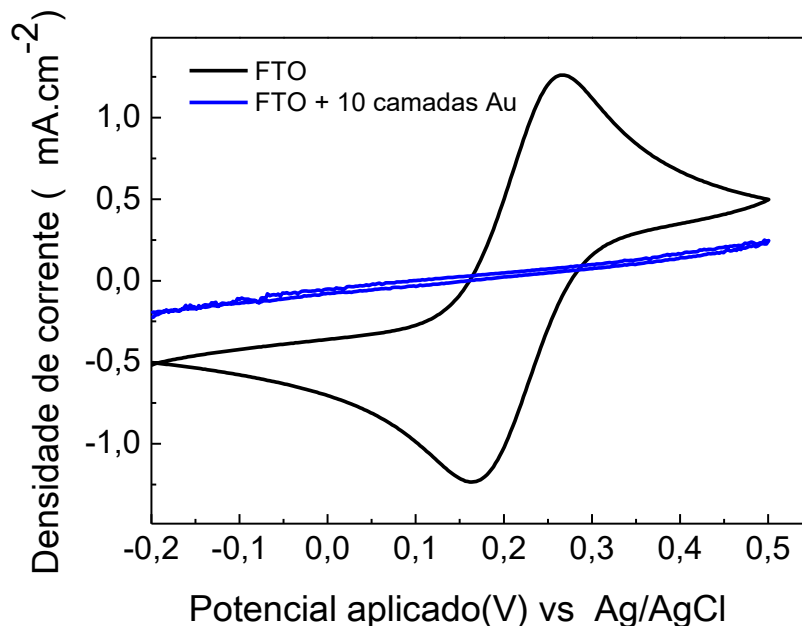
Através da Figura 24 também se confirma que a utilização do método (2) levou uma maior deposição de AuNRs sobre as lâminas de vidro, resultando em bandas mais intensas e definidas com um número menor de camadas de bastões do que o método (1). A diminuição do número de camadas necessárias é uma vantagem pois diminui o tempo para a construção do

substrato. Como exemplo, considerando que cada camada de AuNRs leva cerca de 1 h e 30 min para ser depositada (veja seção 3.4), a diminuição de 10 camadas de AuNRs do método (2) em relação ao (1), leva uma diminuição de 15 horas na preparação dos substratos. Os espectros mostrados na Figura 24 mostram que, devido ao apreciável sinal LSPR apresentado, é também possível a utilização dos substratos com apenas 5 camadas de AuNRs, diminuindo ainda mais o tempo de preparação dos substratos.

4.5. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS FILMES DE NANOBASTÕES DE OURO

A caracterização eletroquímica dos filmes de AuNRs imobilizados foi feita por voltametria cíclica (Figura 25). Essa técnica necessita da utilização de um substrato condutor, o substrato de vidro é então recoberto com FTO, um material semiconductor transparente na região do visível muito utilizado para esse tipo de medida. O objetivo da técnica é avaliar a eficiência do recobrimento da superfície do substrato depois da adição de camadas de AuNRs. No voltamograma obtido previamente à modificação da superfície, observa-se o processo redox do $K_3[Fe(CN)_6]$ com os picos característicos de oxidação em 0,26 V e redução em 0,17 V. No entanto, após a modificação da superfície com MPTMS e AuNRs, a corrente faradaica diminui drasticamente, devido à resistência causada pelas camadas adsorvidas, dificultando a migração dos íons $Fe(CN)_6^{3-}$ em direção à superfície condutora. A corrente bem próxima de zero nos indica um bloqueio quase total da superfície. Tal bloqueio está relacionado à adsorção do MPTMS, que serve para ligar as camadas de AuNRs entre si e também com a superfície do FTO. A presença do MPTMS bloqueia o contato entre as camadas de AuNRs e também entre as AuNRs e o FTO, aumentando a resistência em série até o ponto em que não há mais fluxo de corrente entre o eletrodo de trabalho (FTO) e o par redox em solução.

Figura 25: Voltametria cíclica de 1 mmol L^{-1} de ferricianeto de potássio em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} , utilizando como eletrodo de trabalho um substrato de FTO



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

O aumento do número de deposições de camadas de AuNRs, para a voltametria cíclica, se reflete em bloqueio da transferência de elétrons dos processos de oxi-redução com a superfície do FTO, e então a intensidade da corrente diminui como foi notado na Figura 25. Os resultados de espectroscopia no UV-VIS apresentados nas Figura 23 e Figura 24 mostram o aumento do sinal LSPR com o aumento da deposição de camadas de AuNRs, aliado os resultados de voltametria da Figura 25, nos confirmam a deposição das camadas de AuNRs sobre as lâminas de vidro. Além disso é demonstrado que a adição de camadas de AuNRs afetam tanto o comportamento óptico como o comportamento eletroquímico dos substratos a serem utilizados.

4.6. ESTUDO DA SENSIBILIDADE

Espera-se que uma variação do índice de refração próximo à superfície do material plasmônico faça com que a banda do plasmon sofra deslocamentos de frequência. Por exemplo, com o aumento do índice de refração, espera-se que uma banda LSPR sofra deslocamentos para maiores comprimentos de onda. O estudo da sensibilidade é um experimento extremamente necessário para a aplicação dos substratos na construção de um biossensor, pois é necessário que o substrato seja sensível a mudanças do índice de refração. Essa variação pode ser obtida a

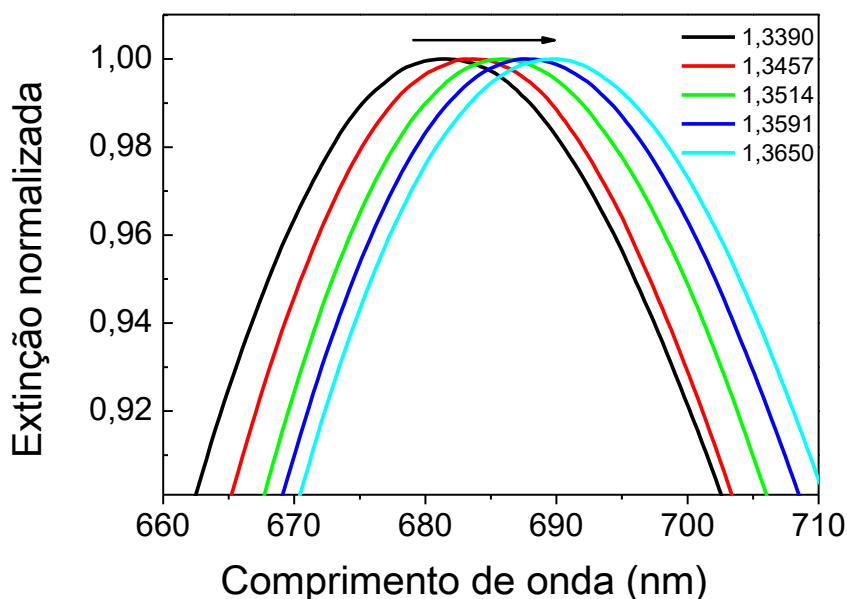
partir de diferentes concentrações de soluções (aquosas de glicose, por exemplo) ou solventes (água, metanol, etanol, tolueno ou mistura de solventes) com índices de refração conhecidos. Conhecida a sensibilidade ao índice de refração, é possível assumir que o substrato será também sensível para detectar alterações do índice de refração causada pela adsorção de proteínas ou pela adsorção de um antígeno sobre um anticorpo imobilizado sobre a superfície do sensor.

A sensibilidade dos substratos LSPR à mudança do índice de refração é encontrada a partir de uma regressão linear de um gráfico com os dados do máximo da banda LSPR em função do índice de refração da solução ou solvente utilizado. A partir do coeficiente angular dessa reta sabemos qual a variação do máximo do LSPR por unidade de índice de refração (RIU), e temos assim sua sensibilidade. Neste projeto, os substratos foram utilizados de duas maneiras diferentes: (1) AuNRs imobilizados em lâminas de vidro (2) AuNRs em suspensão coloidal.

4.6.1. Filmes de AuNRs sobre lâminas de vidro

Na Figura 26 são mostrados os espectros de extinção para um substrato de AuNRs imobilizados em vidro utilizando o método (2) com 5 camadas, veja em 3.4. Após a preparação, os substratos foram imersos em várias soluções de glicose com concentrações diferentes, que, portanto, apresentam diferentes índices de refração. As concentrações foram variadas de 6% m/v até 30% m/v de glicose em água deionizada, cujos índices de refração variaram entre 1,339 até 1,365. A banda do plasmon utilizada para as medidas de sensibilidade foi a banda do plasmon longitudinal, porque ela é mais sensível do que a banda do plasmon transversal pois está em maior comprimento de onda. Os resultados mostrados na Figura 26 indicam um deslocamento da banda do LSPR para maior comprimento de onda com o aumento do índice de refração.

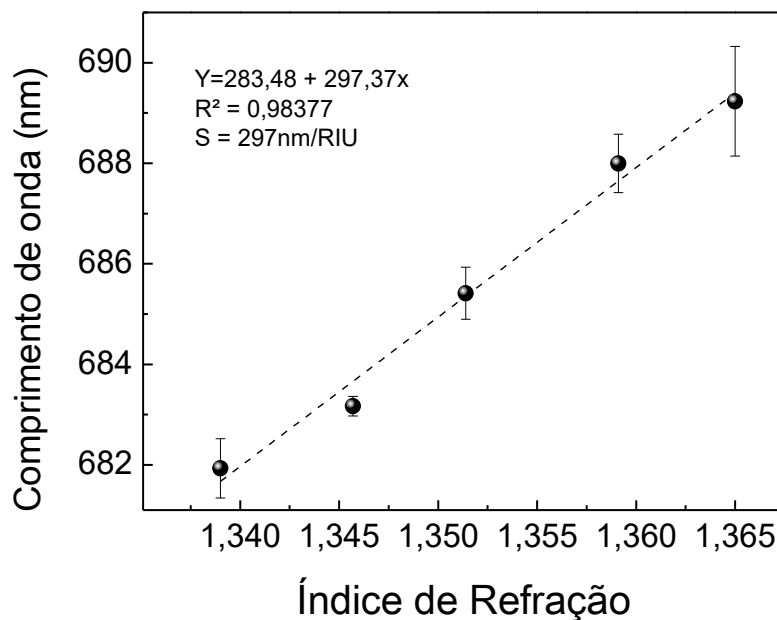
Figura 26: Espectros de extinção do Filme de AuNRs (5 camadas) imerso em soluções de glicose com diferentes índices de refração.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A sensibilidade é dada pela regressão linear apresentada na Figura 27. A curva foi montada a partir da média de três medidas para o máximo de absorção para cada solução de glicose e os respectivos erros são apresentados nas barras em preto.

Figura 27: Gráfico analítico do deslocamento do máximo da banda LSPR em relação ao índice de refração



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

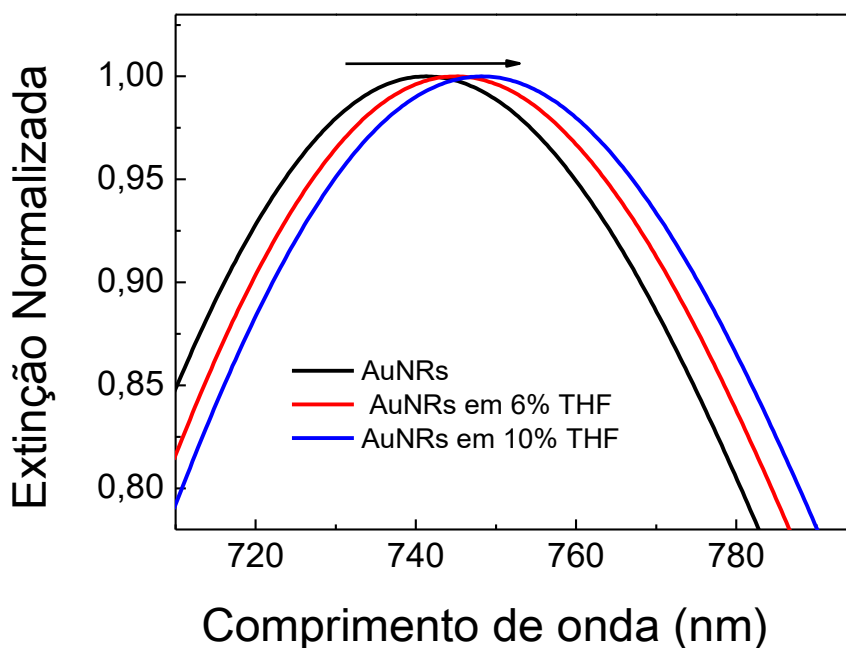
O coeficiente angular da reta mostrado na Figura 27 é 297 nm RIU⁻¹ e representa o valor da sensibilidade para o biossensor. Pelo valor de R² também temos a indicação de um comportamento linear que favorece a aplicação em biossensores, a FOM é de 2,32. Em

comparação a outros substratos construídos, imobilizando AuNPs sobre vidro, este resultado é bem interessante pois possui sensibilidade comparável (CHEN et al., 2007; SILVA et al., 2014).

4.6.2. Suspensões coloidais de AuNRs

Na Figura 28 são mostrados os espectros de extinção para AuNRs redispersos em soluções aquosas com diferentes concentrações de tetrahidrofurano (THF) e, consequentemente, diferentes índices de refração. A banda LSPR utilizada foi a banda do plasmon longitudinal assim como para os AuNRs imobilizados sobre vidro.

Figura 28: Espectros de extinção dos AuNRs em suspensão redispersos em soluções de THF com diferentes índices de refração.

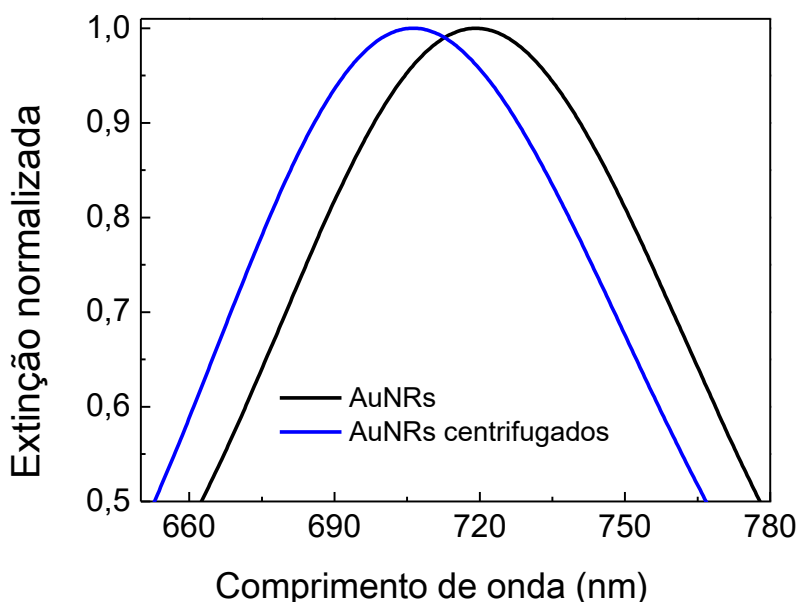


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Assim como nas lâminas de vidro com AuNRs imobilizados, foi observado um deslocamento da banda LSPR para maior comprimento de onda com o aumento da concentração de THF, logo com o aumento do índice de refração. A Figura 28 nos confirma a sensibilidade dos AuNRs em suspensão com a variação do índice de refração, porém não foi possível quantificar essa sensibilidade devido à baixa estabilidade dos AuNRs em suspensão para concentrações maiores do que as apresentadas. Além disso, os AuNRs também são sujeitas à agregação com a adição de diferentes solventes orgânicos (etanol, dimetilformamida, THF), assim como de glicose ou glicerol à suspensão aquosa, o que dificulta o estudo dos deslocamentos do máximo da banda LSPR dos AuNRs nesses sistemas.

Outro fato interessante é que, devido à sensibilidade dos AuNRs em suspensão as mudanças no índice de refração, o excesso de CTAB utilizado na síntese causa deslocamento das bandas LSPR para um maior comprimento de onda. Isso ocorre porque o CTAB causa variação do índice de refração local na superfície dos AuNRs. Para se fazer as modificações dos AuNRs é necessário remover o excesso de CTAB, que bloqueia a superfície das mesmas. Para estudar a influência da retirada do excesso de CTAB por centrifugação dos AuNRs e redispersão em água deionizada nos espectros de LSPR dos AuNRs. Na Figura 29 é mostrado o efeito que o excesso de CTAB causa na banda da LSPR dos AuNRs.

Figura 29: Espectro LSPR dos AuNRs com o excesso de CTAB e após três ciclos de centrifugação (8500 rpm e 30 min) e redispersão em água deionizada, para retirada do excesso de CTAB.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Os AuNRs após o processo de síntese apresentam a banda do plasmon longitudinal mostrada em preto na Figura 29. Após ciclos de centrifugação e redispersão para a retirada do excesso de CTAB, o espectro em azul é observado. O que indica que o excesso de CTAB causa um deslocamento do máximo da banda LSPR para os nanobastões sintetizados. O grande excesso de CTAB, se comparado a outros reagentes presentes da solução de crescimento, o CTAB possui 10^3 vezes mais material, podendo então bloquear a superfície dos AuNRs para posterior modificações. É por este motivo que os AuNRs são centrifugados antes de serem imobilizados sobre lâminas de vidro e antes de terem a superfície modificada em suspensão. A partir destes resultados de sensibilidade frente a mudança no índice de refração é possível aplicar os AuNRs livres ou imobilizados na detecção de biomoléculas adsorvidas em sua

superfície. No entanto, a configuração em filme é uma melhor alternativa para aplicação das AuNPs em biossensores, uma vez que se consegue manter as nanopartículas estáveis, permanecendo com suas propriedades plasmônicas, além de permitir análises com menor volume de amostra em tempo reduzido.

4.7. DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR LSPR

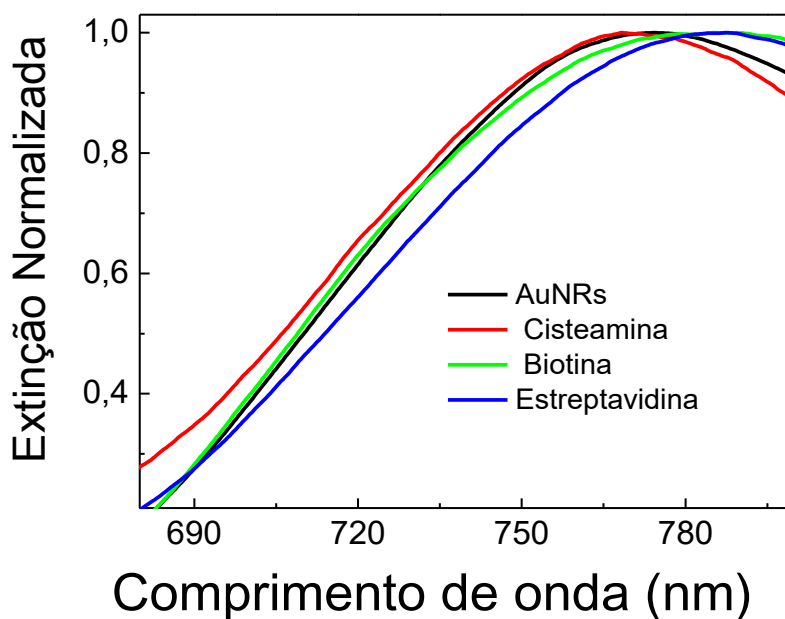
A detecção de biomoléculas foi realizada utilizando dois sistemas de PdC: (1) sistema biotina-estreptavidina; (2) sistema antígeno-anticorpo, utilizando BSA e anti-BSA. Cada sistema necessita de uma química de superfície para tornar os AuNRs seletivos, e cada etapa foi acompanhada por espectroscopia UV-Vis. Foram utilizados os substratos com AuNRs imobilizados sobre vidro e os substratos com AuNRs suspensos.

4.7.1 - Biotina-Estreptavidina

Para a detecção de estreptavidina por LSPR utilizou-se apenas os substratos de filmes de AuNRs sobre vidro construídos pelo método (2) (veja seções 3.4 e 3.7). Na Figura 30 são mostrados os espectros LSPR para cada etapa de modificação na superfície do substrato de acordo com o esquema da Figura 10. Assim como para os estudos de sensibilidade, apenas a banda em maior comprimento de onda, ou seja, a banda do LSPR longitudinal dos AuNRs, foi monitorada. Em preto temos os AuNRs imobilizados sem nenhuma modificação, e é possível observar nos espectros que a cada modificação da superfície há um deslocamento do máximo da banda LSPR para maiores comprimentos de onda em relação a esse espectro. Este deslocamento é devido ao aumento do índice de refração local, ou seja, do índice de refração nas proximidades da superfície dos AuNRs imobilizados.

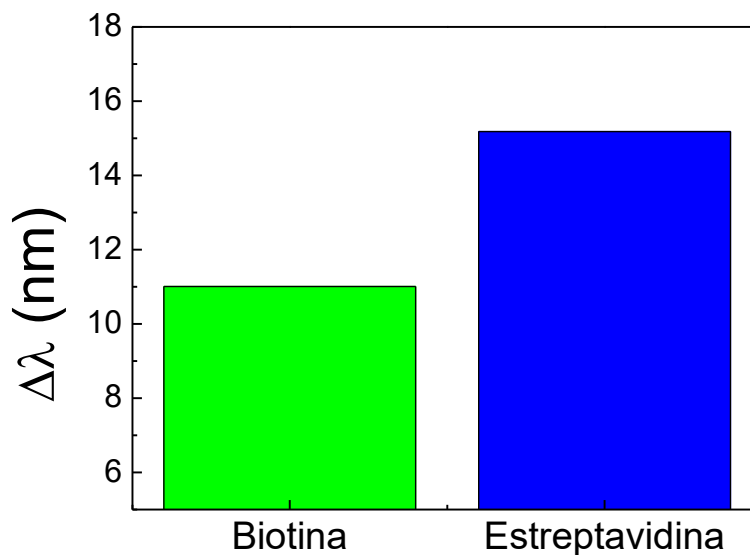
Para uma melhor visualização desses deslocamentos, um gráfico de barras dos deslocamentos do máximo da banda LSPR é apresentado na Figura 31. São mostrados os deslocamentos dos filmes de AuNRs após modificação com biotina, seguida de estreptavidina em relação a superfície dos AuNRs sem nenhuma modificação.

Figura 30: Detecção por LSPR de estreptavidina na superfície de AuNRs immobilizados em superfície de vidro.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 31: Gráfico de barras do deslocamento de biotina e estreptavidina em relação aos AuNRs immobilizados sem modificações na superfície.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Os deslocamentos em relação aos AuNRs com a superfície sem nenhuma modificação são de *ca.* de 11 nm para a biotina e 15 nm para a estreptavidina, como observado na Figura 31. O deslocamento do máximo da banda LSPR ($\Delta\lambda$) é maior para a superfície mais

modificada, como o esperado. Esses deslocamentos são facilmente perceptíveis devido à proximidade da molécula de biotina à superfície dos AuNRs e também ao tamanho da molécula de estreptavidina, pois moléculas grandes fazem com que o índice de refração local varie fortemente com sua adsorção. Por outro lado, o deslocamento entre biotina e estreptavidina é de apenas *ca.* 4 nm; esse resultado pode ser devido à distância que a molécula de estreptavidina está da superfície. Sabe-se que ocorre um decaimento exponencial do campo eletromagnético com o aumento da distância com a superfície, ou seja, quanto mais distante da superfície está a molécula a ser analisada, menor será a sensibilidade do biossensor. Adicionalmente, pode ser observado na Figura 30 que o $\Delta\lambda$ da banda LSPR para a modificação com cisteamina é muito pequeno. Esse resultado é decorrente da cisteamina ser uma molécula pequena e, por isso causa pequenas variações no índice de refração local.

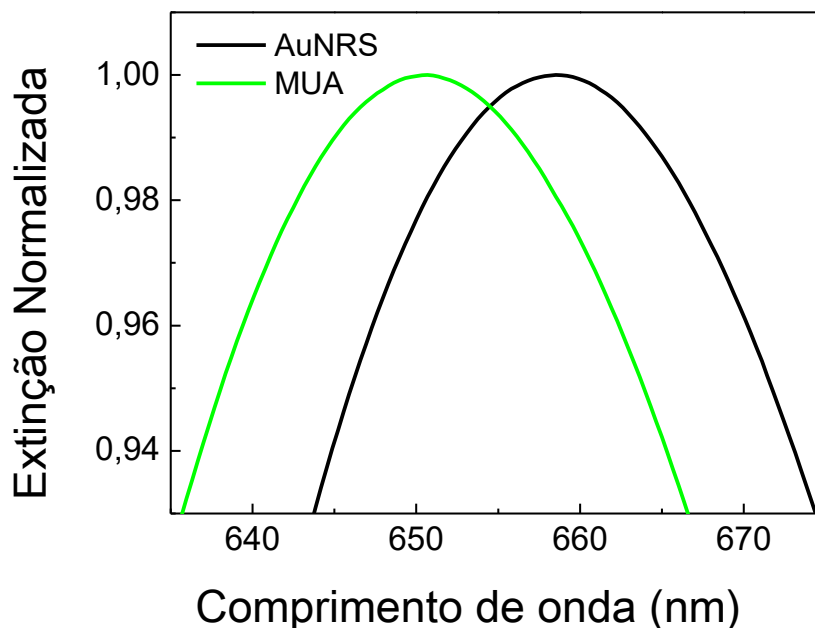
4.7.2. Antígeno – Anticorpo: Detecção de anti-BSA

A detecção Antígeno–Anticorpo foi feita utilizando os substratos de filmes de AuNRs sobre vidro feitos pelo método (2) e também com os AuNRs em suspensão. Assim como para o estudo da interação biotina-estreptavidina, foi monitorada a banda do plasmon longitudinal dos AuNRs, devido sua maior intensidade e maior sensibilidade.

Filmes de AuNRs sobre lâminas de vidro

O procedimento para a detecção de anti-BSA consiste em 4 etapas. Na primeira etapa tem-se a modificação da superfície dos AuNRs imobilizados sobre vidro com MUA, que é um ácido carboxílico com um grupo tiol. O grupo tiol tem grande afinidade pela superfície metálica, devido à forte ligação Au-S. Na Figura 32 é mostrada a superfície dos AuNRs imobilizados sobre vidro, antes e depois da modificação com MUA.

Figura 32: Espectros de extinção da região do plasmon longitudinal dos AuNRs immobilizados sobre vidro e da modificação da superfície dos AuNRs com MUA



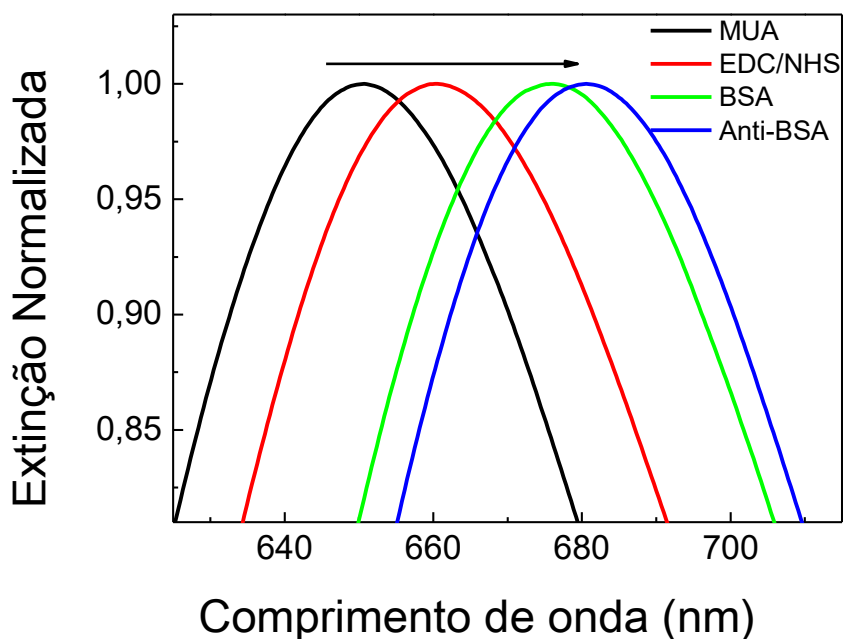
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Acreditava-se que a modificação da superfície com o MUA deslocaria banda LSPR mostrada na Figura 32 para maior comprimento de onda, porém o que foi observado foi um deslocamento para menor comprimento de onda. Existem algumas hipóteses para explicar este deslocamento inesperado: (1) Mesmo após centrifugações para retirada do excesso de CTAB ainda pode existir algum CTAB adsorvido na superfície dos AuNRs. É possível, assim, que uma parte do CTAB ainda esteja ligada aos AuNRs formando uma bicamada (CAO et al., 2012), porém o MUA é capaz de substituir esta camada devido a sua maior interação com Au, o que deveria ter deslocado a banda de LSPR para maior comprimento de onda. Acredita-se que, além do CTAB diretamente adsorvido ainda haja excesso devido ao tempo de exposição dos substratos à suspensão de AuNRs e que, com a modificação com MUA, a bicamada e todo o excesso de CTAB sejam retirados deslocando a banda LSPR para menor comprimento de onda, que pode ter efeito similar ao mostrado na Figura 29, onde o espectro das AuNRs sem excesso de CTAB possui um deslocamento para menor comprimento de onda. (2) O MUA poder aumentar a distância interpartículas no filme de AuNRs, o que significaria que as nanopartículas ainda possuem certa mobilidade após a imobilização. O aumento da distância entre AuNRs diminui o efeito de acoplamento plasmônico entre os AuNRs e deslocamento para menor comprimento de onda da banda LSPR (RECHBERGER et al., 2003). Os resultados

experimentais obtidos até o momento, porém, não permitem decidir entre as duas hipóteses acima, o que exigirá mais experimentos.

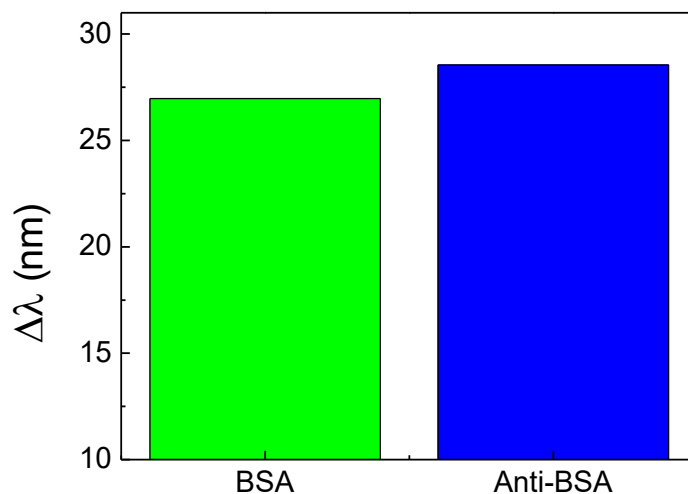
Sendo assim na Figura 33 os espectros LSPR para as diferentes modificações na superfície dos AuNRs imobilizados são apresentados a partir da modificação com MUA. Na Figura 33 é visto um deslocamento do máximo da banda LSPR referente ao plasmon longitudinal dos AuNRs com as sucessivas modificações da superfície realizadas de acordo com o mostrado no esquema da Figura 11, mostrando que as modificações superficiais estão causando variação no índice de refração local. Uma melhor visualização destes deslocamentos pode ser vista no gráfico de barras mostrado na Figura 34.

Figura 33: Detecção de anti-BSA na superfície dos AuNRs imobilizados em vidro.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 34: Gráfico de barras do deslocamento de BSA e Anti-BSA em relação a superfície das AuNRs modificadas com MUA.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

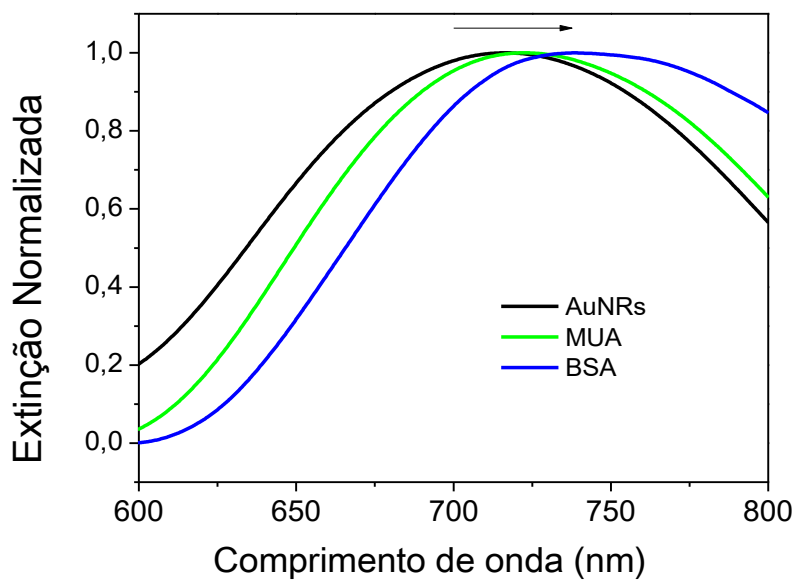
A partir do gráfico de barras mostrado na Figura 34 é possível observar grandes deslocamentos do máximo da banda LSPR com as modificações feitas na superfície dos AuNRs já funcionalizados com MUA. A utilização de EDC/NHS serve para modificar o grupo carboxila do MUA com a molécula de NHS, cujo acoplamento permite a imobilização de biomoléculas que contenham grupamentos amina, como a proteína BSA. O deslocamento para BSA é *ca.* 26 nm, proteínas são moléculas relativamente grandes capazes de variarem em grande extensão o índice de refração local, explicando assim este grande deslocamento. Por outro lado, o tamanho da BSA pode prejudicar a sensibilidade na detecção de anti-BSA, afastando o antígeno anti-BSA da superfície dos AuNRs. Devido ao decaimento exponencial do campo eletromagnético local com o aumento da distância, a sensibilidade diminui de acordo com que a distância entre o analito e a superfície dos AuNRs aumenta. Isto explica o fato do deslocamento entre anti-BSA e BSA é *ca.* 2 nm apenas, no entanto ainda é possível fazer a detecção da molécula de Anti-BSA.

Suspensões coloidais de AuNRs

O procedimento para a detecção de Anti-BSA em suspensões coloidais é o mesmo para os AuNRs imobilizados sobre vidro, exceto com relação às concentrações, que foram adaptadas para evitar agregação dos AuNRs em suspensão. Na Figura 35 são mostrados os espectros

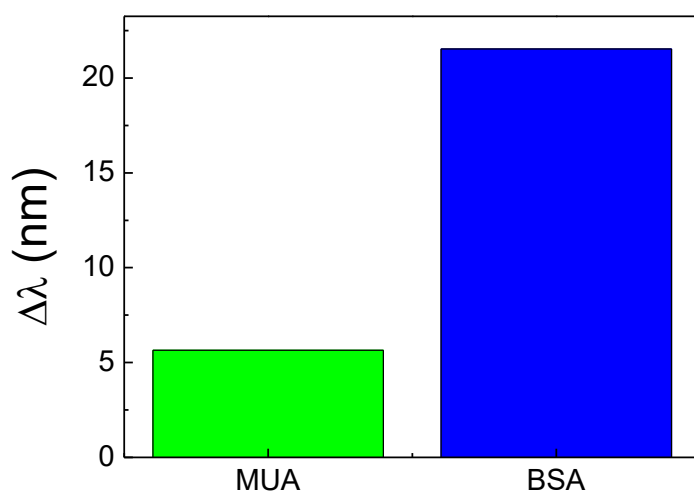
LSPR para diferentes etapas da modificação dos AuNRs até a imobilização de BSA e na Figura 36 o gráfico de barras para os deslocamentos do máximo da banda LSPR em relação aos AuNRs sem modificação.

Figura 35: Espectros LSPR das modificações na superfície dos AuNRs em suspensão até a imobilização de BSA



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

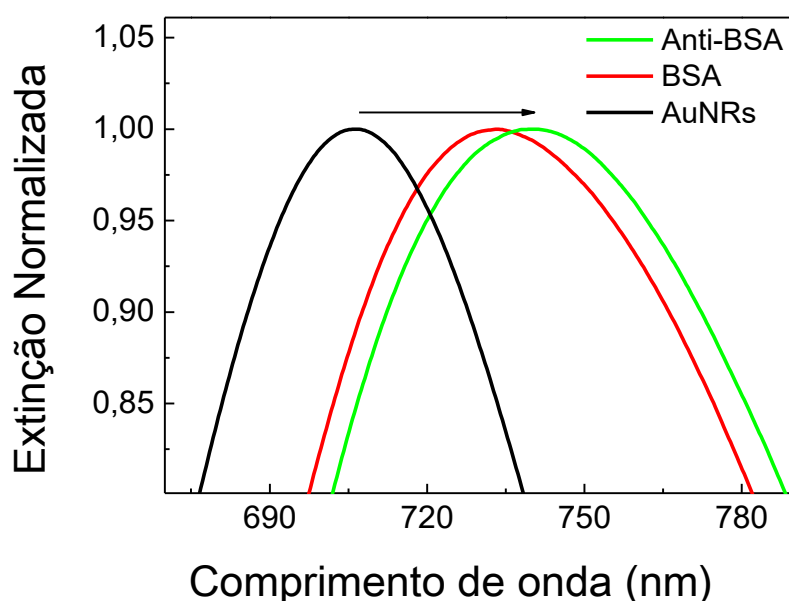
Figura 36: Gráfico de barras do deslocamento do máximo da banda LSPR para MUA e BSA em relação aos AuNRs sem modificações



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A partir do gráfico de barras apresentado na Figura 36, verifica-se um deslocamento menor para o MUA, de 6 nm, e para a proteína BSA de 21 nm em relação aos AuNRs sem modificação da superfície. O deslocamento é maior para BSA devido ao maior tamanho da BSA em relação ao MUA. Na Figura 37 temos a aplicação deste sistema na detecção de Anti-BSA, que foi monitorada pelo deslocamento do máximo da banda LSPR com as modificações sequenciais na superfície dos bastões.

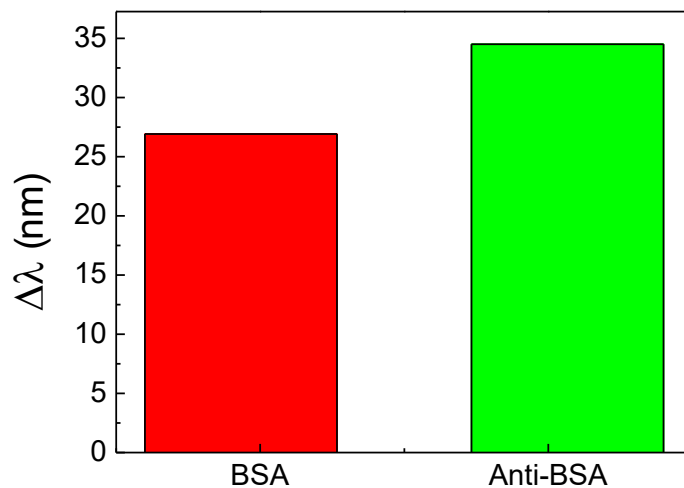
Figura 37: Detecção de Anti-BSA na superfície de AuNRs em suspensão



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Para termos uma melhor dimensão dos deslocamentos causados pelas modificações superficiais na Figura 38 é apresentado um gráfico de barras para tais deslocamentos. O deslocamento do máximo da banda LSPR é de 27 nm para a BSA e 34 nm para o anti-BSA. O deslocamento entre o máximo das bandas LSPR entre as modificações de BSA e anti-BSA foi de 7 nm. Apesar do tamanho das proteínas, tamanho este que interferiu na detecção de anti-BSA utilizando substratos de bastões imobilizados sobre vidro, onde o deslocamento entre as modificações de BSA e anti-BSA foi de apenas 2 nm. Acredita-se que as AuNRs em suspensão sejam mais sensíveis do que quando imobilizadas devido à sua maior área superficial livre para interação quando em suspensão, porém ainda são necessárias medidas quantitativas de sensibilidade para AuNRs em suspensão, para uma melhor comparação entre os substratos.

Figura 38: Gráfico de barras do deslocamento de BSA e Anti-BSA em relação aos AuNRs sem modificação.



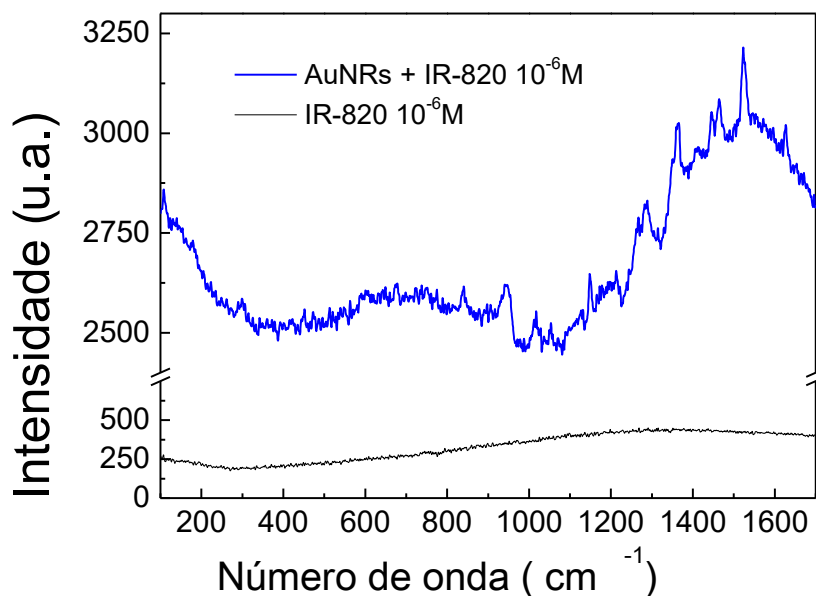
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.8. ATIVIDADE SERS

Para a utilização de AuNPs como substratos para a construção de biossensores SERS é necessário que elas possuam atividade SERS significativa. Na construção de biossensores SERS utilizando o método de detecção extrínseca, há a necessidade da obtenção de um sinal SERS de uma molécula-prova, no caso desse trabalho o corante IR-820, inserido em uma matriz complexa formada pelas modificações da superfície metálica.

Na Figura 39 está apresentada a comparação do espectro Raman para a solução de IR-820 com o espectro SERS do mesmo corante, ambos na concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, excitados em 633 nm, para os AuNRs em suspensão.

Figura 39: Espectro Raman do IR-820 em solução (em preto) e Espectro SERS do IR-820 utilizando os AuNRs em suspensão (em azul), comprimento de onda de excitação do laser em 633nm

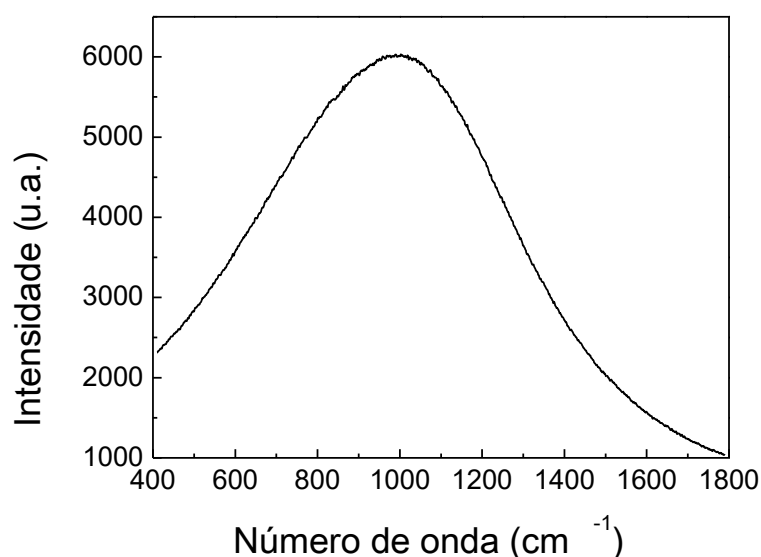


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Para os AuNRs em suspensão uma boa atividade SERS na excitação de 633nm é observada na Figura 39. A excitação em 633 nm foi utilizada devido ao corante IR-820 possuir uma banda de absorção com máximos em 690 nm e 819 nm (NEVES; ANDRADE, 2015) e pouca intensidade de absorção na região de excitação do laser, na tentativa de diminuir efeitos de ressonância e fluorescência. A solução etanólica de IR-820 na concentração $1,0 \mu mol L^{-1}$ não apresenta intensidade Raman significativa, além disso não é possível a visualização de nenhuma banda vibracional característica do corante. Já com a adsorção do corante na superfície dos AuNRs esse sinal é bastante intensificado, além de que não há nenhuma mudança significativa das bandas do corante em relação ao espectro obtido em solução etanólica em concentrações maiores que $1,0 \mu mol L^{-1}$. Este resultado mostra a possível aplicação dos AuNRs em suspensão para aplicação em biossensores com o SERS como técnica de detecção.

Como a detecção SERS foi por meio de um imunossensaio sanduíche, tanto os AuNRs em suspensão como os AuNRs imobilizados sobre o vidro, devem possuir atividade SERS apreciável. Na Figura 40 é apresentado o espectro SERS do IR-820 $10 \mu mol L^{-1}$ sobre os filmes de AuNRs imobilizados sobre vidro, na excitação de 785nm.

Figura 40: Espectro SEF de IR-820 adsorvido sobre os filmes de AuNRs imobilizados



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A Figura 40 nos mostra um espectro característico de fluorescência ao invés de um espectro característico do espalhamento Raman. Ou seja, temos um espectro SEF em vez de um espectro SERS, isto acontece pelo fato de estarmos trabalhando (excitação em 785nm) na região onde o IR-820 é ressonante. Sendo assim o sinal de fluorescência do corante se mostrou muito mais intenso do que o sinal SERS. Trabalhando com o laser em excitação em 633 nm não foi possível obter nenhum sinal dos filmes de AuNRs. Além disso, como esses substratos são muito sensíveis à radiação, não foi possível aumentar a potência da radiação excitante para a obtenção de espectros SERS. Foi ainda testado o corante Rodamina 6G e o mesmo também não apresentou nenhum sinal em nenhuma das duas radiações excitantes, devido aos mesmos problemas de sensibilidade à radiação por parte dos substratos.

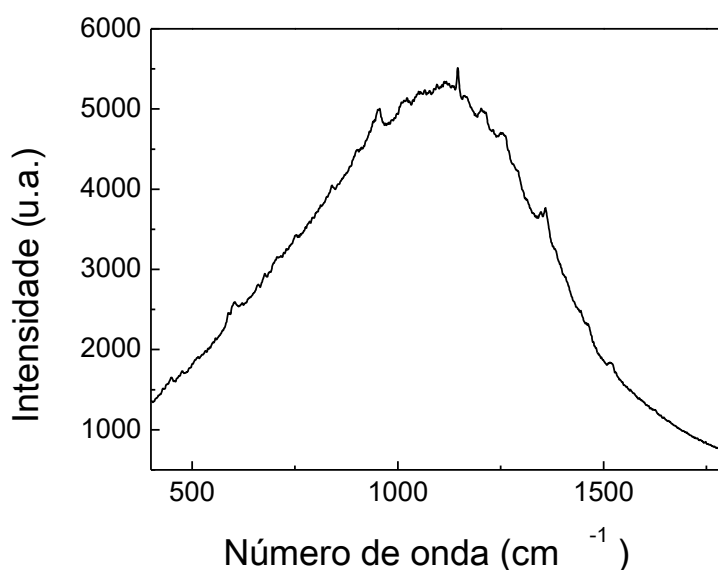
O sinal de fluorescência mais intenso que o sinal SERS permite que o material desenvolvido seja utilizado como uma ferramenta de diagnóstico por SEF, assim como o SERS. Para verificar isto, realizou-se a detecção de Anti-BSA utilizando os substratos construídos no presente trabalho.

4.9. DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR SERS/SEF

Para a detecção SERS/SEF foi utilizado um imunoensaio sanduíche apresentado na seção 3.8 e na Figura 12. Os substratos utilizados foram os AuNRs imobilizados sobre vidro, construídos conforme o método (2) (veja em 3.4). Pelos resultados da detecção de anti-BSA

por LSPR (veja em 4.8.2), foi verificada a presença de Anti-BSA na superfície dos AuNRs imobilizados, que é de extrema necessidade para a utilização deste imunensaio sanduíche. Para esta detecção preparou-se a outra parte do substrato SERS/SEF que consiste nos AuNRs com BSA imobilizada com a molécula repórter, o corante IR-820. Na Figura 41 temos o espectro SERS/SEF do AuNRs em suspensão modificados com BSA e IR-820.

Figura 41: Espectro SERS/SEF dos AuNRs em suspensão modificados com BSA e com a molécula repórter. Laser com excitação em 785nm



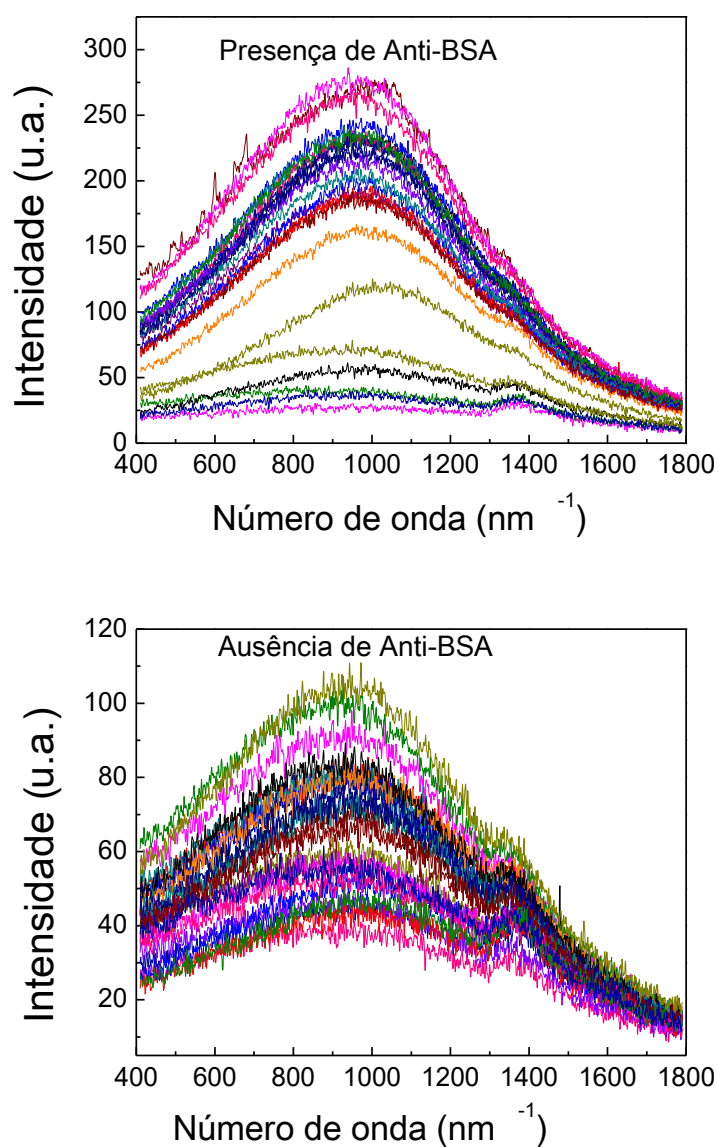
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A Figura 41 nos mostra um espectro com intensidade de fluorescência muito maior que a intensidade SERS observada sobre o fundo de fluorescência. Este resultado confirma a presença do corante IR-820 na superfície das AuNRs, ou seja, esses AuNRs podem ser utilizados para a detecção de Anti-BSA, utilizando SERS. A excitação em 785 nm foi escolhida no intuito de utilizar a ressonância do IR-820 para obtenção de uma maior intensidade SERS, porém a fluorescência é um grande interferente. Por outro lado, não foi obtido sinal SERS significativo utilizando a excitação em 633 nm utilizada para outros experimentos.

O motivo para o baixo sinal SERS pode estar associado à presença de uma monocamada de MUA sobre os AuNRs, que pode impedir que as moléculas de IR-820 adsorvam-se na superfície dos bastões. Essa situação aumenta a distância entre o corante e a superfície dos AuNRs, o que pode permitir que o campo eletromagnético local intensificado nas proximidades das nanopartículas intensifique o sinal de fluorescência. Quando uma molécula fluorófora está adsorvida na superfície de uma nanopartícula metálica, esta tem sua fluorescência suprimida, devido ao acoplamento com o SP, de maneira que um fluxo de energia do fluoróforo para o SP é gerado, suprimindo a fluorescência. No entanto, quando uma camada

de um semicondutor ou isolante é formada sobre a superfície das nanopartículas, a molécula fluorescente não fica adsorvida diretamente na superfície metálica e assim sofrerá apenas ação do aumento do campo eletromagnético local e terá seu sinal de fluorescência intensificado (AROCA, 2006). Com a presença da molécula marcadora na superfície dos AuNRs em suspensão, os substratos de filmes de AuNRs modificados com anti-BSA e sem anti-BSA foram imersos nessa suspensão. Os espectros de um mapeamento SERS com 25 pontos nesses substratos são mostrados na Figura 42.

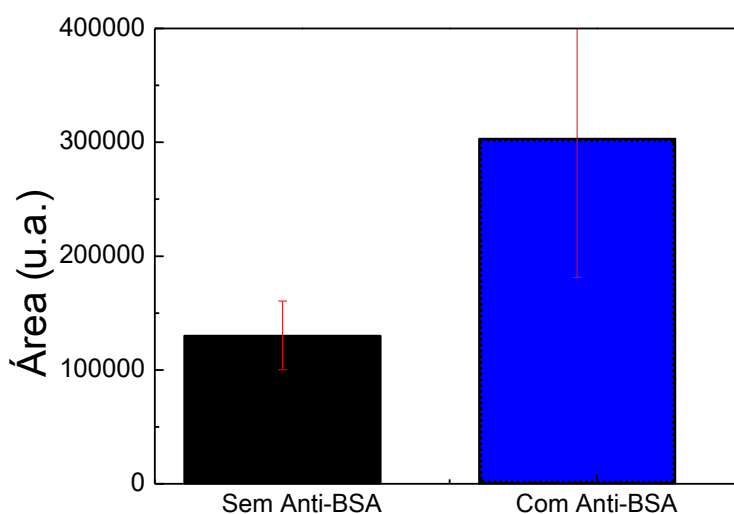
Figura 42: Espectros SERS/SEF dos substratos na presença e na ausência de Anti-BSA no substrato de vidro. Laser com excitação em 785nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

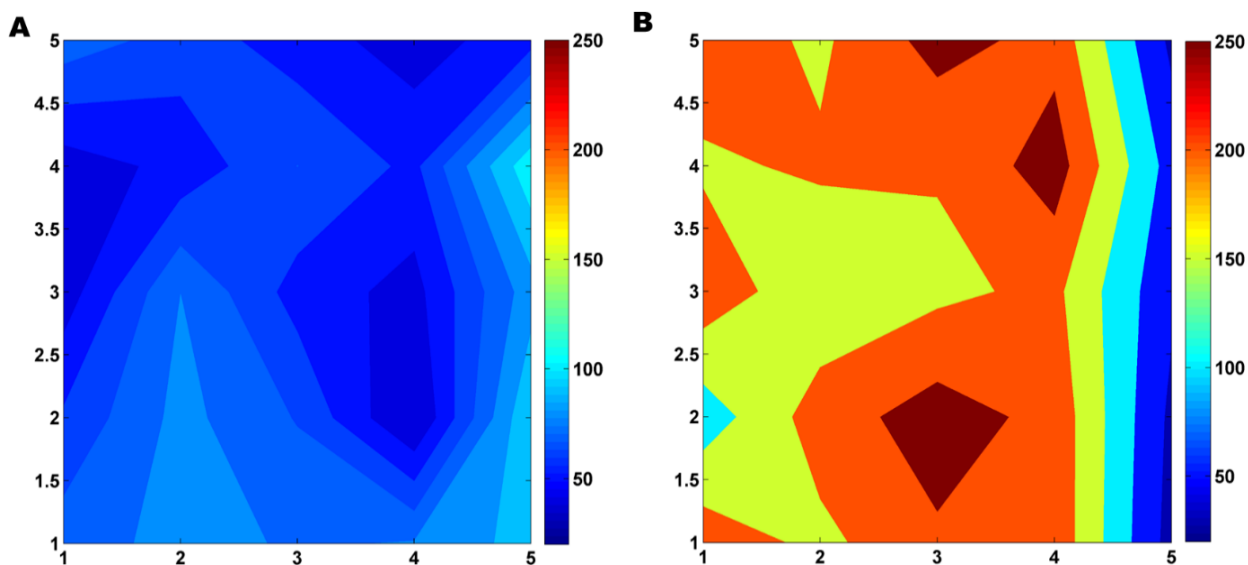
Os espectros de fluorescência se mostram muito mais intensos que os espectros SERS, como observado na Figura 41. Utilizando outras radiações não foi possível obter nenhum espectro, seja de SERS ou de fluorescência. Na presença do anti-BSA o sinal de fluorescência é mais intenso na média do que na ausência do anticorpo; isso indica que a interação entre BSA e anti-BSA faz com que os AuNRs em suspensão fiquem adsorvidos na superfície dos filmes de AuNRs. Apesar dos substratos serem lavados após a imersão na suspensão de AuNRs, ainda há AuNRs adsorvidos na superfície (resultante da modificação prévia do vidro), explicando assim o baixo sinal nos substratos onde não há anti-BSA. Para uma melhor visualização dessas intensidades um gráfico de barras da média das áreas de todos os espectros foi feito e é mostrado na Figura 43e na Figura 44 é mostrado um mapeamento da banda de fluorescência do IR-820, onde é possível observar que na presença de anti-BSA o sinal SEF médio é muito mais intenso do que em sua ausência.

Figura 43: Gráfico de barras para o somatório da área dos espectros da Figura 42.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 44: Mapeamento SEF de 25 pontos dos espectros mostrados na Figura 42.



(A) sem anti-BSA (B) com anti-BSA

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

As Figura 43 e 44 nos mostram que a intensidade dos espectros na presença de anti-BSA é três vezes maior do que na ausência do mesmo. Esse resultado indica que é possível realizar a detecção de anti-BSA com esse procedimento. A possibilidade de detecção do anticorpo pode ser entendida considerando que a interação entre o anti-BSA e a BSA faz com que AuNRs modificados com o IR-820 adsorvam-se melhor na superfície dos filmes do que na ausência dessa interação. A detecção de anti-BSA indicou que o SEF também pode ser utilizado para diagnóstico.

4.10. TEMPO NECESSÁRIO PARA CADA DETECÇÃO

Na Tabela 1 são mostrados os tempos para a construção e análise de cada substrato utilizado como biossensor construído neste trabalho, a fim de mostrar as vantagens na utilização desses substratos em relação aos seus tempos de análise, o que é de extrema importância para sua aplicação como biossensores de diagnóstico preliminar. Os tempos são sempre considerados em termos dos maiores tempos para cada procedimento.

Tabela 1: Tempo de análise para cada tipo de substrato e analito.

Tipo de biossensor	Analito	Tempo para construção do substrato	Tempo de adsorção analito	Tempo de análise
AuNRs imobilizados	Estreptavidina	104 h	15 min	LSPR < 1min
AuNRs imobilizados	Anti-BSA	160 h	12 h	LSPR < 1 min
AuNRs em suspensão	Anti-BSA	28 h	1 h	LSPR <1 min
AuNRs imobilizados + AuNRs em suspensão	Anti-BSA com IR8-820 como molécula marcadora	188 h	15 h	Mapeamento Raman < 1h

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O tempo de construção foi alto, mas é interessante ressaltar que esse tempo é grande devido à necessidade de garantir a formação de monocamadas dos diversos modificadores, como MUA, cisteamina, e MPTMS. No entanto, o tempo de análise após a preparação do dispositivo foi em geral muito curto. Por exemplo, para as detecções utilizando LSPR, em menos de 1 minuto é feita a análise no espectrômetro. Nota-se também, que o tempo necessário para adsorção do analito na superfície do substrato depende do analito e do substrato utilizado. Considerando que os substratos sejam construídos previamente, os tempos de adsorção do analito + análise no equipamento são pequenos. É possível diminuir ainda mais esses tempos, como por exemplo diminuindo o tempo de adsorção do analito, através de medidas em tempo real, obtidas durante a adsorção do analito, até que não haja deslocamentos na banda LSPR ou aumento na intensidade de fluorescência ou Raman. Desta forma, pode-se determinar o tempo necessário para saturação da superfície devido a adsorção do analito. Sendo assim, os substratos descritos podem ser utilizados como biossensores com rapidez de análise, baixo custo e simples utilização.

5. CONCLUSÕES

Foi possível sintetizar e caracterizar os surfactantes CTPAB e CTBAB com alta pureza. A utilização do CTPAB como direcionador de crescimento para a síntese de AuNBs foi realizada com êxito. Os AuNRs apresentam alto rendimento, boa homogeneidade e reprodutibilidade com o controle fino da temperatura.

Estes AuNRs foram adsorvidos em lâminas de vidro, sendo demonstrado que este processo pode ser otimizado através de tratamento térmico das lâminas de vidro previamente à deposição. Resultados de LSPR e voltametria cíclica de bloqueio confirmaram a presença dos AuNRs na superfície das lâminas de vidro. Este material apresentou sensibilidade LSPR de 283 nm RIU⁻¹. Em virtude disto, foi possível utilizar os substratos de AuNRs imobilizados em vidro e em suspensão na detecção de biomoléculas PdC como Estreptavidina e anti-BSA por LSPR.

Adicionalmente, demonstramos que devido às modificações de superfície dos AuNRs, a técnica de SEF foi mais apropriada que SERS como um método de diagnóstico de anti-BSA por imunensaio sanduíche, utilizando da fluorescência do IR-820. Conclui-se portanto que foram construídos biossensores de baixo custo, com rapidez e simplicidade de análise que são promissores para a detecção de diversas doenças.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar deste trabalho mostrar detecções eficientes por LSPR e SEF de biomoléculas, consiste em apenas uma das etapas para o estudo e a construção de biossensores de baixo custo, rapidez e simplicidade de análise com alto desempenho. A necessidade de biossensores de diagnóstico preliminar ainda é grande, principalmente em países em desenvolvimento, que possam ser utilizados no campo, em áreas de difícil acesso ou com saneamento básico precário. A construção de dispositivos miniaturizados e de alto desempenho utilizando biossensores plasmônicos e sua utilização no campo ainda é um objetivo longe de ser alcançado. No entanto o estudo minucioso dos fenômenos e técnicas utilizadas na construção de biossensores plasmônicos é de extrema necessidade para alcançar tais objetivos.

Nesse contexto estão centradas algumas perspectivas futuras como:

- Otimização da síntese de AuNBs, além da utilização de outros surfactantes para a síntese de AuNPs de formas e tamanhos diferentes. Utilização de reagentes naturais ou biodegradáveis na síntese de AuNPs também é interessante no ponto de vista econômico e ambiental.
- Caracterização avançada dos substratos: é de extrema importância para o melhor conhecimento de fenômenos como LSPR e necessária para aumentar a eficiência dos biossensores construídos.
- Otimização dos processos na construção dos substratos, para que se tenha substratos homogêneos e que sejam reprodutíveis. Padronização na obtenção de espectros LSPR e SERS no intuito de obter análises mais reprodutíveis.
- Construção de biossensores seletivos: biossensores com proteção superficial minimizam a adsorção não específica e sendo assim podem ser utilizados em matrizes complexas. É uma etapa necessária para a utilização dos biossensores em experimentos a partir de material biológico coletado.

REFERÊNCIAS

- ABALDE-CELA, S. et al. Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. Suppl 4, p. S435–S450, 2010.
- ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. ANOMALOUSLY INTENSE RAMAN-SPECTRA OF PYRIDINE AT A SILVER ELECTRODE. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 15, p. 5215-5217, 1977.
- AROCA, R. **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 2006.
- BANTZ, K. C. et al. Recent progress in SERS biosensing. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 24, p. 11551-11567, 2011.
- BELL, S. E. J.; SIRIMUTHU, N. M. S. Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 5, p. 1012-1024, 2008.
- BROLO, A. G. Plasmonics for future biosensors. **Nature Photonics**, v. 6, n. 11, p. 709-713, 2012
- BROLO, A. G. et al. Development of plasmonic substrates for biosensing. 2008.
- CAO, J. et al. Effective surface modification of gold nanorods for localized surface plasmon resonance-based biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 169, n. 0, p. 360-367, 2012.
- CAO, J.; SUN, T.; GRATTAN, K. T. V. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 195, n. 0, p. 332-351, 2014.
- CHEN, C.D. et al. Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 6, p. 926-932, 2007
- CHEN, H. et al. Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, n. 10, p. 5233-5237, 2008.
- CONDE, J. et al. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, p. 48, 2014.
- DE LEEBEECK, A. et al. On-chip surface-based detection with nanohole arrays. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4094-4100, 2007.
- DE SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências 2010.
- DORIA, G. et al. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 2, p. 1657-1687, 2012.

- EDWARDS, P. P.; THOMAS, J. M. Gold in a Metallic Divided State—From Faraday to Present-Day Nanoscience. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 29, p. 5480-5486, 2007.
- ENDO, T. et al. Multiple Label-Free Detection of Antigen–Antibody Reaction Using Localized Surface Plasmon Resonance-Based Core–Shell Structured Nanoparticle Layer Nanochip. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 18, p. 6465-6475, 2006.
- ENGLIENNE, P. Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes. **Analyst**, v. 123, n. 7, p. 1599-1603, 1998.
- ESCOBEDO, C. et al. Quantification of ovarian cancer markers with integrated microfluidic concentration gradient and imaging nanohole surface plasmon resonance. **Analyst**, v. 138, n. 5, p. 1450-1458, 2013.
- FAN, M.; ANDRADE, G. F. S.; BROLO, A. G. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 693, n. 1–2, p. 7-25, 2011.
- FAN, M.; BROLO, A. G. Silver nanoparticles self assembly as SERS substrates with near single molecule detection limit. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 11, p. 7381-7389, 2009.
- FAN, M. et al. Silver Nanoparticles on a Plastic Platform for Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 15, p. 6350-6352, 2010.
- FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 147, p. 145-181, 1857.
- FARIA, D. L. A. D.; TEMPERINI, M. L. A.; SALA, O. Vinte anos de efeito SERS. **Química Nova**, v. 22, p. 541-552, 1999.
- FERREIRA, J. et al. Attomolar Protein Detection Using in-Hole Surface Plasmon Resonance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 436, 2009.
- FREESTONE, I. et al. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 270-277, 2007.
- FRENS, G. Controlled Nucleation for Regulation of Particle-Size in Monodisperse Gold suspensions. **Nature-Physical Science**, v. 241, n. 105, p. 20-22, 1973.
- GRAHAM, D.; GOODACRE, R. Chemical and bioanalytical applications of surface enhanced Raman scattering spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 5, p. 883-884, 2008.
- GREEN, N. M. Avidin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 29, p.85-133, 1975.
- HAES, A.; VAN DUYN, R. A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, n. 7-8, p. 920-930, 2004.

HAES, A. J. et al. Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 7, p. 2264-2271, 2005.

HAES, A. J.; VAN DUYNNE, R. P. A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 35, p. 10596-10604, 2002.

HAMMOND, J. L. et al. Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries. **Biosensors**, v. 4, n. 2, p. 172-188, 2014.

HOMOLA, J. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 462-493, 2008.

HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 54, n. 1-2, p. 3-15, 1999.

HOWES, P. D.; RANA, S.; STEVENS, M. M. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 11, p. 3835-3853, 2014.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**. v.63 p.1247, 1991.

JEANMAIRE, D. L.; VANDUYNE, R. P. Surface Raman Spectroelectrochemistry .1. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic-amines Adsorbed on Anodized Silver Electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 1-20, 1977.

KELLY, K. L. et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668-677, 2002.

KNEIPP, J.; KNEIPP, H.; KNEIPP, K. SERS-a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 5, p. 1052-1060, 2008.

KOU, X. S. et al. Growth of gold bipyramids with improved yield and their curvature-directed oxidation. **Small**, v. 3, n. 12, p. 2103-2113, 2007.

KRESS-ROGERS, E. **Handbook of Biosensors and Electronic Noses. Medicine Food and Environment**. New York: CRC Press, 1997.

KRETSCHMANN, E.; RAETHER, H. Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. **Zeitschrift für Naturforschung A**. v.23 p.2135, 1968.

LE RU, E. C. et al. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 37, p. 13794-13803, 2007.

- LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects**. Amsterdam: Elsevier, 2009.
- LI, N.; ZHAO, P.; ASTRUC, D. Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 7, p. 1756-1789, 2014.
- LOMBARDI, J. R.; BIRKE, R. L. The theory of surface-enhanced Raman scattering: **The Journal of Chemical Physics**. v.136 p.144704. 2012.
- LOUREIRO, W. G.; HASSELMANN, M. H.; GASSER GOUVÊA, T. Panorama dos estudos sobre nutricao e doencas negligenciadas no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 39, 2011.
- MACLAUGHLIN, C. M. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering Dye-Labeled Au Nanoparticles for Triplexed Detection of Leukemia and Lymphoma Cells and SERS Flow Cytometry. **Langmuir**, v. 29, n. 6, p. 1908-1919, 2013.
- MAYER, K. M.; HAFNER, J. H. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 6, p. 3828-3857, 2011.
- MCNAY, G. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. **Applied Spectroscopy**, v. 65, n. 8, p. 825-837, 2011.
- MENEZES, J. W. et al. Large-Area Fabrication of Periodic Arrays of Nanoholes in Metal Films and Their Application in Biosensing and Plasmonic-Enhanced Photovoltaics. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 22, p. 3918-3924, 2010.
- MONTEIRO, J. P. et al. SPR based biosensor using surface relief grating in transmission mode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 174, n. 0, p. 270-273, 2012.
- MURRAY, W. A.; BARNES, W. L. Plasmonic Materials. **Advanced Materials**, v. 19, n. 22, p. 3771-3782, 2007.
- NEVES, T. B. V.; ANDRADE, G. F. S. SERS Characterization of the Indocyanine-Type Dye IR-820 on Gold and Silver Nanoparticles in the Near Infrared. **Journal of Spectroscopy**, p. 9, 2015.
- NIKOUBAKHT, B.; EL-SAYED, M. A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 10, p. 1957-1962, 2003.
- O'CONNELL, D. Neglected Diseases. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 157-157, 2007.
- OTTO, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. **Zeitschrift für Physik**, v. 216, n. 4, p. 398-410, 1968.
- PÉREZ-LÓPEZ, B.; MERKOÇI, A. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 625-639, 2011.

PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8-24, 2011.

PORTER, M. D. et al. SERS as a bioassay platform: fundamentals, design, and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 5, p. 1001-1011, 2008.

QIAN, X. M. et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 83-90, 2008.

RECHBERGER, W. et al. Optical properties of two interacting gold nanoparticles. **Optics Communications**, v. 220, n. 1-3, p. 137-141, 2003.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2°. Editora Unesp, 1996.

SHARMA, B. et al. SERS: Materials, applications, and the future. **Materials Today**, v. 15, n. 1-2, p. 16-25, 2012.

SILVA, A. L. C. M. D. et al. SPR biosensors based on gold and silver nanoparticle multilayer films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 928-934, 2014.

STEWART, M. E. et al. Nanostructured Plasmonic Sensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 494-521, 2008.

TSENG, J.-Y.; LIN, M.-H.; CHAU, L.-K. Preparation of colloidal gold multilayers with 3-(mercaptopropyl)-trimethoxysilane as a linker molecule. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 182, n. 1-3, p. 239-245, 2001.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. 0, p. 55-75, 1951.

TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184-3196, 2013.

VALSECCHI, C.; BROLO, A. G. Periodic Metallic Nanostructures as Plasmonic Chemical Sensors. **Langmuir**, v. 29, n. 19, p. 5638-5649, 2013.

VELUSAMY, V. et al. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 2, p. 232-254, 2010.

WILLETS, K. A.; VAN DUYN, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 267-297, 2007.