

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO EM QUÍMICA

Linus Pauling de Faria Peixoto

Síntese e caracterização de nanopartículas anisotrópicas de Au para a construção de biossensores plasmônicos

Juiz de Fora

2019

Linus Pauling de Faria Peixoto

Síntese e caracterização de nanopartículas anisotrópicas de Au para a construção de biossensores plasmônicos

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

Orientador: Professor Doutor Gustavo Fernandes Souza Andrade.

Coorientadora: Professora Doutora Jacqueline Ferreira Leite Santos (UFRGS)

Juiz de Fora

2019

Dedico este trabalho ao meu filho, Matheus, por todo amor incondicional que trouxe à minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus porque sem sua proteção e orientação nada seria de mim.

Ao meu filho, Matheus, presente que ganhei durante essa caminhada, presente de Deus como diz seu nome. Me ensinou que devo aproveitar todos os momentos da vida, que tudo passa rápido e não devemos perder nada. Me mostrou que agora sou um exemplo, não posso desistir jamais, tudo é por você. Mostrou que mesmo quando nada está indo bem, um sorriso muda tudo e nos dá força, por ser a alegria da minha vida. Obrigado por me fazer o melhor de mim, por gerar todo esse amor em meu coração.

À Gabriela, minha companheira de caminhada, de vida, laboratório, paternidade, simplesmente companheira de tudo. Obrigado por sempre me levantar quando precisei, por estar sempre ao meu lado, pelo amor, apoio, carinho, leituras de artigos, tese, resumos e afins. Por ser a melhor mãe do mundo e me ajudar ser o melhor pai possível. Obrigado.

Aos meus pais Aparecida e Júlio por todos ensinamentos da vida, por serem meus exemplos, devo tudo a vocês. Obrigado por me dar todo apoio quando precisei, todas as condições para que eu seguisse meus sonhos e o meu caminho e nunca deixarem de acreditar em mim. Por toda ajuda com o Matheus quando eu e Gabriela precisamos trabalhar ou estudar. Por último, mas não menos importante, por todo amor e carinho.

Aos meus irmãos, Aleksey e Lawrence, por todo apoio e ajuda que sempre me deram. Por também serem meus exemplos. Pelo amor e carinho que sempre tiveram comigo e por sempre acreditarem em mim. As minhas cunhadas, Renata e Karolinne, minhas sobrinhas, Alice e Ana Luiza, por todo carinho, amizade e amor que sempre tivemos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade por todo ensinamento durante esses quase 9 anos de convivência, ou melhor, amizade, desde a iniciação científica. Agradeço pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela paciência, por todas as correções e ajuda que sempre prestou. Por todo apoio com a chegada do Matheus, você foi muito importante para nós.

A minha coorientadora Profa. Dra Jacqueline Ferreira Leite Santos pela grande oportunidade de trabalharmos juntos, todos ensinamentos passados, toda ajuda, e toda paciência nas correções que sempre enviamos de última hora. Agradeço por ter aberto as portas de seu laboratório, LAMAI, para realização de experimentos.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Sant' Ana e à Profa. Dra Celly Mieko Shinohara Izumi pelos ensinamos passados, pelas discussões nas reuniões de grupo e por colaborar com minha formação.

Aos alunos de iniciação que trabalharam comigo, Paulo Henrique, Hudson e João Marcos, pela amizade e parceria durante esses anos, por acreditarem nos meus projetos e ajudarem no meu desenvolvimento também como coorientador.

Aos amigos do LabNano, agradeço por toda amizade durante esses tantos anos. Por todos momentos, sejam discussões calorosas ou boas risadas. Por todo incentivo e apoio. Por ajudarem nesses anos de caminhada. Aos antigos participantes também agradeço, em especial, Aline e Bruno, que desde o início estiveram sempre ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Marcos José Leite Santos e todo grupo LAMAI por todo auxílio em Porto Alegre e toda hospitalidade.

Aos companheiros do prédio de ciência de Materiais, em especial aos membros do Laboratório de Eletrônica Orgânica pela amizade e companheirismo. A todos funcionários do prédio que sempre colaboram para manter tudo em ordem para nós.

À Profa. Dra. Fernanda Irene Bombonato, ao Dr. Mathias Prado Pereira, que iniciou a síntese dos surfactantes comigo, à M. Rafaela de Souza Martins, que me acompanhou durante todo o doutorado ajudando na síntese e caracterização de todos os surfactantes. A todos do laboratório NECSO.

A todos colegas e ex-colegas de Departamento de Química e ICE por ajudarem na minha formação.

Ao meu amigo e parceiro de estudos Pedro por todo companheirismo sempre.

À Profa. Dra. Rosana Colombara por ter me indicado para fazer iniciação com o Prof. Gustavo, em meados de 2010.

Aos membros do laboratório NUPIS pela ajuda no preparo das soluções tampão, em especial ao Prof. Dr. Renato Camargo Matos por ceder os reagentes e equipamentos.

Ao pesquisador Dr. Bráulio Soares Archanjo da Divisão de Materiais do INMETRO pelas microscopias eletrônicas de transmissão e varredura obtidas e pela oportunidade de utilizar os microscópios FEI Magellan e FEI Tecnai Spirit. À M. Flávia Campos Marques e à M. Moyra Freitas Viera pela ajuda na obtenção das micrografias.

Ao Dr. Humberto de Mello Brandão da EMBRAPA Gado de Leite pelo acesso ao microscópio de força atômica e à M. Moyra Freitas Vieira pela obtenção das imagens de microscopia de força atômica.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho ou para minha formação acadêmica.

A CAPES pela bolsa de estudos durante o doutorado.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro.

“A satisfação de uma curiosidade é uma das maiores fontes de felicidade na vida.”

(Linus Carl Pauling)

RESUMO

A presente tese de doutorado teve como objeto de estudo a síntese e caracterização de nanopartículas anisotrópicas de Au (AuNPs) e sua aplicação como biossensores plasmônicos utilizando a ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR), espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS) e fluorescência intensificada por superfície (SEF). Foram sintetizadas três diferentes nanoestruturas de Au: Nanobastões (AuNRs); nanobipirâmides (AuNBs) e nanogalhos (AuNGs), utilizando o método de crescimento por partículas nucleadoras. Essas AuNPs anisotrópicas foram caracterizadas por espectroscopia no UV-VIS e microscopias eletrônica de varredura e transmissão. AuNRs apresentaram maior rendimento em suas preparações e, portanto, foram as nanoestruturas utilizadas na construção dos biossensores. Biossensores utilizando a técnica LSPR foram preparados em duas configurações diferentes. AuNRs em suspensão (S-AuNRs) e imobilizados sobre lâminas de vidro (AuNRs-chip). A imobilização em vidro foi realizada utilizando o 3-mercaptopropiltrimetoxisilano como molécula ligante entre o vidro/AuNRs e entre os AuNRs/AuNRs; esses substratos foram caracterizados por UV-VIS e microscopia de força atômica. Os S-AuNRs e AuNRs-chip apresentaram sensibilidades de 196 nm RIU^{-1} e 297 nm RIU^{-1} respectivamente, e figura de mérito (FOM) de $2,2 \text{ RIU}^{-1}$ e $3,0 \text{ RIU}^{-1}$. Os AuNRs-chip apresentaram um aumento de 18% na sensibilidade e 15% na FOM em relação a outros AuNRs da literatura. Os substratos tiveram sua superfície modificada para detecção de biomoléculas, como o anticorpo da albumina de soro bovino (anti-BSA), através da metodologia utilizando N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). Posteriormente, a BSA foi imobilizada na superfície e a detecção de anti-BSA ocorreu através da interação antígeno-anticorpo, observada pelo deslocamento da banda LSPR. Esse deslocamento foi similar para as duas configurações, apesar dos maiores valores de sensibilidade e FOM dos AuNRs-chip, indicando que o ambiente ao redor dos AuNRs influencia na eficiência da detecção. A detecção de anti-BSA pelas técnicas SERS e SEF foi realizada pelo método extrínseco, utilizando um imunoenensaio sanduíche e as duas configurações de AuNRs em conjunto. As moléculas provas utilizadas para o SERS e SEF, foram os corantes azul do Nilo e IR-820 respectivamente. Na presença do analito, o biossensor SERS apresentou sinal duas vezes maior na média do que o branco, e uma quantidade maior de eventos positivos no mapeamento SERS digital. O biossensor SEF apresentou sinal três vezes maior na média que o branco e uma quantidade maior de eventos positivos no mapeamento SERS digital, indicando a detecção da anti-BSA através das duas técnicas. Os AuNBs e

AuNGs se mostraram substratos SERS adequados, mostrando alta intensificação no sinal Raman do corante azul do Nilo. Os biossensores construídos nesse trabalho apresentaram boa performance, são simples, rápidos e de boa eficiência na detecção da anti-BSA.

Palavras-chave: Biossensores. Plasmônica. Nanopartículas anisotrópicas de ouro. LSPR. SERS. SEF.

ABSTRACT

The present thesis had as study the synthesis and characterization of anisotropic Au nanoparticles (AuNPs) and their application as plasmonic biosensors using the localized surface plasmon resonance (LSPR), surface enhanced Raman scattering (SERS) and surface enhanced fluorescence (SEF). Three different Au nanostructures were synthesized: Nanorods (AuNRs), nanopyramids (AuNBs) and nanobranched (AuNGs), using the seed mediated growth method. These anisotropic AuNPs were characterized with UV-Vis spectroscopy and scanning and transmission electronic microscopy. AuNRs present larger yield in your preparations and, therefore, were the nanostructures used in biosensors construction. LSPR based biosensors were prepared in two different configurations. AuNRs in suspension, S-AuNRs, and chemically adsorbed on glass slides, AuNRs-chip. The glass adsorption was done using the 3-mercaptopropyltrimethoxysilane, that was utilized as binding molecule between glass/AuNRs and between AuNRs/AuNRs, these substrates were characterized with UV-Vis spectroscopy and atomic force microscopy. The S-AuNRs and AuNRs-chip show sensitivities of 196 nm RIU^{-1} and 297 nm RIU^{-1} respectively, and figure of merit (FOM) of 2.2 RIU^{-1} and 3.0 RIU^{-1} . The AuNRs, which had the adsorption process improved, obtained an increase of 18% on sensitivity and 15% on FOM related to other AuNRs in the literature. The substrates had the surface modified for biomolecule detection, like the bovine serum albumin antibody (anti-BSA), through the methodology using N-ethylcarbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). Posteriorly, the BSA was immobilized on the surface and the anti-BSA detection was made through antigen-antibody interaction, observed by the shift of the LSPR band. This shift was similar to two configurations, although AuNRs-chip show larger values of sensitivity and FOM, indicating that the environment surrounding the AuNRs influences the detection efficiency. The anti-BSA detection through SERS and SEF techniques was realized by the extrinsic method, using a sandwich immunoassay and the two AuNRs configurations together. The reporter molecules used for SERS and SEF were Nile blue and IR-820 dyes respectively. In the presence of the analyte, the SERS biosensor presents a twice larger average signal than blank and a larger number of positive events at SERS digital mapping. The SEF biosensor present a three times bigger average signal than blank and a larger number of positive events at SEF digital mapping, indicating the anti-BSA detection through these techniques. AuNBs and AuNGs were adequate SERS substrates, showing a good intensification in Nile blue Raman signal. The biosensors constructed in this thesis are simple, fast and have good efficiency and performance on anti-BSA detection.

Keywords: Biosensors. Plasmonics. Anisotropic gold nanoparticles. LSPR. SERS. SEF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de um biossensor utilizando AuNPs	22
Figura 2: Configurações construídas para resolver o problema eletromagnético associado à excitação de plamon de superfície, mantendo a conservação do momento angular utilizando prismas.	25
Figura 3: Esquema dos tipos de plasmon de superfície.	27
Figura 4: Intensificação do campo local próximo à superfície de nanoesferas de Ag, simulação feita com o método de aproximação de dipolos discretos, DDA do inglês <i>discrete dipolo approximation</i>	30
Figura 5: Excitação do LSPR para esferas de Au.....	31
Figura 6: Excitação do LSPR para nanobastões de Au.....	31
Figura 7: Simulação de campo eletromagnético para diferentes nanoestruturas, utilizando o método de diferenças finitas do domínio do tempo, FDTD do inglês <i>finite difference time domain</i>	33
Figura 8: Comparação da sensibilidade entre AuNRs e AuNBs	36
Figura 9: Tipos de espalhamento da luz incidente.....	39
Figura 10: Mecanismo químico para o SERS - transferência de carga	42
Figura 11: Esquema do processo de duas etapas para o mecanismo eletromagnético	43
Figura 12: Gráfico de Q versus comprimento de onda para diversos metais.....	45
Figura 13: Diagrama de Jablonski para a fluorescência.....	47
Figura 14: Esquema de interação do fluoróforo com a superfície metálica.....	48
Figura 15: Decaimento da intensidade do campo eletromagnético para uma esfera de raio a. 49	
Figura 16: Esquema de funcionalização do AuNRs-chip para a detecção de anti-BSA por LSPR.....	56
Figura 17: Esquema de funcionalização do S-AuNRs para a detecção de anti-BSA por LSPR	57
Figura 18: Esquema de detecção utilizando SERS e SEF.....	58
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H do CTBAB em CDCl_3	61
Figura 20: Espectro de RMN de ^1H do TTEAB em CDCl_3	62
Figura 21: Espectro de extinção característico para AuNRs.	64
Figura 22: Espectros de extinção dos AuNRs após a síntese e após a retirada do excesso de CTAB (Três ciclos de centrifugação 10,244 rcf por 30 min e redispersão em água deionizada).....	66
Figura 23: Espectros de extinção para as AuNBs sintetizadas para cada surfactante utilizado	67

Figura 24: Espectros de extinção para as AuNGs sintetizadas para cada surfactante utilizado	69
Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura para os AuNRs sintetizados	71
Figura 26: Histograma da medida dos comprimentos transversal e longitudinal.....	72
Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura para os AuNBs sintetizados	72
Figura 28: Microscopia eletrônica de varredura para os AuNGs sintetizados	73
Figura 29: Microscopia eletrônica de transmissão para os AuNGs sintetizados com TTPAB	75
Figura 30: Espectros de extinção dos AuNRs-chip	76
Figura 31: Microscopia de força atômica para os AuNRs-chip.....	78
Figura 32: Sensibilidade dos AuNRs em suspensão.....	80
Figura 33: Sensibilidade dos AuNRs-chip.	81
Figura 34: Espectros de extinção para a etapa de modificação da superfície dos S-AuNRs com MUA.....	84
Figura 35: Espectros de extinção para imobilização de BSA e posterior detecção de anti-BSA utilizando os S-AuNRs	85
Figura 36: Espectros de extinção do experimento branco	86
Figura 37: Influência da concentração de Anti-BSA no deslocamento da banda LSPR.	87
Figura 38: Espectros de extinção para imobilização de BSA e posterior detecção de anti-BSA utilizando os AuNRs-chip.....	88
Figura 39: Espectro SERS dos AN-S-AuNRs com concentração inicial da molécula prova $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, excitado em 785 nm.	91
Figura 40: Espectro SERS da superfície do AuNRs-chip após imersão na suspensão AN-S-AuNRs, excitado em 785nm.....	92
Figura 41: Mapeamento SERS de 400 pontos dos AuNRs-chip após imersão nos AN-S-AuNRs. A integral utilizada foi da banda em 595 cm^{-1} do azul do Nilo, excitado em 785nm.	93
Figura 42: Gráfico de barras da média das integrais da banda do AN em 595 cm^{-1} com seus respectivos desvios padrão para os 400 pontos dos mapeamentos SERS da Figura 41, utilizando o procedimento de Bohn e colaboradores onde foram retirados 10% dos menores e maiores valores de intensidade.....	94
Figura 43: Tratamento de dados para o mapeamento SERS da Figura 41, considerando o procedimento de Albuquerque e colaboradores.....	95
Figura 44: Espectro SEF do corante IR-820 $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre os AuNRs-chip sem modificação, excitado em 785 nm.....	97

Figura 45: Espectro SEF do IR-820 imobilizado na superfície de AuNRs em suspensão com MUA, excitado em 785 nm.....	98
Figura 46: Espectro SEF da superfície do AuNRs-chip após imersão na suspensão IR-S-AuNRs.....	99
Figura 47: Mapeamento SEF de 400 pontos dos AuNRs-chip após imersão nos IR-S-AuNRs. A integral utilizada foi da banda de fluorescência do IR-820, excitado em 785 nm.	100
Figura 48: Gráfico de barras da média das integrais da banda de fluorescência com seus respectivos desvios padrão para os 400 pontos dos mapeamentos SEF da Figura 47, utilizando o procedimento de Bohn e colaboradores onde foram retirados 10% dos menores e maiores valores de intensidade.....	101
Figura 49: Tratamento de dados para o mapeamento SEF da Figura 47, considerando o procedimento de Albuquerque e colaboradores.....	102
Figura 50: Espectros SERS do azul do Nilo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	103
Figura 51: Espectros SERS do azul do Nilo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	104
Figura 52: Espectros SERS do azul do Nilo $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	105
Figura 53: Espectros SERS do azul do Nilo $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em suspensão de AuNBs (sintetizadas com TTBAB) e em solução aquosa.	106
Figura 54: Espectro de RMN de ^1H para o CTEAB CDCl_3	119
Figura 55: Espectro de RMN de ^1H para o CTPAB CDCl_3	119
Figura 56: Espectro de RMN de ^1H para o TTPAB CDCl_3	120
Figura 57: Espectro de RMN de ^1H para o TTBAB CDCl_3	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos sintetizados na tese, derivados dos compostos comerciais CTAB e TTAB	59
Tabela 2: Estruturas dos surfactantes CTEAB, CTPAB, TTPAB e TTBAB com a atribuição do espectro de RMN de ^1H para os hidrogênios marcados.....	63
Tabela 3: Comparativo entre a sensibilidade e FOM dos AuNRs-chip com biosensores baseados em AuNRs com razão de aspecto similares	82
Tabela 4: Comparação de performance entre os AuNRs-chip e os S-AuNRs	89
Tabela 5: Fatores de intensificação (AEF) calculados para a banda em 595 cm^{-1} do corante azul do Nilo, excitado em 785 nm.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNPs	Nanopartículas de Au
AuNRs	Nanobastões de Au
AuNBs	Nanobipirâmides de Au
AuNGs	Nanogalhos de Au
AuNRs-chip	Filme de AuNRs adsorvidos sobre lâminas de vidro
S-AuNRs	Suspensão de AuNRs
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CTEAB	Brometo de cetiltriethylamônio
CTPAB	Brometo de cetiltripropilamônio
CTBAB	Brometo de cetiltributilamônio
TTAB	Brometo de tetradecilmetilamônio
TTEAB	Brometo de tetradeciltriethylamônio
TTPAB	Brometo de tetradeciltripropilamônio
TTBAB	Brometo de tetradeciltributilamônio
MUA	Ácido mercaptoundecanóico
EDC	N-etil-N-(3-dietilaminopropil) carbodiimida
NHS	N-hidroxisuccinimida
BSA	Albumina de soro bovino
anti-BSA	Anticorpo da albumina de soro bovino
AN	Corante azul do Nilo
IR	Corante IR-820
AN-S-AuNRs	Suspensão de AuNRs com a molécula prova azul do Nilo
IR-S-AuNRs	Suspensão de AuNRs com a molécula prova IR-820
NP	Nanopartícula
SP	Plasmon de superfície
SPR	Ressonância de plasmon de superfície
LSP	Plasmon de superfície localizado
LSPR	Ressonância de plasmon de superfície localizado
LSPR-L	Ressonância de plasmon de superfície localizado longitudinal
LSPR-T	Ressonância de plasmon de superfície localizado transversal
SEF	Fluorescência intensificada por superfície
SERS	Espalhamento Raman intensificado por superfície

AEF	Fator de intensificação analítico
S	Sensibilidade
FOM	Figura de mérito
LOD	Limite de detecção
RIU	Unidade de índice de refração
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
AFM	Microscopia de força atômica
UV-VIS	Espectroscopia eletrônica no ultravioleta e visível
RMN	Ressonância magnética nuclear
PdC	Prova de conceito
MPTMS	3-Mercaptopropil Trimetoxisilano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 NANOCIÊNCIA E NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	19
1.2 BIOSENSORES PLASMÔNICOS.....	21
1.2.1 Biossensores	21
1.2.2 Materiais Plasmônicos e Plasmon de Superfície	23
1.2.3 Plasmon de Superfície Localizado	26
1.2.4 Biossensores LSPR	34
1.2.5 Espectroscopia Raman intensificada por superfície e sua aplicação como biossensores	39
1.2.5.1 <i>Espectroscopia Raman</i>	39
1.2.5.2 <i>SERS e sua aplicação como biossensor</i>	41
1.2.6 Fatores de intensificação	46
1.2.7 Fluorescência intensificada por superfície e sua aplicação como biossensor	46
1.3 JUSTIFICATIVA.....	49
2 OBJETIVOS	50
3 METODOLOGIA	51
3.1 EQUIPAMENTOS.....	51
3.2 MATERIAIS.....	51
3.3 SÍNTESE DOS SURFACTANTES.....	52
3.4 SÍNTESE DAS AuNPs	52
3.4.1 Nanobastões de Au (AuNRs)	53
3.4.2 Nanobipirâmides de Au (AuNBs)	53
3.4.3 Nanogalhos de Au (AuNGs)	53
3.5 CONSTRUÇÃO DE FILMES DE AuNPs IMOBILIZADAS SOBRE LÂMINAS DE VIDRO – AuNPs-chip	54
3.6 ESTUDO DA SENSIBILIDADE LSPR.....	55
3.7 DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR LSPR	55
3.7.1 AuNRs-chip	55
3.7.2 S-AuNRs	56
3.8 DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR SERS E SEF	57
3.9 ATIVIDADE SERS DE AuNBS E AuNGS	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SURFACTANTES	59
4.1.1 Caracterização do CTBAB	60

4.1.2 Caracterização do TTEAB	61
4.1.3 Outros surfactantes	63
4.2 CARACTERIZAÇÃO ÓTICA DAS AuNPs	64
4.2.1 Nanobastões de Au (AuNRs)	64
4.2.2 Nanobipirâmides de Au (AuNBs)	66
4.2.3 Nanogalhos de Au (AuNGs)	68
4.3 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DAS AUNPs.	70
4.3.1 AuNRs	70
4.3.2 AuNBs	72
4.3.2 AuNGs	73
4.4 CARACTERIZAÇÃO ÓTICA DOS FILMES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE LÂMINAS DE VIDRO	75
4.5 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DOS AuNRS-CHIP	77
4.6 ESTUDO DA SENSIBILIDADE LSPR	79
4.6.1 S-AuNRs	79
4.6.2 AuNRs -chip	80
4.6.3 Comparação com a literatura	81
4.7 DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR LSPR	83
4.7.1 Detecção de Anti-BSA utilizando os S-AuNRs	83
4.7.2 Detecção de Anti-BSA utilizando o AuNRs-chip	87
4.8 COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO ENTRE AS DUAS CONFIGURAÇÕES	88
4.9 DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR SERS E SEF	90
4.9.1 Detecção de anti-BSA por SERS	90
4.9.2 Detecção de Anti-BSA por SEF	96
4.10 ATIVIDADE SERS DE AuNBS E AuNGS	102
4.10.1 Atividade SERS das AuNBs em 785 nm	103
4.10.2 Atividade SERS das AuNGs em 785 nm	104
4.10.3 Fatores de intensificação	106
5 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
APÊNDICE A – Perspectivas futuras	118
APÊNDICE B – Espectros de RMN de ¹H para os compostos sintetizados	119

1 INTRODUÇÃO

Na introdução serão abordados os conceitos de nanociência e de biossensores, os princípios das técnicas utilizadas no biossensoriamento nesta tese e a justificativa deste trabalho.

1.1 NANOCIÊNCIA E NANOPARTÍCULAS DE OURO

Em Química, o prefixo ‘nano’ é utilizado para designar algo que é um bilionésimo (1×10^{-9}) de uma unidade de medida como o metro, por exemplo (DREADEN *et al.*, 2012). Por outro lado, uma definição mais aceita atualmente, é a de que um material ou propriedade pode ser dita nanométrica quando pelo menos uma de suas dimensões se encontra na escala entre 1 e 100 nm (LOPEZ-SERRANO *et al.*, 2014). É seguro dizer que a cada dia o uso e importância de nanoestruturas para a ciência e a tecnologia vem aumentando fortemente. A nanotecnologia, que pode ser definida como aplicação desses materiais, hoje é um dos grandes ramos da ciência, podendo ser aplicada em diversos campos de pesquisas como sensores (principal interesse na presente tese), armazenamento de energia, medicina e remediação ambiental entre diversas outras (KALAMBATE *et al.*, 2019).

Nos dias atuais, o termo nanociência, estudo dos nanomateriais, é bastante difundido; porém, uma das estruturas mais estudadas representantes desse ramo, as nanopartículas (NPs), são utilizadas há séculos com base em conhecimento de manufatura, sem discussão fundamental e científica. As nanopartículas de Au (AuNPs), por exemplo, são utilizadas desde muitos séculos em coloração de vidro e até aplicações biomédicas (MCNAMARA e TOFAIL, 2017). Um dos exemplos mais antigos de uso das nanopartículas é na coloração de vidros presentes nos vitrais de igrejas medievais e na famosa taça de Lycurgus, onde foram encontrados nanoestruturas de AuNPs e AgNPs, (JEEVANANDAM *et al.*, 2018). Contudo, foi apenas com os estudos de Faraday que as AuNPs ganharam interesse científico, que pode ser considerado como o nascimento da ciência moderna de colóides (FARADAY, 1857; EDWARDS e THOMAS, 2007). Faraday, estudando a interação da luz incidida sobre filmes finos de metais, preparou um colóide de ouro, reduzindo uma solução aquosa de $\text{Na}[\text{AuCl}_4]$ com fósforo, o que resultou em uma suspensão de cor rubi. Observou-se após a síntese que havia diferença entre a luz incidente e a luz refletida pelo colóide (HEILIGTAG e NIEDERBERGER, 2013).

A explicação de algumas propriedades das AuNPs através da teoria eletromagnética clássica foi feita apenas há um século (HALAS, 2010). A partir de então a síntese de nanopartículas evoluiu bastante: já na década de 1950, Turkevich (TURKEVICH *et al.*, 1951), após a invenção do microscópio eletrônico, sintetizou AuNPs esféricas a partir da redução do ácido tetracloroaurico por citrato de sódio. Procedimento aprimorado por Frens (FRENS, 1973), que preparou AuNPs esféricas com tamanho controlado entre 16-150 nm de diâmetro variando a concentração do citrato; quanto maior a adição de citrato menor era o tamanho das esferas. Além disso, o citrato, utilizado em excesso, atua como estabilizante nessas preparações, formando uma camada em volta das AuNPs e gerando repulsão eletrostática que evita a agregação das mesmas.

As sínteses evoluíram ao longo do tempo e nos anos 2000 novos tipos de nanoestruturas de Au começaram a surgir. Os primeiros resultados da preparação de nanobastões de Au (AuNRs) foram reportados em 2001 (JANA *et al.*, 2001) e 2003 (NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003). O método mediado por nanopartículas precursoras (*seed*) para a síntese de AuNRs por Nikoobakht e El-Sayed, utiliza do brometo de cetiltrimetilamônio, CTAB, como direcionador na formação dos bastões. As nanopartículas precursoras, são nanocristais esféricos que exibem duas faces {100}/{110} e {111}, o CTAB possui maior afinidade pela face {100}, portanto, as micelas de CTAB adsorvem muito mais eficientemente nessa face do que na face {111}, protegendo-a, fazendo com que o crescimento anisotrópico ao longo da face {111} seja muito mais rápido (PARK *et al.*, 2013).

Posteriormente, diversas outras formas preferenciais, como nanobipirâmides (AuNBs) (KOU *et al.*, 2007) e nanogalhos (AuNGs) (CHEN *et al.*, 2008), entre outros, foram reportados utilizando surfactantes análogos ao CTAB. As três formas acima são as nanoestruturas utilizadas no presente trabalho, mas muitas outras surgiram (REGUERA *et al.*, 2017). As AuNPs possuem propriedades físico-químicas particulares (VIDOTTI *et al.*, 2011), e uma delas é a de possuir a ressonância de plasmon de superfície localizado (do inglês, *localized surface plasmon resonance*, LSPR).

Dentre essas propriedades físico-químicas particulares, Saha e colaboradores (SAHA *et al.*, 2012) citam quatro delas que fazem que AuNPs sejam excelentes plataformas para biossensores: (1) Podem ser sintetizadas de forma direta e também podem ser estáveis; (2) Suas propriedades ópticas e as propriedades eletrônicas são únicas; (3) Grande razão superfície/volume com excelente biocompatibilidade; (4) As propriedades podem variar com o tamanho e a forma das AuNPs, além do meio onde estão dispostas. Essas propriedades, com destaque especial às propriedades ópticas associadas à ressonância de plasmon de superfície

localizado fazem com que as AuNPs sejam bastante utilizadas em biossensores, que são nesse caso nomeados de biossensores plasmônicos. (DORIA et al., 2012).

1.2 BIOSSENSORES PLASMÔNICOS

Nesse tópico será abordado inicialmente a definição de biossensor de maneira geral e, posteriormente, o que são os biossensores plasmônicos e as técnicas que podem ser utilizadas em análises com esse tipo de biossensor.

1.2.1 Biossensores

Um sensor é um dispositivo analítico que detecta uma informação através de uma interação específica ou mudanças no ambiente e a transforma em um sinal físico mensurável (GUPTA e KANT, 2018). Um dos sensores mais conhecidos e utilizados é o termômetro de mercúrio, que funciona convertendo o calor em expansão e contração do líquido, essa resposta é mostrada na temperatura vista no tubo de vidro graduado. Nas últimas quatro décadas, os sensores ópticos têm tido um enorme desenvolvimento e, conseqüentemente, um aumento no número de aplicações (GUPTA e KANT, 2018).

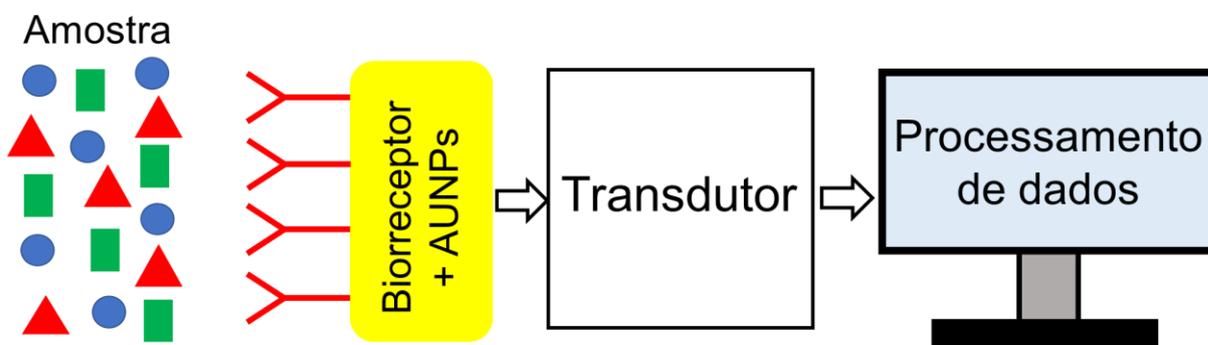
Os sensores podem ser classificados de várias maneiras, de acordo com sua aplicação ou com o analito a ser detectado. Biossensores são uma dessas várias classificações de sensores e compreende uma gama enorme de dispositivos, nos quais o evento de reconhecimento é através de elementos biológicos. Apesar de muito comuns hoje em dia, os sensores são utilizados há mais de um século como, por exemplo, nos trabalhos de Cremer em 1906, que demonstrou que a concentração de um ácido em um líquido é proporcional ao potencial elétrico que chegava das partes do fluido separadas por uma membrana de vidro. Posteriormente, em 1909 o conceito de pH foi introduzido por Sorensen e apenas em 1922 o primeiro eletrodo de pH foi construído por Hughes (HUGHES, 1922). Outro ponto importante na história foi a imobilização da enzima invertase em hidróxido de alumínio e carvão por Griffin e Nelson (GRIFFIN e NELSON, 1916; NELSON e GRIFFIN, 1916; BHALLA *et al.*, 2016).

Os primeiros conceitos sobre biossensores foram definidos por Clark, conhecido como o pai dos biossensores (GIRIGOSWAMI e AKHTAR, 2019), em 1962, com base em seu sensor de oxigênio construído em 1956 (BHALLA *et al.*, 2016). Clark dizia que a detecção eletroquímica de oxigênio ou peróxido de hidrogênio seria capaz de ser suporte para

instrumentos bioanalíticos, desde que estivessem com as devidas enzimas imobilizadas. Um dos biossensores mais clássicos foi desenvolvido para detecção de glicose, utilizando a enzima glicose oxidase e permitindo a conversão de um eletrodo de platina em uma poderosa e necessária ferramenta analítica. Outro exemplo clássico são os testes de gravidez (TURNER, 2013).

Os biossensores são compostos por um biorreceptor, um transdutor e um processador de dados. Um esquema simples de um biossensor utilizando AuNPs é mostrado na Figura 1. No esquema apresentado tem-se uma amostra com vários elementos, de maneira que o biorreceptor seja o responsável por reconhecer o analito dentro da matriz dessa amostra, gerando um sinal biológico. O biorreceptor pode ser um microrganismo, organela, enzima, célula, anticorpo, ácido nucleico entre outros (DAMBORSKÝ *et al.*, 2016); para uso de AuNPs, essa devem ser modificadas com o biorreceptor. O sinal biológico é transduzido a um sinal analítico mensurável pelo transdutor, que pode ser classificado como óptico (nesse trabalho será usado o LSPR das AuNPs), eletroquímico ou piezelétrico (VIDOTTI *et al.*, 2011) e, então, o sinal gerado no processo de reconhecimento é processado.

Figura 1: Esquema de um biossensor utilizando AuNPs



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

O estudo e desenvolvimento dos biossensores na detecção de diversos compostos tem atraído o interesse de cientistas de diversas áreas como a química, ciência dos materiais, física, biologia entre outras. Muito desse interesse ocorre porque os biossensores podem ser utilizados em áreas de grande importância científica e tecnológica como diagnósticos clínicos, biomedicina, detecção de drogas ilícitas, análise ambiental, controle de qualidade e segurança alimentar, controle antiterrorismo entre diversas outras (PÉREZ-LÓPEZ e MERKOÇI, 2011; BHALLA *et al.*, 2016).

É interessante destacar que nos dias de hoje existem biossensores com grandes vantagens em relação aos métodos convencionais de biossensoriamento, como os métodos PCR (reação em cadeia de polimerase, do inglês *polymerase chain-reaction*) e ELISA (análise de enzima imuno-adsorvida, do inglês *enzyme-linked-immunosorbent assay*) (HOWES, CHANDRAWATI, *et al.*, 2014). Entre essas vantagens vale ressaltar a possibilidade de ter menor tempo de análise, adaptabilidade das dimensões e, principalmente, potencial para ser miniaturizado e utilização de instrumentação menor. Essas características tornam os biossensores fáceis de manusear e portáteis, aumentando a possibilidade de uso em análises de campo; além disso, podem ser de baixo custo dependendo da técnica de construção e análise. Essas características se fazem interessantes em novos cuidados com a saúde, tratamentos clínicos e diagnósticos em tempo real, principalmente quando há a necessidade de seu uso em países em desenvolvimento (HAMMOND *et al.*, 2014).

A evolução no desenvolvimento e aplicação de biossensores plasmônicos tem sido grande nos últimos anos, de modo que a variedade dos dispositivos de detecção criados indicam que os biossensores plasmônicos são uma possível solução para muitos problemas bioquímicos e biomédicos (BROLO, 2012). Suas aplicações variam desde a detecção de sistemas que envolvem interações proteína-proteína até a detecção de sistemas muito menores, como fragmentos de DNA, em concentrações da ordem de attomolar (FERREIRA, *et al.*, 2009). Porém, ainda há um grande desafio para os pesquisados, que é levar essa tecnologia dos laboratórios para as aplicações em problemas reais (POLAVARAPU e LIZMARZAN, 2013).

1.2.2 Materiais Plasmônicos e Plasmon de Superfície

Os metais podem ser considerados como espelhos devido à alta refletividade óptica, além de apresentarem alta condutividade elétrica, e são os típicos materiais ditos plasmônicos (LE RU e ETCHEGOIN, 2009). O interesse nas propriedades ópticas, além da alta refletividade surgiu apenas no século XX, muito devido à evolução da ciência, com o eletromagnetismo clássico proposto por Maxwell (SANTOS *et al.*, 2016). Considerando o ponto de vista eletromagnético, o metal é um plasma de estado sólido, já que pode ser considerado como possuindo um fundo fixo de íons positivos com os elétrons de condução movendo-se nesse retículo. A plasmônica é a ciência que estuda a oscilação desse plasma e sua excitação óptica (MURRAY e BARNES, 2007).

Plasmon de superfície (SP, do inglês *surface plasmon*) é o nome dado à excitação coletiva dos elétrons da superfície de um material metálico (BROLO *et al.*, 2008). A ressonância que permite essa excitação ocorre quando a radiação eletromagnética incidente coincide com o comprimento de onda de excitação dos modos de oscilação dos elétrons de superfície do metal (LANGER *et al.*, 2015). Para que haja a excitação do SP é necessário que o momento total do sistema (luz+metal) seja conservado (LE RU e ETCHEGOIN, 2009). A relação de dispersão de um plasmon de superfície em um filme metálico plano é mostrada na Equação 1.

$$k_{SP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_{eff}}$$

Equação 1

Onde: k_{SP} é o vetor de onda do campo eletromagnético propagante paralelo à superfície, ω é a frequência angular e c a velocidade da luz. ϵ_{eff} é a constante dielétrica efetiva, dada pela Equação 2.

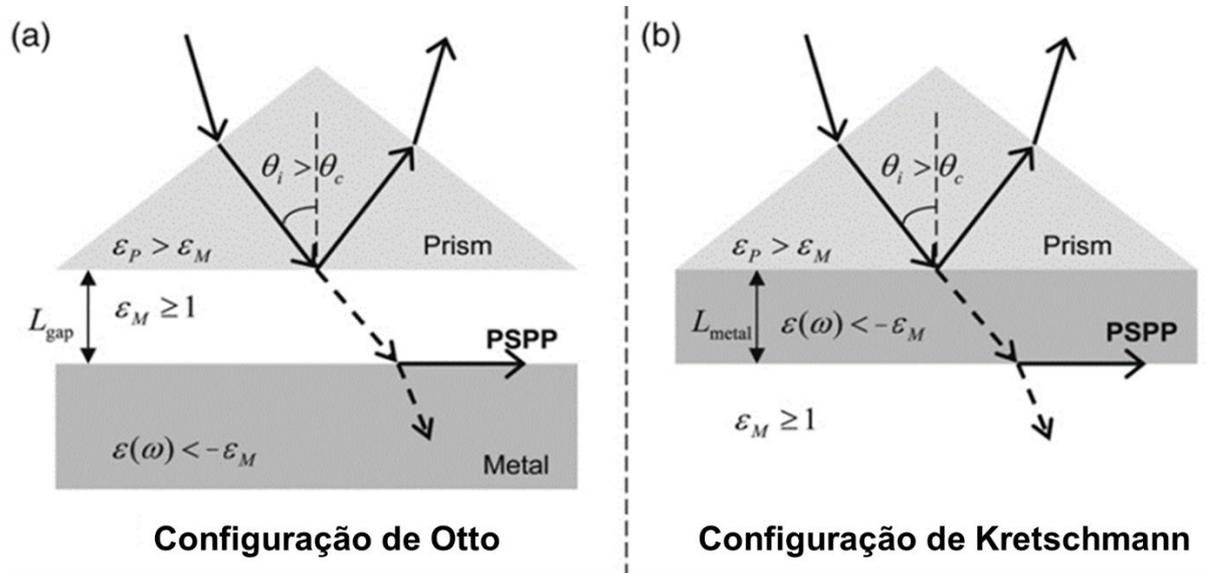
$$\epsilon_{eff} = \frac{\epsilon_M \epsilon_m}{\epsilon_M + \epsilon_m}$$

Equação 2

A constante dielétrica efetiva relaciona as constantes dielétricas do meio adjacente ao metal e do metal, ϵ_M e ϵ_m respectivamente. A Equação 1 mostra, portanto, que o meio onde o metal está imerso afeta as condições da ressonância de plasmon de superfície, SPR. A aplicação do SPR para o sensoriamento está ligada justamente ao fato de que a presença de um adsorbato afeta fortemente as propriedades dielétricas do meio adjacente à superfície metálica (BROLO *et al.*, 2008).

Pela Equação 1 e Equação 2, pode-se observar o problema eletromagnético. Excitar um SP por luz não é possível, porque o momento do fóton no ar é dado por ω/c , sendo, portanto, menor que o momento necessário para excitar um SP, já que o valor de ϵ_{eff} é maior que 1 (GUPTA e KANT, 2018). Ao final da década 1960 dois pesquisadores resolveram esse problema aumentando o momento da luz utilizando prismas que possuíam maior índice de refração que o ar. As duas abordagens, de Otto (OTTO, 1968) e Krestschmann (KRETSCHMANN e RAETHER, 1968) também deram nome às configurações criadas por eles, que são esquematizados na Figura 2.

Figura 2: Configurações construídas para resolver o problema eletromagnético associado à excitação de plamon de superfície, mantendo a conservação do momento angular utilizando prismas.



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

L_{gap} é a distância entre o metal e o prisma, L_{metal} é a espessura do metal, PSPP é o plasmon de superfície propagante que foi excitado na superfície do metal. ϵ_p é a constante dielétrica do prisma, ϵ_M do meio adjacente e $\epsilon(\omega)$ é a função dielétrica do metal. θ_i é o ângulo de incidência e θ_c é o ângulo crítico.

Fonte: ADAPTADO DE LE RU e ETCHEGOIN, 2009.

As duas configurações utilizaram a reflexão interna total da luz incidente pelo prisma como princípio. Quando a luz sofre reflexão total, cria uma onda evanescente na interface do prisma, permitindo a excitação de um plasmon na interface metal/dielétrico, como mostra a Figura 2, de modo que, devido à passagem por um meio com constante dielétrica mais alta, a luz passou a apresentar momento maior do que no meio original, o que permitiu que plasmon de superfície fossem excitados na superfície do metal. O interessante das duas metodologias que utilizaram prismas para excitação de SP, é que os mesmos podem ser excitados de duas maneiras diferentes: (1) variando o comprimento de onda da luz incidente (2) variando o ângulo de incidência (LE RU e ETCHEGOIN, 2009; XU *et al.*, 2019).

A configuração de Otto tinha uma desvantagem importante, pois utilizava uma estreita abertura com ar ou uma solução de interesse como separação entre a superfície metálica e o prisma para a propagação da onda evanescente, o que é muito difícil de controlar com os métodos de fabricação da época da proposição. Por outro lado, Kretschmann e Raether utilizaram o próprio filme metálico para a propagação da onda evanescente, o que fez

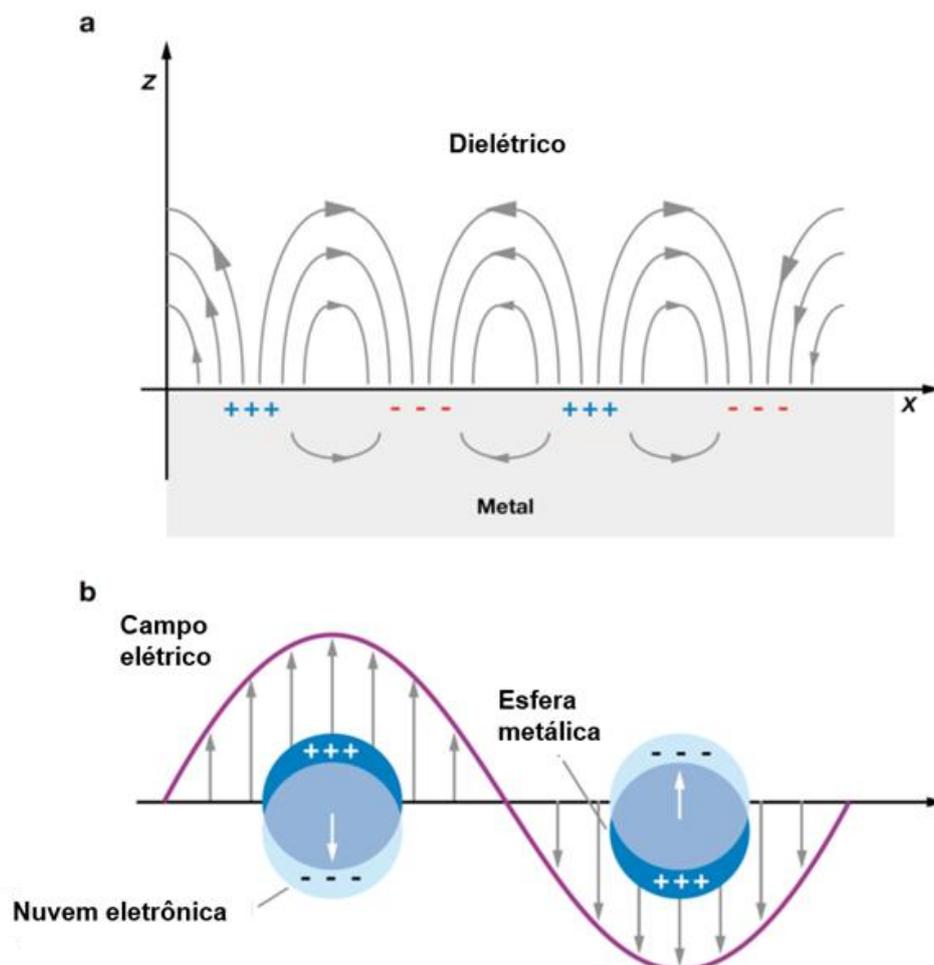
com essa configuração fosse muito mais vantajosa porque o controle sobre a espessura de filmes metálicos é bem mais estabelecido do que o controle sobre o *gap* entre as partes do substrato. Portanto, a chamada configuração de Kretschmann tornou-se a mais utilizada pelos interessados em SPR (LE RU e ETCHEGOIN, 2009). Depois do desenvolvimento inicial, o fenômeno SPR começou a ser bastante utilizado para várias aplicações depois de alguns anos, com a primeira detecção com a técnica realizada em 1983 por Liedberg e colaboradores (LIEDBERG *et al.*, 1983); além disso, o primeiro biossensor comercial utilizando a técnica foi comercializado pela Pharmacia Biacore em 1990 (BHALLA *et al.*, 2016). Os métodos de Otto e Kretschmann são bem conhecidos, porém existem diversos outros métodos para a resolução do problema eletromagnético, alguns deles utilizando de estruturas periódicas como superfícies rugosas, grades e nanoburacos (MONTEIRO *et al.*, 2012; ESCOBEDO *et al.*, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2016).

1.2.3 Plasmon de Superfície Localizado

Quando os materiais metálicos possuem dimensões comparáveis ou menores que o comprimento de onda da luz eletromagnética incidente, o SP é dito localizado, ou seja, plasmon de superfície localizado (LSP, do inglês *localized surface plasmon*) (MEJÍA-SALAZAR e OLIVEIRA, 2018). O problema eletromagnético não ocorre para os LSP, porque a dificuldade com vetor de onda do SP (k_{SP}) se torna irrelevante já que nessa dimensão o campo elétrico é homogêneo em toda a nanoestrutura (LE RU e ETCHEGOIN, 2009).

A Figura 3 ilustra os dois tipos de plasmon de superfície, localizado e estendido. Na Figura 3A temos o plasmon de superfície estendido, que se propaga nas direções x , y e z da interface metal/dielétrico. As distâncias de propagação em x e y podem chegar a mais de 100 μm , enquanto a propagação na direção z é no máximo 200 nm. Na Figura 3B é mostrado o plasmon de superfície localizado, que se caracteriza pela geração de um dipolo elétrico devido à mudança no modo de oscilação da nuvem eletrônica, de modo que há uma oscilação coletiva na direção oposta ao vetor campo elétrico (WILLETS e VAN DUYNE, 2007). A ressonância de plasmon de superfície ocorre quando o comprimento de onda dos modos de oscilação dos elétrons de superfície coincide com a radiação eletromagnética incidente. A frequência da oscilação mostrada na Figura 3B corresponde à ressonância de plasmon de superfície localizado, LSPR (MEJÍA-SALAZAR e OLIVEIRA, 2018).

Figura 3: Esquema dos tipos de plasmon de superfície.



(a) Plasmon de superfície (SP) e (b) Plasmon de superfície Localizado (LSP)

Fonte: ADAPTADO DE CAO *et al.*, 2014.

O LSPR assim como o SPR tem seu uso como ferramenta de sensoriamento, sendo que a posição da banda de ressonância está relacionada ao meio no qual as nanopartículas estão imersas. A variação do índice de refração próximo às AuNPs faz com que tanto a posição do máximo e a intensidade da banda LSPR sofram variação (WANG *et al.*, 2017).

O entendimento do LSPR passou por diversas teorias e descobertas. Isso se iniciou com os avanços no eletromagnetismo clássico feitos por Maxwell e posteriormente pelos trabalhos de Mie que, em 1908 (MIE, 1908), mostrou uma resolução para a equação de Maxwell para a interação de uma onda eletromagnética e uma esfera condutora (SANTOS *et al.*, 2016). Para tanto, foi necessário considerar que o meio adjacente e a nanopartícula fossem homogêneos, que a nanopartícula fosse menor que o comprimento de onda da luz incidente,

que a magnitude do campo elétrico fosse estática em volta da nanopartícula e que a nanopartícula metálica fosse um dipolo ideal. Nessa situação, foi possível ter uma solução pela teoria de Mie para a seção de choque da extinção de uma nanopartícula metálica esférica (σ_{ext}), que é o somatório das seções de choque de absorção e espalhamento (JIANG *et al.*, 2018), dada pela Equação 3.

$$\sigma_{ext}(\lambda) = \frac{18\pi V \varepsilon_M^{3/2}}{\lambda} \frac{\varepsilon_2(\lambda)}{[\varepsilon_1(\lambda) + 2\varepsilon_M]^2 + \varepsilon_2(\lambda)^2}$$

Equação 3

Onde: V é o volume da nanopartícula, λ é o comprimento de onda da luz, ε_M é a constante dielétrica do meio adjacente e $\varepsilon_1 + i\varepsilon_2$ é a função dielétrica complexa para o metal. Pode-se perceber na Equação 3 que existe uma condição de ressonância para que a seção de choque seja a maior possível, que é $\varepsilon(\omega) \approx -2\varepsilon_M$ (JIANG *et al.*, 2018).

As contribuições iniciais levaram ao modelo de Drude para a estrutura eletrônica dos metais, que permitiu relacionar a frequência da banda LSPR com a constante dielétrica do meio onde a nanopartícula está, mostrado na Equação 4 (MAYER e HAFNER, 2011).

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

Equação 4

Onde: ω_p é a frequência do plasma e γ o parâmetro de amortecimento, ambos para o metal *bulk*. Quando na região do visível e infravermelho próximo, consegue-se simplificar a equação, uma vez que $\gamma \ll \omega_p$, chegando a Equação 5 (MAYER e HAFNER, 2011).

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

Equação 5

A Equação 3 leva a uma condição de ressonância para o sistema e utilizando essa condição de ressonância, pode-se reescrever a Equação 5, obtendo a Equação 6 (MAYER e HAFNER, 2011; JIANG *et al.*, 2018).

$$\omega_{max} = \frac{\omega_p}{\sqrt{2\varepsilon_M + 1}}$$

Equação 6

Onde: ω_{max} é a frequência da banda LSPR. Utilizando da relação $\lambda = 2\pi c/\omega$, pode-se converter frequência para comprimento de onda, mais comumente utilizado na área. Sabe-se que a constante dielétrica do meio está relacionada com o índice de refração da seguinte forma $\varepsilon_M = n_M^2$. Portanto, pode-se rearranjar a Equação 6:

$$\lambda_{max} = \lambda_p \sqrt{2n_M^2 + 1}$$

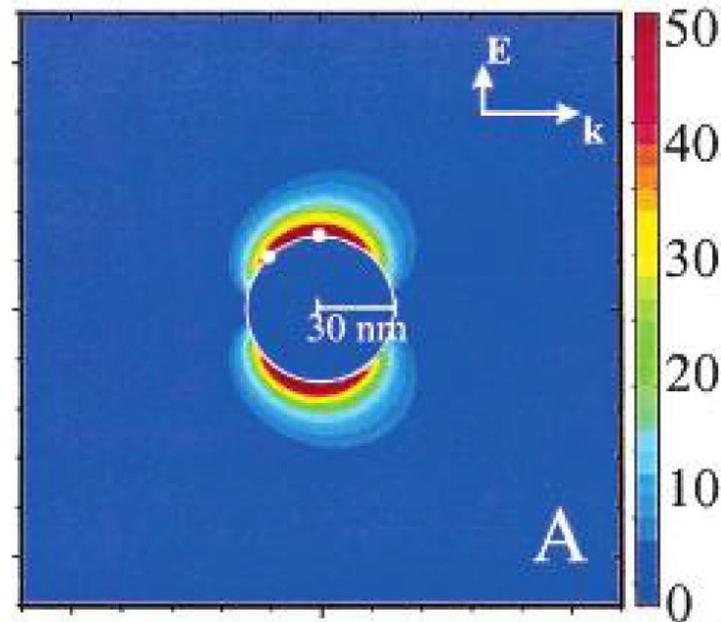
Equação 7

Onde: λ_{max} é o comprimento de onda do LSPR, λ_p é o comprimento de onda correspondente ao plasma do metal *bulk* e n_M é o índice de refração do meio. A Equação 7 mostra a dependência do comprimento de onda máximo da banda LSPR com o índice de refração do meio (MAYER e HAFNER, 2011).

Gans reformulou a teoria de Mie em 1912 (GANS, 1912) e aplicou para partículas esferoidais com diferentes razões de aspecto (razão entre dimensões longitudinal e transversal). Mostrou, através de suas equações, que assim como para as nanopartículas esféricas, a LSPR de nanopartículas esferoidais também é dependente da constante dielétrica do meio adjacente e, conseqüentemente, do índice de refração. Além disso, previu um deslocamento para o vermelho da banda LSPR com o aumento da razão de aspecto das estruturas esferoidais (JIANG *et al.*, 2018).

Uma propriedade bastante interessante e diferencial do LSPR é que, quando em ressonância com a radiação incidente, uma grande intensificação do campo eletromagnético local é observada próxima à superfície das nanopartículas. A intensificação do campo eletromagnético local é ilustrada na Figura 4, que é o resultado de um cálculo teórico para o campo eletromagnético local na superfície de uma nanoesfera de Ag (KELLY *et al.*, 2002), excitada na condição de ressonância, onde k é o vetor de onda e E o campo elétrico. Pode-se observar na região em vermelho que há intensificação do campo elétrico, que chega até 50× o valor do campo incidente. Há de se destacar que essa intensificação decai bruscamente com a distância em relação à superfície, confirmando que este é um fenômeno que deve acontecer bem próximo à superfície metálica.

Figura 4: Intensificação do campo local próximo à superfície de nanoesferas de Ag, simulação feita com o método de aproximação de dipolos discretos, DDA do inglês *discrete dipole approximation*



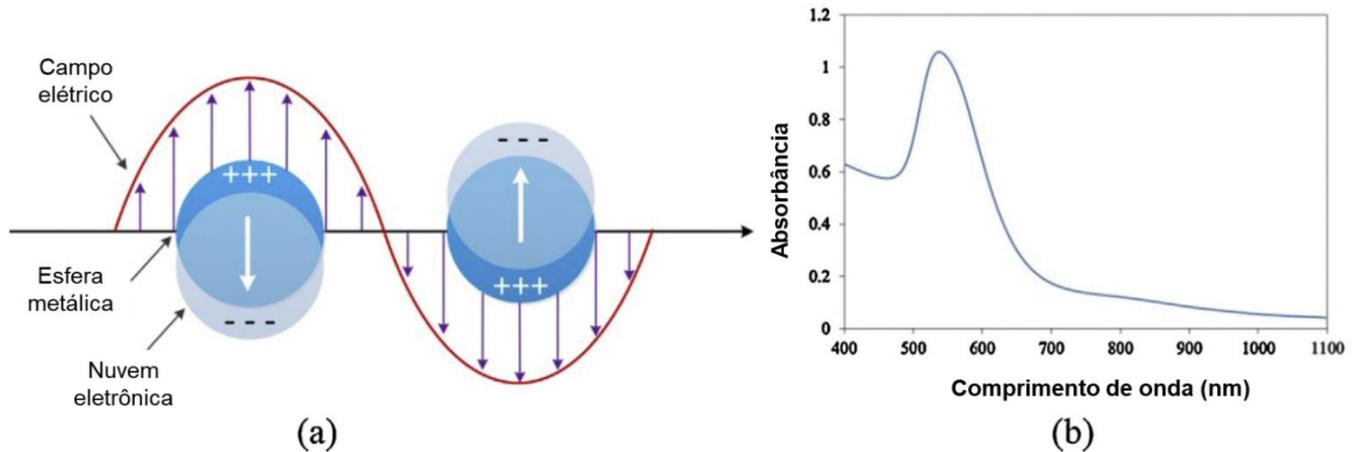
Fonte: ADAPTADO DE KELLY *et al.*, 2002.

O LSPR está diretamente ligado à forma e ao tamanho das nanoestruturas plasmônicas. O dipolo induzido pelo campo eletromagnético incidente é dado pela relação $\mu_{ind} = \alpha E_0(\omega_0)$, onde α é a polarizabilidade da nanopartícula. No caso de morfologias isotrópicas, o dipolo é induzido por uma componente do campo elétrico da luz incidente, ao passo que para estruturas anisotrópicas a polarizabilidade se torna um tensor de segunda ordem e, portanto, as componentes podem ser diferentes para os três eixos, de maneira que vários dipolos diferentes podem ser excitados. As propriedades do LSPR estão relacionadas às mudanças na polarizabilidade das NPs plasmônicas com a excitação pela radiação eletromagnética incidente (REGUERA *et al.*, 2017).

Para os metais de cunhagem, Au, Ag e Cu, o LSPR é observado como uma banda de extinção na região do visível-infravermelho próximo (VIS-NIR). Tipicamente, o espalhamento de luz característico de nanoestruturas e microestruturas é chamado de efeito Tyndall (EDWARDS e THOMAS, 2007). Na Figura 5 e Figura 6 são mostradas as excitações do LSPR para nanoesferas e nanobastões de Au, respectivamente, e as bandas LSPR resultantes observadas em um espectro no VIS-NIR. Pode-se observar que para as esferas, que são estruturas isotrópicas, apenas um dipolo é induzido e consequentemente apenas uma banda de extinção é observada. Já os nanobastões de Au possuem dois dipolos induzidos possíveis e, portanto, são observadas duas bandas de extinção, associadas às oscilações dos elétrons livres nos dois eixos principais da nanoestrutura: são as bandas LSPR do modo

longitudinal (LSPR-L) e do modo transversal (LSPR-T). A maior polarizabilidade das NPs anisotrópicas no modo longitudinal, explica o maior deslocamento para o vermelho do LSPR-L em relação ao LSPR-T com a mudança no índice de refração do meio (CAO *et al.*, 2014).

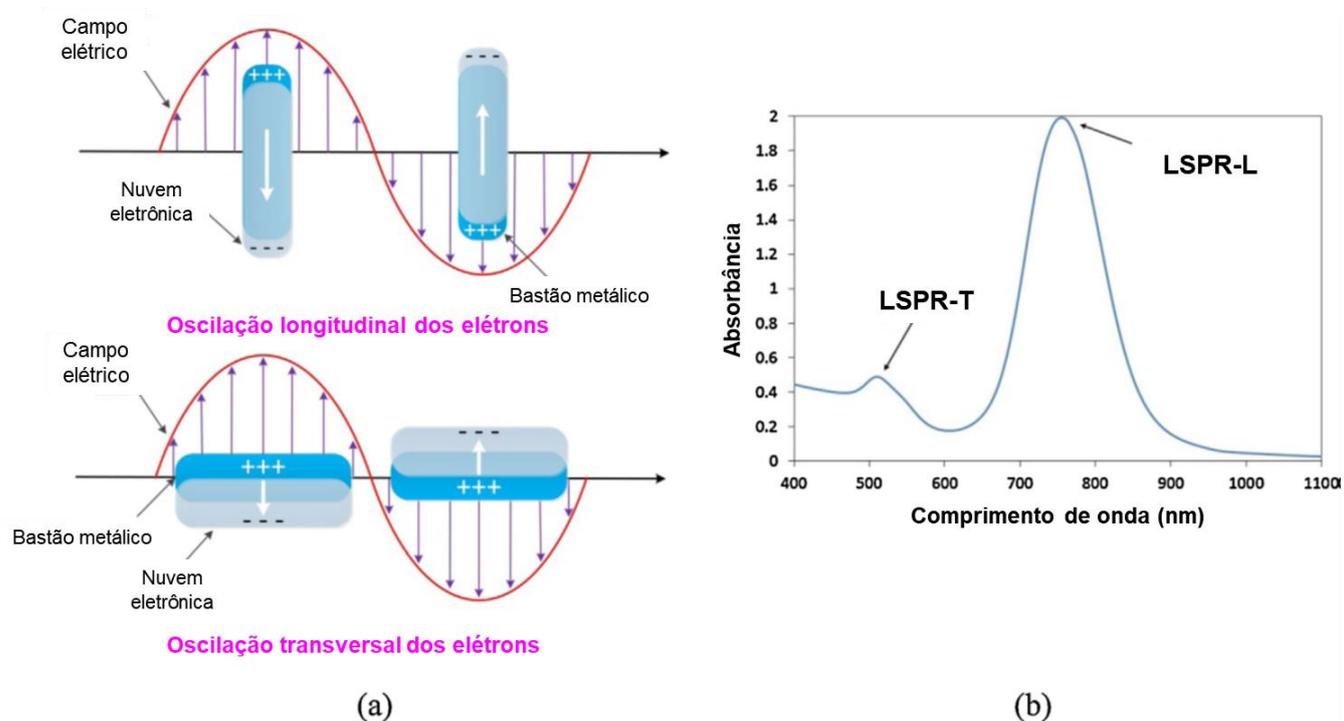
Figura 5: Excitação do LSPR para esferas de Au



(a) Esquema da excitação do LSPR para uma esfera metálica e (b) Espectro de extinção característico de nanoesferas.

Fonte: ADAPTADO DE CAO, SUN e GRATTAN, 2014.

Figura 6: Excitação do LSPR para nanobastões de Au



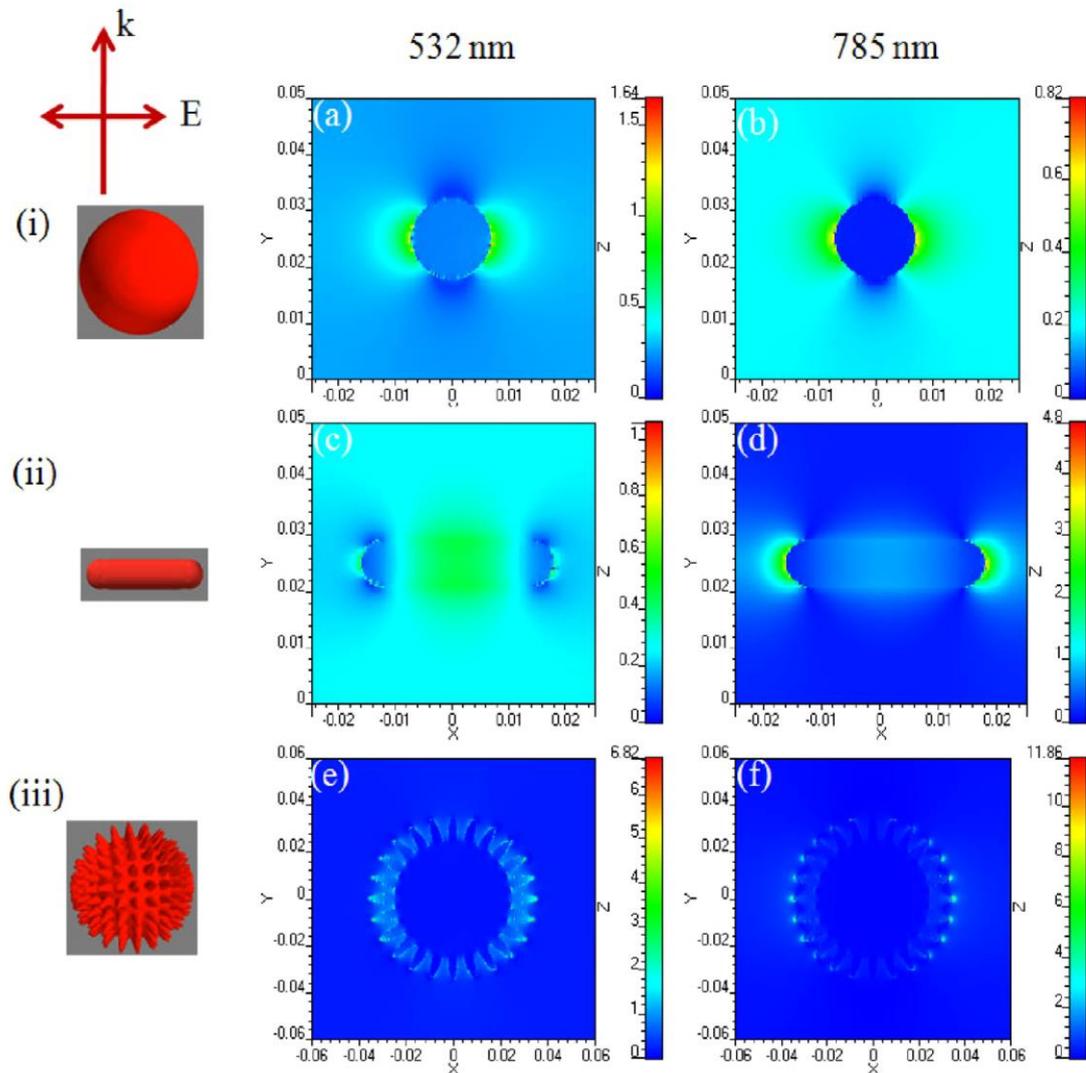
(a) Esquema da excitação do LSPR para nanobastões metálicos e (b) Espectro de extinção característico para nanobastões.

Fonte: ADAPTADO DE CAO, SUN e GRATTAN, 2014.

Há de se ressaltar que a diferença de polarizabilidade também afeta a intensidade do campo eletromagnético gerado na superfície das NPs plasmônicas. NPs plasmônicas anisotrópicas alongadas que possuem formas com bordas finas como bastões, bipirâmides, entre outras, concentram grandes campos eletromagnéticos em seus vértices. Além disso, por possuírem maior polarizabilidade, há um aumento maior do campo eletromagnético próximo à superfície em relação a partículas isotrópicas. Estruturas com pontas muito finas, como nanoestrelas e nanogalhos, podem aprisionar as oscilações de carga do metal em espaços confinados, aumentando ainda mais o efeito de intensificação do campo eletromagnético local (REGUERA *et al.*, 2017).

A Figura 7 mostra algumas simulações do campo eletromagnético para nanoesferas (i), nanobastões (ii) e nanoestrelas (iii) de ouro excitadas por duas radiações diferentes, incluindo o vetor de onda k e polarização do campo elétrico, E . A escala ao lado em cores mostra a intensidade dos campos eletromagnéticos locais em relação ao campo elétrico incidente. Para todas as nanoestruturas simuladas, os campos eletromagnéticos calculados são muito intensos próximo à superfície metálica, o que já foi mostrado na Figura 4. Pode-se observar, por outro lado, que as nanoestrelas possuem a maior intensidade nas duas excitações utilizadas nos cálculos e os campos locais intensificados ficam confinados em pequenas regiões próximas às pontas. Para os nanobastões, que apresentam dois modos LSPR, é possível observar duas regiões de intensificação bem distintas, uma para cada excitação utilizada. Pode-se observar que as excitações estão em ressonância com os dois modos do LSP dos bastões, e mostram que a intensificação para o modo LSPR-L é bem maior que do LSPR-T. Finalmente, as nanoesferas apresentaram a intensificação mais baixa do campo eletromagnético local se comparada às outras nanoestruturas. (LI *et al.*, 2012).

Figura 7: Simulação de campo eletromagnético para diferentes nanoestruturas, utilizando o método de diferenças finitas do domínio do tempo, FDTD do inglês *finite difference time domain*.



(i) Nanoesferas de ouro (ii) nanobastões de ouro (iii) nanoestrelas de ouro. As letras (a), (c) e (e) são referentes aos campos eletromagnéticos das nanoestruturas excitadas com a radiação com $\lambda_0 = 532$ nm e as letras (b), (d) e (f) referentes à excitação com $\lambda_0 = 785$ nm

Fonte: ADAPTADO DE LI *et al.*, 2012.

Nanopartículas de Au podem ser sintetizadas de diversas formas, utilizando desde métodos simples para nanoesferas, como aqueles reportados por Frens e Turkevich, citados acima, a métodos mais complexos para nanobastões, nanobipirâmides e nanogalhos (CHEN *et al.*, 2008). O aumento da simetria das nanoestruturas gera um aumento da intensidade da banda LSPR do modo do plasmon envolvido, já que estruturas de mesma simetria possuem bandas LSPR praticamente iguais, aumentando a intensidade média. A homogeneidade no tamanho também ajuda a diminuir a largura da banda LSPR, o que pode beneficiar seu uso em sensores (PETRYAYEVA e KRULL, 2011).

1.2.4 Biossensores LSPR

O uso do fenômeno LSPR na construção de biossensores, ou seja, utilizado para detectar biomoléculas, se baseia na dependência da banda LSPR com a concentração do analito na superfície de NPs plasmônicas preparadas especialmente para atuar como biossensor e nas propriedades da biomolécula a ser analisada. Assim, é possível utilizar uma relação como apresentada na Equação 8, que mostra a variação do índice de refração próximo à superfície metálica com a concentração do analito adsorvido na superfície da NP plasmônica (HOMOLA, 2008).

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

Equação 8

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

A detecção por LSPR é feita pela variação do comprimento de onda da banda LSPR das NPs plasmônicas com a mudança do índice de refração próximo a superfície metálica causada pela adesão de uma biomolécula na superfície das NPs. A variação da banda LSPR é mostrada analiticamente pela Equação 9 (GUPTA e KANT, 2018).

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

Equação 9

Onde: S é a sensibilidade característica do LSPR à variação de índice de refração do meio; l_d é o comprimento do decaimento associado ao campo eletromagnético próximo às NPs plasmônicas, que possui valor típico entre 5-6 nm, sendo exponencial com a distância da superfície metálica (HAES e VAN DUYNNE, 2002). O valor de l_d , entretanto, pode variar com o tamanho e forma das NPs, levando a tamanhos de mesma magnitude que de moléculas de proteínas (5-10 nm), o que torna o LSPR muito estudado para biossensoriamento (GUPTA e KANT, 2018).

Na Equação 9 tem-se a sensibilidade do biossensor LSPR, por definida como S e dada pela Equação 10, que mede a variação do máximo da banda LSPR (λ_p) com a variação

do índice de refração do meio, sem considerar a interface. S pode ser dado em nm ou eV/unidade de índice de refração (RIU) (AMENDOLA *et al.*, 2017).

$$S = \frac{d\lambda_p}{dn}$$

Equação 10

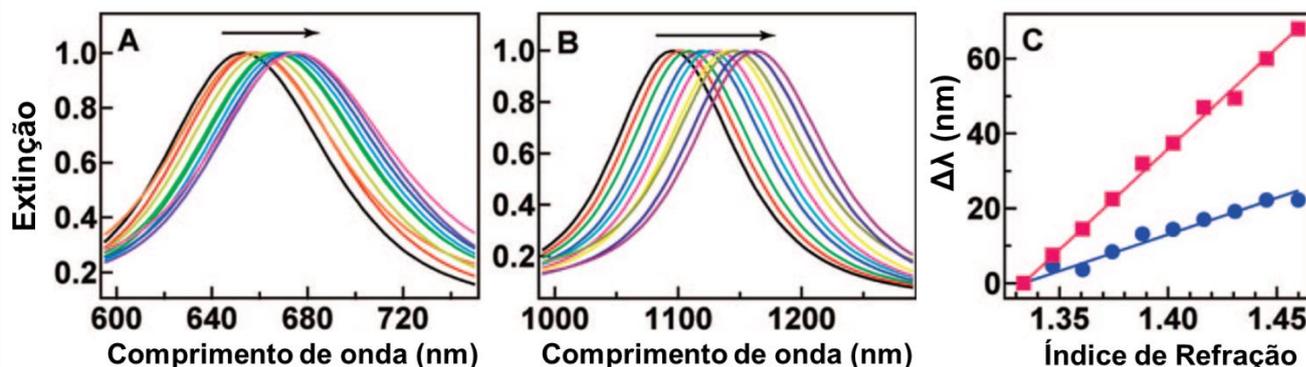
A figura de mérito (FOM) leva em consideração à largura a meia altura (FWHM) da banda LSPR, e trata-se de uma forma adicional de avaliar a performance do biossensor. A FOM, definida na Equação 11, é dada pela razão entre a sensibilidade e a FWHM da banda LSPR, e é considerada uma forma mais precisa de avaliar/comparar o desempenho de sensores LSPR (XU *et al.*, 2019). É desejável que os valores de S e FOM sejam os maiores possíveis em sensores LSPR.

$$FOM = \frac{S}{FWHM}$$

Equação 11

Um exemplo da análise de desempenho de duas nanoestruturas de Au como biossensor LSPR é mostrado na Figura 8. Na Figura 8A e B mostram-se os espectros de extinção para nanobastões de Au (AuNRs) e nanobipirâmides de Au (AuNBs) redispersos em diferentes concentrações de glicerol em água. É possível observar nessas figuras a variação do máximo da banda LSPR com a variação do índice de refração da mistura glicerol-água utilizada (a seta indica o aumento da concentração de glicerol e, conseqüentemente, do índice de refração do meio). Na Figura 8C, tem-se as curvas de sensibilidade para os AuNRs em azul e AuNBs em vermelho. Interessante notar que as duas formas de AuNPs são sensíveis às mudanças no índice de refração; porém, por possuírem o LSPR em maiores comprimentos de onda, as AuNBs se mostram mais sensíveis (inclinação da curva de sensibilidade) que os AuNRs (JAIN e EL-SAYED, 2007).

Figura 8: Comparação da sensibilidade entre AuNRs e AuNBs



(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: ADAPTADO DE CHEN *et al.*, 2008.

Existem algumas características e atributos que um biossensor LSPR deve ter para que possa ter o melhor desempenho possível (BHALLA *et al.*, 2016). A sensibilidade é uma dessas importantes características, na prática como mostrado na Equação 10 e na Figura 8, a sensibilidade é a inclinação de uma curva analítica, obtidas através da regressão linear de um gráfico resposta (variação do λ_{\max} da banda LSPR) *versus* concentração ou resposta *versus* variação do índice de refração do meio. É desejável que a sensibilidade seja a maior possível, porque um bom sensor deve apresentar elevadas respostas frente a pequenas variações do índice de refração ou da concentração do analito (VALSECCHI e BROLO, 2013).

A linearidade também é necessária e está relacionada à resolução do biossensor e mostra a precisão da resposta medida. Um bom biossensor deve possuir uma boa curva analítica, que permita que o resultado seja diretamente proporcional às mudanças do índice de refração em função da concentração do analito e que a concentração a se determinar esteja nessa faixa linear da curva (BHALLA *et al.*, 2016).

Reprodutibilidade e estabilidade são características importantíssimas, principalmente quando se trata de biossensores de baixo custo. A reprodutibilidade é a capacidade do biossensor em gerar a mesma resposta analítica para experimentos em replicatas, caracterizada pela exatidão e precisão da medida. Também deve ser estável a mudanças no ambiente ao seu redor (BHALLA *et al.*, 2016).

As NPs metálicas em suspensão nem sempre permitem sua reutilização e não são necessariamente estáveis a mudanças no meio. Nesse contexto, é bastante interessante o uso de biossensores LSPR com NPs adsorvidas em diferentes suportes (LANGER *et al.*, 2015), como o vidro, por exemplo, sobre o qual se utilizam silanos substituídos com grupos de alta

afinidade com NPs metálicas. Um desses silanos é o 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS), usado para ligar as camadas de NPs entre si e ao vidro, permitindo a adesão de diferentes quantidades de NPs ao vidro através de ciclos de adsorção (FAN e BROLO, 2009). É uma boa estratégia esse tipo de suporte, pois permite manter as propriedades das NPs em um sistema organizado e de grande dimensão. Também podem ser utilizados outros suportes, como o politereftalato de etileno (PET) (FAN *et al.*, 2010), papel (ZHANG *et al.*, 2019) entre outros.

Por último, a especificidade é uma das características mais desejáveis em um biossensor, e trata-se de um dos maiores desafios em sua construção (WANG *et al.*, 2017). Especificidade pode ser definida como a capacidade de determinar com exatidão e unicamente um analito dentro de uma matriz com possíveis interferentes, produtos de degradação ou impurezas (BHALLA *et al.*, 2016). Para que sejam específicos, pode-se recorrer às interações por bioafinidade, como antígeno-anticorpo, enzima-substrato, biotina-estreptavidina. Além disso, é necessário fazer uma proteção na superfície metálica para que não haja adsorção não específica que resulte em interferência no sinal analítico. Essa proteção pode ser feita a partir de proteínas como a BSA (albumina de soro bovino) (CAO *et al.*, 2012) ou polímeros como o PEG-SH (polietileno glicol-tiolado) (MACLAUGHLIN *et al.*, 2013).

A interação antígeno-anticorpo é a base dos chamados imunoenaios, servindo como experimentos de prova-de-conceito (PdC) ou mesmo na detecção das biomoléculas de interesse. Outro sistema bastante utilizado como PdC para avaliação da capacidade de sensoriamento de um biossensor é o sistema estreptavidina-biotina (SEPÚLVEDA *et al.*, 2009), porque essas duas espécies possuem uma ligação muito forte e específica. Primeiramente a biotina é ligada à superfície da NP e posteriormente interage com a estreptavidina, o interessante sobre esse sistema é que além de ser PdC, pode ser utilizado como um ensaio de detecção também. A estreptavidina é uma proteína tetramétrica (GREEN, 1975), podendo interagir com até quatro moléculas biotiniladas com anticorpos e ácidos nucleicos que são encontrados comercialmente. Na literatura já foi reportada detecção de estreptavidina em concentrações na ordem de attomolar (FERREIRA *et al.*, 2009).

Os imunoenaios são base para diversos biossensores (LUAN *et al.*, 2016), assim como os trabalhos nessa tese. São bastante utilizados para múltiplas detecções, porque os anticorpos, elementos de bioreconhecimento, possuem alta seletividade e sensibilidade, devido à especificidade das suas interações que possuem alta constante de equilíbrio de associação com seu respectivo antígeno. Os anticorpos são uma família de glicoproteínas conhecidas como imunoglobulinas (Ig) produzidas pelas células B (FARKA *et al.*, 2017).

Normalmente são ligados às NPs por processos de várias etapas. Um desses processos é a utilização de camadas auto-organizadas (SAM, do inglês *self assembled monolayers*) de tiois na superfície das AuNPs; os tiois adicionados reagem fortemente com a superfície metálica. Posteriormente utilizam-se moléculas com reatividade específica para os anticorpos, sendo que um método bastante comum utilizar N-hidroxisuccinimida (NHS) e N-etilcarbodiimida (EDC) (CAO *et al.*, 2012).

O uso do LSPR em biossensoriamento começou com o trabalho de Englebienne (ENGLEBIENNE, 1998), que detectou uma ligação antígeno-anticorpo utilizando o deslocamento da banda LSPR. Sete anos após a primeira detecção com a técnica, Haes e colaboradores fizeram a primeira descrição de um diagnóstico clínico utilizando o LSPR (HAES *et al.*, 2005) e desde então os biossensores LSPR vêm sendo utilizados nos mais diversos métodos de detecção de biomoléculas (SANTOS *et al.*, 2016).

De fato, a instrumentação comercial ainda é dominada pelo SPR, principalmente pelo fato de se ter equipamentos simples e prontos para análise. Porém, a técnica LSPR oferece algumas vantagens para o sensoriamento como: utilização de nanoestruturas com tamanhos e formas diferentes, facilidade de transporte, possível miniaturização e menores custos (HAES e VAN DUYNNE, 2004).

Existem várias vantagens no uso do LSPR como biossensor (SUGUMARAN *et al.*, 2018): (i) alta sensibilidade a mudanças no índice de refração e no meio adjacente às NPs; (ii) não necessita de marcadores; (iii) detecções podem ser realizadas em tempo real por sistemas de microfluidica; (iv) baixo tempo de análise; (v) baixo consumo de amostra; (vi) boa reprodutibilidade; (vii) podem ser de baixo custo, simplicidade de análise e nos dias de hoje ainda podem ser portáteis (PAN *et al.*, 2017).

Uma vantagem adicional da técnica LSPR é que, além de seu uso como transdutor do sinal biológico, o fenômeno permite construir biossensores baseados em outras técnicas. A grande intensificação do campo eletromagnético local gerada pelo LSPR permite o estudo de espectroscopias intensificadas por superfície, ou SES (do inglês, *surface enhanced spectroscopy*) (AROCA, 2013), como o espalhamento Raman intensificado por superfície, SERS (do inglês, *surface enhanced Raman scattering*) e a fluorescência intensificada por superfície, SEF (do inglês, *surface enhanced fluorescence*) (DONG *et al.*, 2015), que serão abordados nas próximas seções.

1.2.5 Espectroscopia Raman intensificada por superfície e sua aplicação como biossensores

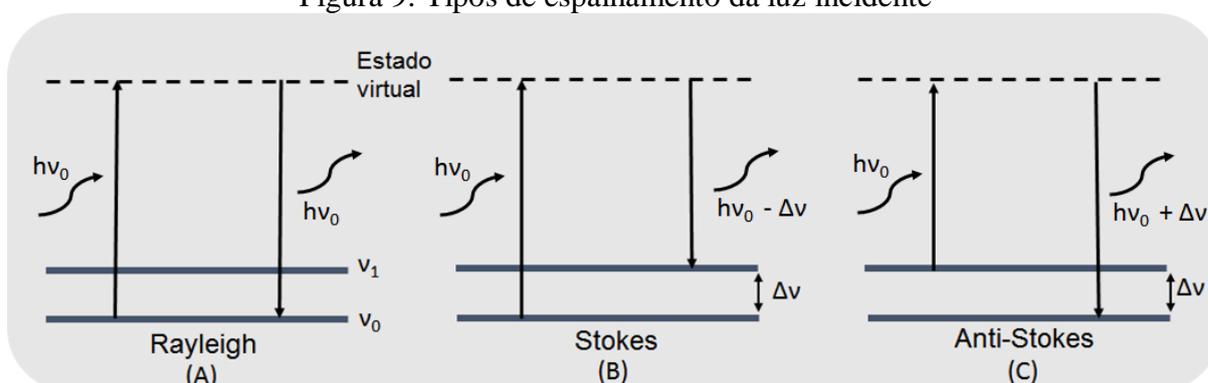
Essa seção abordará os conceitos da espectroscopia Raman e do espalhamento Raman intensificado por superfície e sua aplicação como biossensor.

1.2.5.1 Espectroscopia Raman

A base para o efeito SERS é a intensificação do espalhamento Raman. Em 1928 Chandasekhara Venkata Raman e Kariamanickam Srinivasa Krishnan descobriram um novo tipo de radiação secundária, posteriormente chamada de espalhamento Raman (RAMAN e KRISHNAN, 1928), a qual levou Raman a receber o prêmio Nobel em 1930. Após sua descoberta, foi utilizado como uma poderosa ferramenta para elucidação da estrutura química e de ligação de compostos, porém, foi apenas com o advento do laser que o efeito Raman passou a ser muito utilizado na comunidade científica (PANNEERSELVAM *et al.*, 2018).

O espalhamento Raman é observado como um espalhamento inelástico de uma radiação monocromática incidente em uma molécula. É importante notar que o espalhamento da radiação incidente mais provável é o espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico). Na Figura 9 são mostrados os três possíveis tipos de espalhamento da luz incidente para uma transição vibracional.

Figura 9: Tipos de espalhamento da luz incidente



(a) espalhamento Rayleigh (b) espalhamento Raman Stokes (c) espalhamento Raman anti-Stokes
 Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Na Figura 9A é destacado o espalhamento Rayleigh, que resulta da perturbação da molécula em seu estado vibracional fundamental pela radiação monocromática incidente a um estado virtual e posteriormente retorna para o mesmo estado de energia, espalhando um fóton

de energia igual ao fóton incidente, caracterizando, portanto, um espalhamento elástico. Os espalhamentos inelásticos Raman Stokes e Raman anti-Stokes são mostrados nas Figura 9B e Figura 9C. Nesses casos, a molécula após sofrer a perturbação retorna a um estado vibracional de energia diferente do inicial. No espalhamento Raman Stokes, a molécula é perturbada no estado vibracional fundamental e retorna para um estado vibracional excitado, resultando em um fóton espalhado de menor energia que o fóton incidente. Já no espalhamento Raman anti-Stokes, a molécula está em um estado vibracional excitado e após perturbação retorna ao estado fundamental, e assim o fóton espalhado possui maior energia que o fóton incidente (SALA, 1996).

Como visto na Figura 9, a radiação inelástica espalhada dá informações sobre as transições vibracionais da molécula. Apesar de envolver transições vibracionais em ambos os casos, os fenômenos envolvidos na espectroscopia Raman e de absorção no infravermelho diferem bastante entre si. Os espectros nas duas técnicas experimentais diferem pelas regras de seleção de cada fenômeno e número de bandas. Frequências e intensidades relativas estão associadas a cada modo normal de vibração e os modos ativos no Raman podem não ser os mesmos ativos no infravermelho (NAKAMOTO, 2008). No espalhamento Raman, por exemplo, há pouca interferência de água e CO₂, que são grandes problemas para o infravermelho (PANNEERSELVAM *et al.*, 2018). Uma das principais características da técnica Raman é a possibilidade de obtenção de impressões digitais de materiais químicos e biológicos, devido às bandas no espectro Raman características para cada grupo químico presente nas moléculas. Essa possibilidade faz com que a técnica Raman seja bastante utilizada na caracterização de diferentes espécies, inclusive de estruturas moleculares, conformação e interação entre moléculas (ZONG *et al.*, 2018).

A intensidade do sinal Raman, porém é baixa, devido à baixa secção de choque do espalhamento Raman (da ordem de 10^{-30} a 10^{-25}cm^2 por molécula (FARIA *et al.*, 1999)). Isso implica que são necessárias entre 10^6 a 10^{10} moléculas para que uma sofra um espalhamento Raman (FARKA *et al.*, 2017). Há, portanto, a necessidade de aumento do sinal Raman para estudo de soluções diluídas ou qualquer outro sistema que envolva um número pequeno de moléculas. Um dos efeitos de intensificação utilizados é o efeito SERS, que se apresenta como uma ferramenta poderosa para melhorar o uso da espectroscopia Raman.

1.2.5.2 SERS e sua aplicação como biossensor

Apesar da descoberta do espalhamento Raman ter ocorrido em 1928, foi apenas em 1974 a primeira observação do efeito SERS. Fleischmann e colaboradores, sabendo que a intensidade Raman era dependente do número de espalhadores, tentaram aumentar o sinal Raman de moléculas orgânicas adsorvidas sobre superfícies metálicas aplicando vários ciclos de oxirredução num eletrodo de prata, a fim de aumentar a área superficial através da rugosidade induzida pelo processo. Obtiveram um sinal Raman muito intenso e com alta relação sinal/ruído da piridina adsorvida no eletrodo (FLEISCHMANN *et al.*, 1974). Passados poucos anos, em 1977, dois trabalhos independentes verificaram que havia uma intensificação do espalhamento Raman no experimento original. Jeanmaire & Van Duyne (JEANMAIRE e VANDUYNE, 1977) e Albrecht & Creighton (ALBRECHT e CREIGHTON, 1977) mostraram que a alta relação sinal/ruído obtida não deveria ser atribuída apenas ao aumento da área superficial do eletrodo. Esse aumento era de 10^2 vezes, enquanto o aumento na seção de choque da piridina era de 10^6 vezes (FARIA *et al.*, 1999).

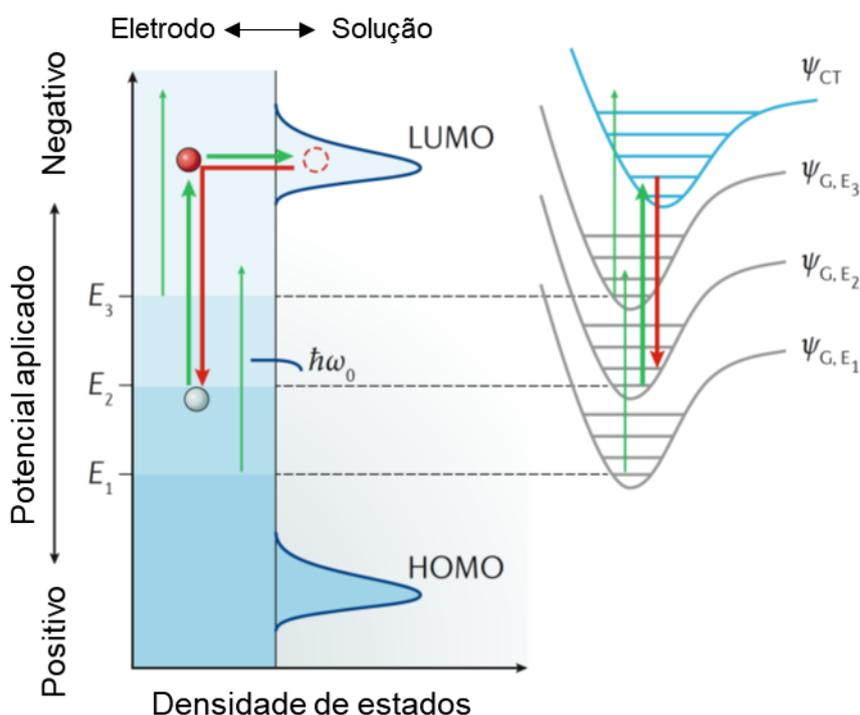
Em 1978, Moskovits (MOSKOVITS, 1978) propôs que as ressonâncias de plasmon de superfície presentes nos eletrodos de prata rugosos teriam papel importante na intensificação do efeito Raman, além de prever que esse efeito seria possível em coloides dos metais de cunhagem. Um ano depois Creighton e colaboradores (CREIGHTON *et al.*, 1979) provaram o previsto, observando o efeito de intensificação Raman em coloides de Ag e Au. Posteriormente foi dado o nome de efeito SERS por Van Duyne (VAN DUYNE, 1979)

Desde sua descoberta, o efeito SERS passou por um período de entendimento do fenômeno, principalmente na década de 1980, seguido de aplicações que, com o passar dos anos vêm se tornando as mais diversas (GRAHAM *et al.*, 2017). Nos dias atuais, a comunidade científica aceita a explicação do efeito SERS com base em dois modelos, chamados de modelo eletromagnético e modelo químico (CARDINAL *et al.*, 2017). Ainda não há plena certeza sobre a contribuição de cada mecanismo para o efeito com um todo. Alguns autores também tratam o efeito SERS como um mecanismo só e vêm ao longo dos anos trabalhando nessa teoria que trata os dois mecanismos propostos anteriormente em um único efeito eletrônico (LOMBARDI e BIRKE, 2012).

O modelo químico está relacionado com a forte interação entre a molécula espalhadora e a superfície metálica. Há mudanças na polarizabilidade molecular devido à formação de um complexo de superfície, que pode ser definido pelo acoplamento da banda de condução do substrato plasmônico aos orbitais moleculares da molécula adsorvida

(CARDINAL *et al.*, 2017). Na Figura 10 são mostrados os níveis de Fermi de um substrato plasmônico com a variação do potencial eletroquímico aplicado a um eletrodo em solução. HOMO e LUMO são respectivamente, o orbital ocupado de maior energia e o desocupado de menor energia da molécula adsorvida; o nível de Fermi do metal se encontra com energia intermediária entre estes dois estados quando a superfície não transfere elétrons para o material sem aplicação de potencial. A maior intensificação do Raman é para o potencial aplicado de E_2 , onde a radiação incidente está em ressonância com a transição do nível de Fermi do substrato para o LUMO da molécula (ZHAN *et al.*, 2018). A intensificação prevista por esse modelo fica entre 10 a 100 vezes, que é consideravelmente menor que o valor experimental; porém, a formação do complexo de superfície pode gerar mudanças no espectro da molécula, o que é observado experimentalmente, mas não é explicado pelo modelo eletromagnético (MCNAY *et al.*, 2011).

Figura 10: Mecanismo químico para o SERS - transferência de carga



Fonte: ADAPTADO DE ZHAN *et al.*, 2018.

O mecanismo eletromagnético, por outro lado, envolve a intensificação do campo eletromagnético próximo à superfície das NPs plasmônicas, que intensifica o sinal Raman das moléculas adsorvidas sobre o metal. Esse é um processo de duas etapas (Figura 11), sendo que na primeira etapa a luz incidente (λ_0) é intensificada pela NPs, onde G_1 é o fator de intensificação do campo elétrico nessa primeira etapa. Enquanto na segunda etapa, o fóton

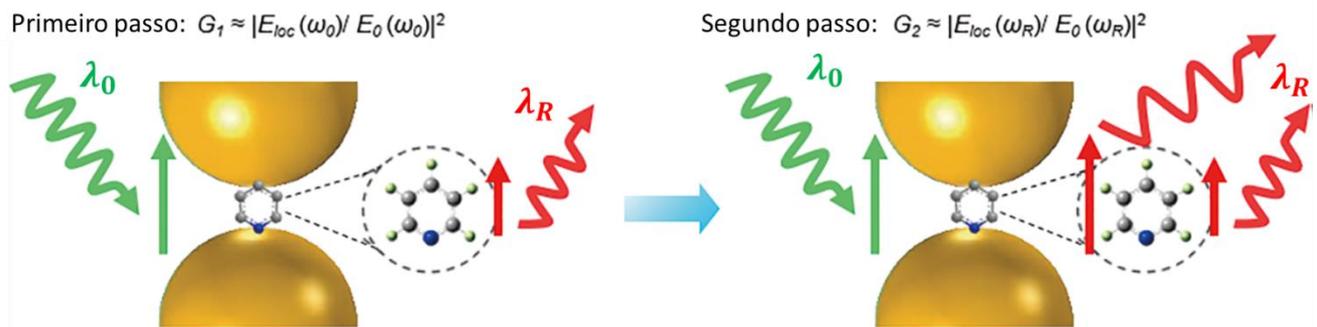
Raman (λ_R) gerado pela molécula é intensificado pelas NPs e G_2 é o fator de intensificação da segunda etapa. Desse modo, ao final tem uma intensificação SERS pelo campo eletromagnético mostrada na Equação 12.

$$G_{SERS} \approx G_1^2 G_2^2$$

Equação 12

Onde $G_1 \approx |E_{loc}(\omega_0)/E_0(\omega_0)|^2$ e $G_2 \approx |E_{loc}(\omega_R)/E_0(\omega_R)|^2$, sendo E_0 é campo eletromagnético inicial e E_{loc} o campo eletromagnético local próximo as NPs.

Figura 11: Esquema do processo de duas etapas para o mecanismo eletromagnético



λ_0 é luz incidente, e λ_R é o fóton Raman, a seta maior indica que é mais intenso.

Fonte: ADAPTADO DE ZONG *et al.*, 2018.

Portanto, a intensificação pelo campo eletromagnético local pode ser até de E^4 se for considerado que as frequências da radiação incidente e espalhada são similares. É interessante notar que esse mecanismo de intensificação não permite prever mudanças no espectro Raman da molécula com o efeito SERS, já que não há descrição da influência da molécula no efeito (ZONG *et al.*, 2018).

A intensificação do sinal Raman gerada pelo efeito SERS é tipicamente entre 10^5 e 10^6 vezes (FAN *et al.*, 2011), mas existem maiores intensificações reportadas. Por exemplo, no regime de uma única molécula (*single-molecule-SERS* ou SM-SERS) é possível ter intensificações na ordem de 10^7 a 10^8 vezes (LE RU *et al.*, 2007). Apesar de normalmente se falar do efeito eletromagnético gerado por uma NP plasmônica, na maioria dos casos uma única NP não é capaz de gerar intensificação suficiente para aplicações que envolvem soluções diluídas (ZONG *et al.*, 2018). A intensificação SERS é dada pela média das intensificações geradas pelos chamados *hot spots*, que se caracterizam por duas ou mais nanopartículas metálicas muito próximas, de maneira que os modos dos plasmon de

superfície interagem, gerando grandes intensificações do campo eletromagnético local. Uma molécula que estiver nesses espaços terá grandes intensificações do seu sinal Raman (DING *et al.*, 2016).

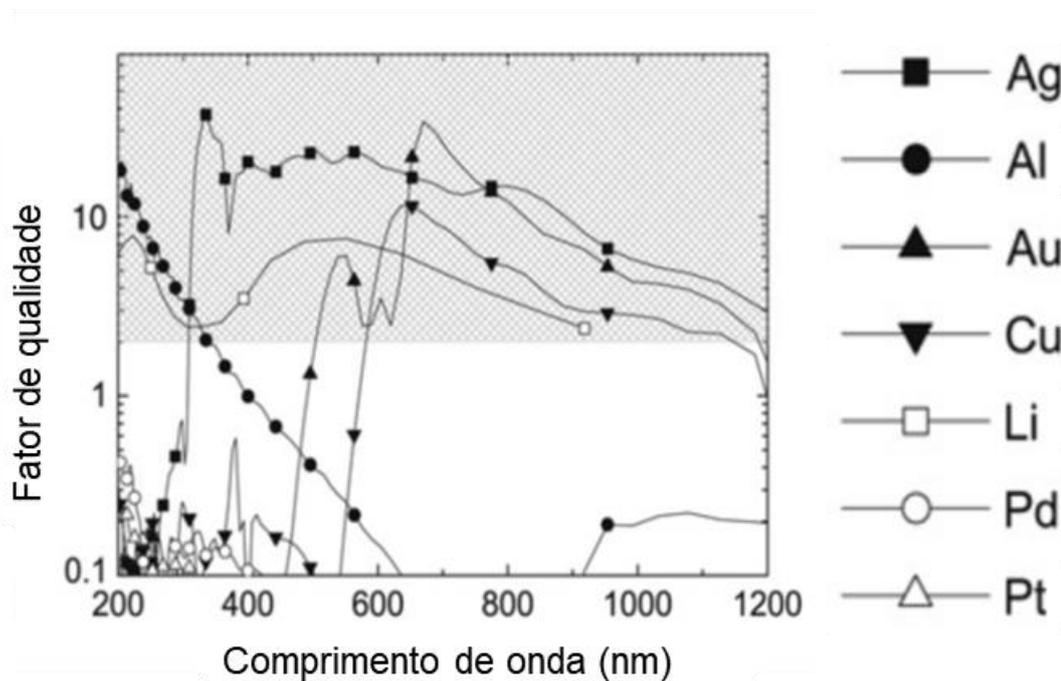
Os metais de cunhagem também são os mais utilizados como substrato SERS, e a explicação para isso está na função dielétrica desses metais. A constante dielétrica de um metal em um determinado comprimento de onda é um número complexo, ou seja, possui parte real e parte imaginária. A parte real está associada à posição da banda de ressonância do plasmon de superfície das NPs, quanto mais negativa maior a eficiência no espalhamento de luz. A parte imaginária está relacionada à intensidade da banda de ressonância e seu valor dá informação sobre a absorção de luz do metal. Na Equação 13 é mostrado o fator de qualidade Q , que relaciona as duas partes da constante dielétrica, a real, $Re(\varepsilon)$, e imaginária, $Im(\varepsilon)$ (LE RU e ETCHEGOIN, 2009; AMENDOLA *et al.*, 2017).

$$Q = \frac{\omega(d(Re)/d\omega)}{2(Im(\omega))^2}$$

Equação 13

Um bom substrato SERS deve ter Q maior que 2, porém é desejável que seja maior que 10. É interessante notar que para obter valores de Q altos, a parte imaginária precisa ter valores baixos, implicando em menores perdas do campo elétrico por absorção pelo metal, e que a parte real seja a maior possível. Na Figura 12 é apresentado o gráfico de $Q \times$ comprimento de onda, para vários metais (LE RU e ETCHEGOIN, 2009).

Figura 12: Gráfico de Q versus comprimento de onda para diversos metais



Fonte: ADAPTADO DE LE RU e ETCHEGOIN, 2009.

Pelo gráfico apresentado na Figura 12 pode-se concluir que todos os metais de cunhagem possuem bom Q para comprimentos de onda maiores que 600 nm, com destaque para a Ag, que pode ser usada a partir de 300 nm. Outros metais como o lítio, por exemplo, possui bom valor de Q, porém a construção de nanoestruturas com metais tão reativos é praticamente inviável (LE RU e ETCHEGOIN, 2009).

O interesse no SERS para aplicações biológicas e médicas surgiu há bastante tempo porém nos últimos anos tem intensificado seu uso na detecção de biomoléculas (CIALLA-MAY *et al.*, 2017). O SERS apresenta diversas vantagens para bioanálises se comparado a outras técnicas: possui excelente sensibilidade na superfície metálica, mesmo em regime de uma única molécula; oferece informações de impressão digital para sistemas biológicos; se usado da maneira correta é resistente à fotodegradação; possui bandas muito mais finas que a fluorescência (10-100 vezes mais); podem ser feitas múltiplas detecções em uma só medida; as nanoestruturas utilizadas podem ter diferentes tamanhos e formas, podendo ainda ser modificadas de acordo com a necessidade (ZONG *et al.*, 2018).

A detecção através da técnica SERS pode ser feita utilizando duas metodologias, os chamados métodos intrínseco e extrínseco. O método intrínseco, que se caracteriza quando o sinal SERS do próprio analito é intensificado pelas nanoestruturas metálicas, ou seja,

permitindo detecção direta do analito de interesse. O método extrínseco, por outro lado, se caracteriza no caso do sinal SERS do analito pouco intenso, o que exige que seja utilizada uma molécula prova que possui sinal SERS intenso e bastante conhecido no processo de reconhecimento molecular, ou seja, por detecção indireta (HOWES, RANA, *et al.*, 2014).

1.2.6 Fatores de intensificação

Uma maneira de se comparar substratos SERS diferentes ou testar a reprodutibilidade de um substrato SERS é através do uso dos fatores de intensificação. A intensidade do efeito SERS depende de vários fatores, como por exemplo o comprimento de onda do laser de excitação, potência, ângulo de incidência, as características do substrato e do analito entre outros. Um bom fator de intensificação não deve depender desses parâmetros para que seja de fácil obtenção e possa ser utilizado para comparar diferentes substratos com condições de operação diferentes. O fator de intensificação analítico (AEF, do inglês *analytical enhancement factor*) mostrado na Equação 14 é utilizado para avaliar substratos SERS e leva em consideração apenas intensidade dos espectros e a concentração das moléculas (LE RU *et al.*, 2007; PORTER e GRANGER, 2017).

$$AEF = \frac{I_{SERS}/C_{SERS}}{I_{NR}/C_{NR}}$$

Equação 14

Na Equação 14 I_{SERS} e I_{NR} são as intensidades dos espectros SERS e Raman normal. C_{SERS} e C_{NR} são as concentrações do analito nos respectivos espectros. As condições do equipamento para obtenção do AEF devem ser as mesmas para o analito na presença das NPs e em sua ausência. Pela simplicidade de cálculo, esse foi o método escolhido no presente trabalho, mas é importante notar que os valores calculados podem ser fortemente subestimados e deve ser considerado apenas como um método para comparar substratos similares.

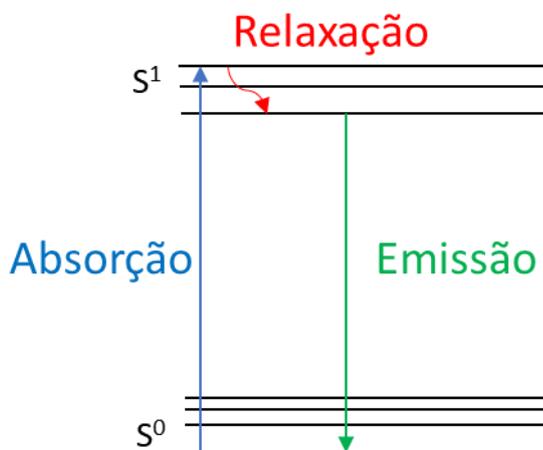
1.2.7 Fluorescência intensificada por superfície e sua aplicação como biossensor

A fluorescência é uma técnica bastante utilizada como método de detecção de espécies químicas e biológicas e como técnica de transdução em biossensores. Um dos testes que utiliza fluorescência nos dias de hoje é o método ELISA (GUO *et al.*, 2015). Seu uso na

construção de biossensores é devido a algumas vantagens como: sensibilidade; especificidade; simplicidade e velocidade de análise. Além disso, a fluorescência pode ser uma técnica não destrutiva, o que é importante para análises biológicas, e permite detectar múltiplos analitos no mesmo experimento usando diferentes comprimentos de onda de emissão característicos (JEONG *et al.*, 2018).

A fluorescência é definida como um tipo de luminescência de tempo de vida curto. Na Figura 13 é mostrado o Diagrama de Jablonski, que demonstra o fenômeno da fluorescência através de transições energéticas. Em um primeiro momento, o fóton incidente é absorvido pelo fluoróforo levando o mesmo para um estado eletrônico excitado S^1 , posteriormente parte da energia é perdida por interações não radiativas. Por último, o fóton é emitido com a volta do sistema molecular para o estado eletrônico fundamental. A luz emitida foi observada pela primeira vez por Stokes em 1852, quando expôs a Fluorita (mineral de fluoreto de cálcio) a radiação eletromagnética (GIRIGOSWAMI e AKHTAR, 2019).

Figura 13: Diagrama de Jablonski para a fluorescência



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A detecção por fluorescência depende da eficiência quântica do fluoróforo, se tornando problemática quando há baixa eficiência quântica, fotodegradação e autofluorescência (JEONG *et al.*, 2018). Nesses casos, há a necessidade de intensificar a fluorescência para que seja possível sua aplicação.

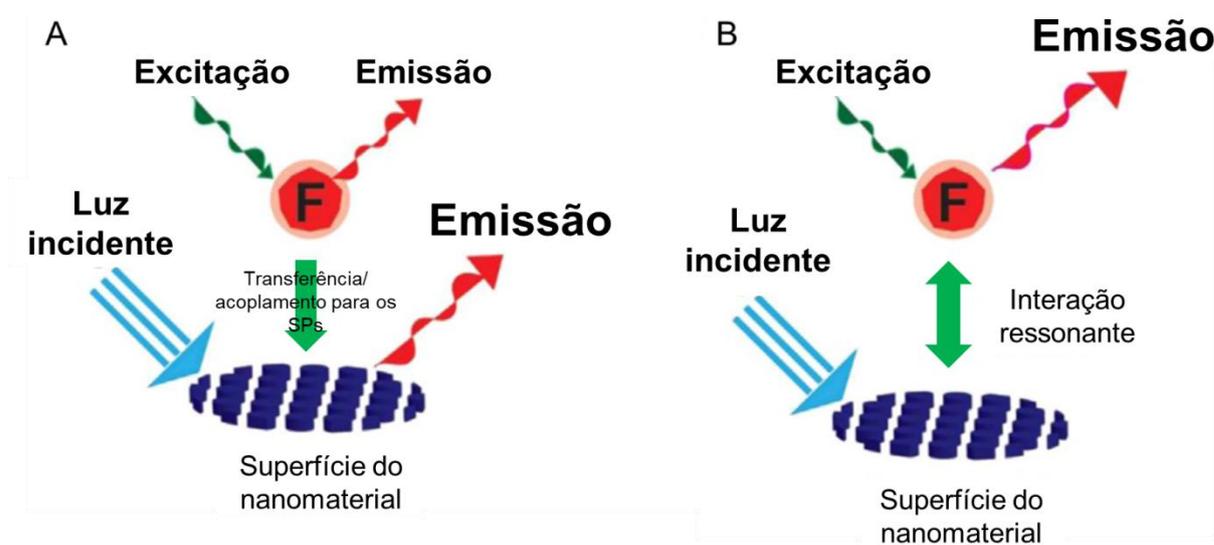
A intensificação da fluorescência próxima a nanoestruturas metálicas foi observada ao final década de 1960 por Drexhage (DREXHAGE, 1970). Após essa descoberta, alguns pesquisadores tentaram entender melhor o fenômeno, porém nos anos 2000 ainda havia pouca literatura na área (XU *et al.*, 2018). A intensificação da fluorescência por superfície (SEF), também chamada de MEF (do inglês, *metal enhanced fluorescence*) ou PEF

(do inglês, *plasmon-enhanced fluorescence*), só a partir do ano de 2007 passou a chamar atenção da comunidade interessada na construção de sensores e desde então vários tipos de nanoestruturas têm sido testadas para esse tipo de biossensoriamento.

A intensificação pelo SEF pode variar entre 10 a 100 vezes (LI *et al.*, 2015), menor do que a intensificação observada no efeito SERS. O mecanismo da intensificação SEF é o mecanismo eletromagnético, intensificação do campo eletromagnético próximo à superfície metálica, porém, a intensificação no SEF é considerada como surgindo apenas do campo elétrico incidente, o que resulta em uma dependência com E^2 , enquanto que no SERS a intensificação é dos campos elétricos incidente e espalhado, o que gera uma intensificação de cerca de E^4 (AROCA, 2013).

Normalmente, nanopartículas metálicas suprimem a fluorescência, devido ao acoplamento com o plasmon de superfície, já que um fluxo de energia do fluoróforo para o metal é gerado, competindo com o fenômeno de fluorescência e suprimindo a mesma, como mostra esquematicamente a Figura 14A. Uma maneira de diminuir essa supressão é adicionar uma camada separadora, composta de material semicondutor ou isolante, na superfície metálica, de modo que o fluoróforo não fique diretamente adsorvido. Tipicamente, uma distância que aumenta a eficiência da fluorescência está entre 5-10 nm. Assim, o fluoróforo sofrerá apenas ação do campo eletromagnético local intensificado, que pode intensificar o sinal de fluorescência, Figura 14B (AROCA, 2013; JEONG *et al.*, 2018).

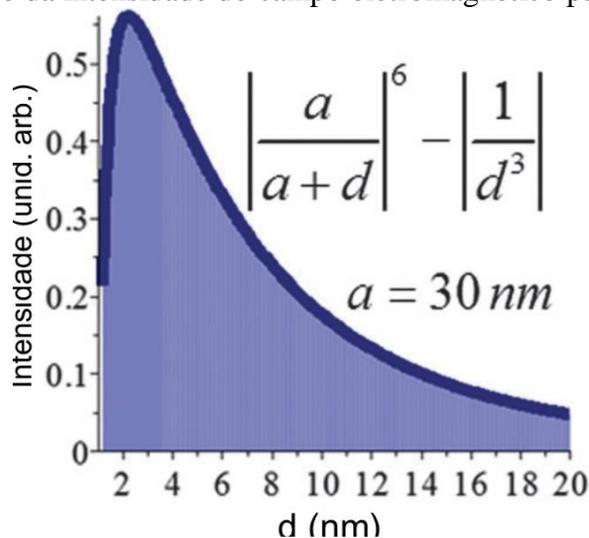
Figura 14: Esquema de interação do fluoróforo com a superfície metálica



(a) Fluoróforo próximo à superfície metálica resulta em supressão da fluorescência (b) Fluoróforo em distância ótima da superfície permite que ocorra intensificação da fluorescência
Fonte: ADAPTADO DE JEONG *et al.*, 2018.

O campo eletromagnético próximo às NPs plasmônicas decai rapidamente com o aumento da distância, como mostrado na Figura 15, que reporta o decaimento do campo eletromagnético para uma esfera metálica de raio (a) em função da distância (d). Após certa distância ótima, o decaimento da intensidade do campo eletromagnético é muito grande. Um dos desafios no SEF é otimizar a distância do espaçador utilizado, pois deve proteger o fluoróforo da superfície metálica, mas não pode deixar com que fique muito distante da superfície (AROCA, 2013).

Figura 15: Decaimento da intensidade do campo eletromagnético para uma esfera de raio a



Fonte: ADAPTADO DE AROCA, 2013; JEONG *et al.*, 2018.

1.3 JUSTIFICATIVA

A grande maioria da população mundial (cerca de 80%) vive em países em desenvolvimento, muito desses são países com baixo padrão de vida, indústria fraca e principalmente baixo IDH (índice de desenvolvimento humano). Como citado nas seções anteriores, grande parte das técnicas de detecção comerciais, envolvem processos complicados, necessitando de muita amostra, com instrumentação cara e complexa. Em virtude disto, o LSPR é uma grande proposta no desenvolvimento de sensores de baixo custo que sejam eficazes e de fácil uso (HAMMOND *et al.*, 2014).

Nesse contexto, esse trabalho de doutorado visou a construção e caracterização de biossensores plasmônicos utilizando nanoestruturas anisotrópicas de Au e três diferentes técnicas de detecção, que possam ser de baixo custo e possuírem alta sensibilidade com facilidade de uso, características que fazem tais biossensores serem promissores na utilização em países em desenvolvimento como o Brasil.

2 OBJETIVOS

O projeto de doutorado tem como objetivo geral a síntese e caracterização de AuNPs anisotrópicas para possível aplicação na construção de biossensores nanoestruturados baseados nas técnicas de LSPR, SERS e SEF.

Os objetivos específicos são:

- a) Síntese e caracterização das AuNPs com tamanhos e formas controladas;
- b) Construção de filmes de AuNPs sobre lâminas de vidro com alta compactação e homogeneidade;
- c) Estudo da sensibilidade das AuNPs livres e imobilizadas frente a modificações no índice de refração do meio;
- d) Funcionalização das AuNPs com sistemas de biomoléculas modelo;
- e) Testes de desempenho de biossensoriamento das AuNPs funcionalizadas para sistemas modelo, utilizando as técnicas LSPR, SERS e SEF.

3 METODOLOGIA

3.1 EQUIPAMENTOS

As nanoestruturas de Au sintetizadas neste trabalho foram caracterizadas primeiramente por espectroscopia no UV-VIS utilizando os espectrômetros Ocean Optics 2000 e Ocean Optics 2000+ XR1 + ES com fontes de luz excitante em 400 a 1100 nm e 200 a 1800 nm respectivamente. Para complementar os resultados de espectroscopia no UV-VIS foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de varredura (SEM) utilizando um microscópio eletrônico de varredura, tipo *field emission gun* (FEG-SEM), da marca FEI, modelo Magellan, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) utilizando um microscópio de transmissão, da marca FEI, modelo Tecnai Spirit, da Divisão de Metrologia de Materiais (Dimat) no Instituto de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) em Duque de Caxias, RJ. Os filmes de AuNPs adsorvidas sobre vidro foram caracterizados por microscopia de força atômica (AFM) utilizando um microscópio de força atômica Nanosurf com controle Nanosurf easyscan e mesa anti-vibratória Isostage, do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG.

Os estudos envolvendo as técnicas SERS e SEF foram feitos em um espectrômetro Raman Bruker, modelo Senterra, nas radiações excitantes em 633 nm e 785 nm, acoplado a um microscópio óptico Olympus BX51, utilizando uma objetiva com aumento de 50× ULWD (NA = 0,50), permitindo a realização de medidas de mapeamento Raman.

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

3.2 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); Ácido mercaptoundecanóico, MUA (Sigma Aldrich; 95%);

N-hidroxisuccinimida, 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; $\geq 98\%$); anticorpo de Albumina de Soro Bovino (Sigma Aldrich); corante IR-820 (Sigma Aldrich); corante azul do Nilo (Sigma Aldrich; 85%); Glicerol. As soluções foram preparadas utilizando água deionizada ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

3.3 SÍNTESE DOS SURFACTANTES

A síntese de nanobipirâmides e nanogallhos necessita de surfactantes análogos ao CTAB e ao brometo de tetradecilmetilamônio (TTAB), mas que não são comerciais como: brometo de cetiltriethylamônio (CTEAB); brometo de cetiltripropilamônio (CTPAB); brometo de cetiltributilamônio (CTBAB); brometo de tetradeciltriethylamônio (TTEAB); brometo de tetradeciltripropilamônio (TTPAB); brometo de tetradeciltributilamônio (TTBAB). Os surfactantes preparados nesse trabalho de tese, cuja preparação é descrita abaixo, foram sintetizados em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Fernanda I. Bombonato, do DQ-UFJF, com o apoio da estudante de doutorado M. Rafaela de Souza Martins.

A síntese consistiu em colocar uma razão molar de 1:2 do bromoalcano:trialquilamina de interesse (foram utilizados o bromotetradecano e o bromohexadecano e as aminas, triethylamina, tripropilamina e tributilamina) em refluxo utilizando como solvente acetonitrila na razão de 1:2,2 (reagentes:solvente) por cerca de 48 h em temperatura de 70°C. A síntese foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, de modo que o fim da reação foi determinado pelo consumo total do bromoalcano. A mistura foi rotaevaporada, seguido da adição de éter etílico ou acetato de etila e a mistura foi deixada a -10 °C para recristalização. Após, o sólido resultante foi filtrado utilizando éter etílico ou acetato de etila gelado para lavagem.

3.4 SÍNTESE DAS AuNPs

Foram sintetizadas nesta tese três diferentes tipos de nanoestruturas (AuNRs, AuNBs e AuNGs), essa seção abordará os métodos de síntese de cada uma dessas nanoestruturas.

3.4.1 Nanobastões de Au (AuNRs)

Uma suspensão de nanopartículas precursoras (*seed*) foi preparada a partir de uma solução de CTAB (5,00 mL, 0,20 mol L⁻¹) e de HAuCl₄ (5,00 mL, 0,0005 mol L⁻¹). Foi então adicionado 0,60 mL de 0,010 mol L⁻¹ NaBH₄ 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 nanobastões consiste na adição de CTAB (5,0 mL, 0,20 mol L⁻¹) à solução de AgNO₃ (0,15 mL, 0,0040 mol L⁻¹). A essa solução foi adicionado HAuCl₄ (5,00 mL, 0,001 mol L⁻¹) e solução de ácido ascórbico (0,070 mL; 0,079 mol L⁻¹). Finalmente, foi adicionado 0,012 mL da solução *seed* na temperatura controlada entre 27-30°C; a coloração da solução mudou de transparente para um tom avermelhado em cerca de 10-20 min (NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003).

3.4.2 Nanobipirâmides de Au (AuNBs)

Suspensão de nanopartículas *seed* foram adicionadas soluções de HAuCl₄ (0,25 mL; 0,01 mol L⁻¹) e citrato de sódio (0,25 mL; 0,01 mol L⁻¹) em água deionizada (9,62 mL), seguido por uma solução recentemente preparada de NaBH₄ (0,01 mol L⁻¹, 0,15 mL), sob agitação vigorosa em banho de gelo. A suspensão *seed* foi mantida em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos.

A solução de crescimento foi preparada pela adição de HAuCl₄ (0,3 mL; 0,01 mol L⁻¹), AgNO₃ (0,45 mL; 0,01 mol L⁻¹) e ácido ascórbico (0,10 mL, 0,1 mol L⁻¹) em uma solução aquosa de CTBAB (7,12 mL; 0,01 mol L⁻¹). A seguir, 0,075 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 CTEAB e CTPAB, que resultam em mudanças na razão de aspecto e na taxa de crescimento das nanobipirâmides. Na utilização dos surfactantes citados acima, a temperatura utilizada foi 27°C e a concentração dos mesmos foi de 0,10 mol L⁻¹ (KOU *et al.*, 2007).

3.4.3 Nanogalhos de Au (AuNGs)

A suspensão de nanopartículas *seed* foi preparada de acordo com o procedimento 3.4.2. A solução de crescimento foi preparada pela adição de HAuCl₄ (0,9 mL; 0,01 mol L⁻¹), AgNO₃ (0,135 mL; 0,01 mol L⁻¹) e ácido ascórbico (0,155 mL, 0,1 mol L⁻¹) em uma solução

aquosa dos surfactantes análogos ao brometo de tetradeciltrimetilamônio, TTAB (21,375 mL; 0,01 mol L⁻¹). A seguir, 0,020 mL da solução *seed* foi adicionada e a mistura foi deixada em repouso *overnight* à temperatura de 27°C em banho termostático (CHEN *et al.*, 2008).

3.5 CONSTRUÇÃO DE FILMES DE AuNPs IMOBILIZADAS SOBRE LÂMINAS DE VIDRO – AuNPs-chip

Um dos substratos utilizados para o sensoriamento foram os filmes de AuNPs imobilizadas sobre lâminas de vidro, construídos a partir de adaptações ao procedimento de Fan e Brolo (FAN e BROLO, 2009). Nesse procedimento, foram utilizados apenas os AuNRs (AuNRs-chip). Inicialmente, lâminas de vidro foram limpas com imersões em diferentes solventes como acetona, álcool etílico e água deionizada em banho ultrassônico e posterior imersão em solução piranha (75% H₂SO₄ e 25% H₂O₂) e enxaguadas com água deionizada. Em seguida, as lâminas foram imersas em uma solução etanólica de MPTMS 10 mmol L⁻¹ por 24 h, sendo as duas primeiras horas aquecidas a 60°C e depois deixadas a temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas com etanol para remover o excesso de MPTMS não adsorvido e depois com água deionizada; sendo na sequência deixadas em aquecimento (T = 120 °C) por 2 h, chamado tempo de cura. Depois foram imersas em uma suspensão de AuNRs por 24 h, estes foram centrifugados 3 vezes a 10,244 rcf por 30 min para remoção do excesso de CTAB. Tal procedimento consiste no primeiro ciclo de adsorção dos AuNRs.

O sinal LSPR de um único ciclo de adsorção de AuNRs muitas vezes não é intenso o suficiente para permitir o uso para detecção de analitos por essa técnica. Para deposição de um número maior de AuNRs, com o objetivo de aumentar o sinal LSPR, utilizou-se MPTMS para ligar AuNRs já depositados com mais AuNRs adicionados em suspensão. Para isso, uma solução de 300 µL de MPTMS e 250 µL de HCl 0,1 mol L⁻¹ em 25 mL de água deionizada foi deixada em agitação por, no mínimo, 1 h. O substrato já contendo um ciclo de adsorção de AuNRs foi imerso nessa solução por cerca de 20 min, lavado com água deionizada e imerso novamente na solução de AuNRs por 1 h, seguido por lavagem; essa série de procedimentos foi considerado como adição de um ciclo de adsorção de AuNRs. Esse procedimento foi realizado sucessivas vezes até se obter o filme desejado, sendo monitorado através da aquisição de espectros UV-VIS, através do aumento da intensidade da banda LSPR, relacionado com o aumento do número de ciclos de adsorção.

3.6 ESTUDO DA SENSIBILIDADE LSPR

A sensibilidade dos AuNRs imobilizados em lâminas de vidro e em suspensão coloidal foi estudada. No primeiro modo de utilização, a sensibilidade foi estudada utilizando os substratos imersos em soluções de glicose com diferentes concentrações (variação de 6% m/v até 30% m/v) (SILVA *et al.*, 2014) e consequentemente índices de refração diferentes, variando de 1,3390 até 1,3365, medido utilizando um refratômetro de Abbè. Para os AuNRs em suspensão, os mesmos foram redispersos, após 3 centrifugações de 10,244 rcf e 30 min para retirada do excesso de CTAB, em soluções aquosas de diferentes concentrações de glicerol (0% v/v até 50% v/v) e consequentemente índices de refração diferentes, variando de 1,3331 para água até 1,4071 para 50% m/m de glicerol, valores de concentração otimizados para que não houvesse agragação dos AuNRs (CHEN *et al.*, 2008), também medidos utilizando um refratômetro de Abbè.

3.7 DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR LSPR

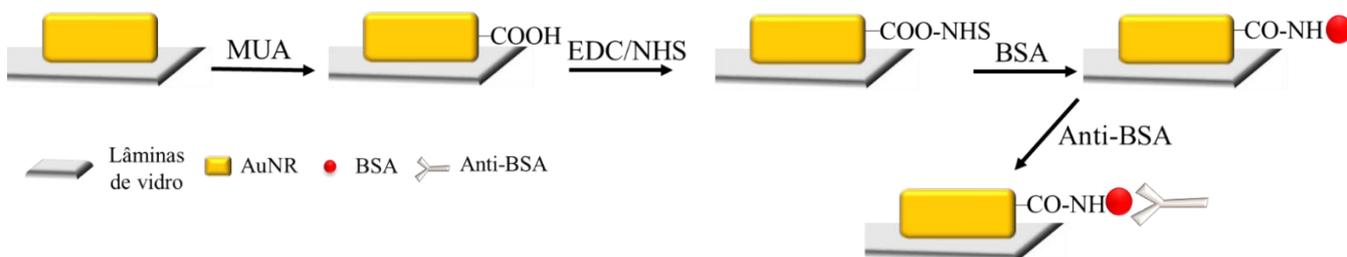
A detecção de biomoléculas por LSPR foi realizada utilizando a interação de antígeno-anticorpo, tanto para os filmes de AuNRs sobre lâminas de vidro (AuNRs-chip) como para os AuNRs em suspensão (S-AuNRs). Primeiramente, os AuNRs têm sua superfície modificada com a biomolécula, albumina de soro bovino (BSA), que será responsável pela interação específica com seu anticorpo, anti-BSA.

3.7.1 AuNRs-chip

A Figura 16 mostra um esquema para a detecção de anti-BSA por LSPR para os AuNRs-chip. Como pode ser visto na Figura 16, a modificação da superfície dos AuNRs é realizada em 4 passos (MONTEIRO *et al.*, 2012). O substrato foi imerso em uma solução etanólica 1,0 mmol L⁻¹ de MUA (ácido mercaptoundecanóico) por 72 h. Depois foi lavado com etanol e água e incubado em uma solução 1:1 de 0,1 mol L⁻¹ de NHS (N-hidroxissuccinimida) e 0,1 mol L⁻¹ de EDC (N-etil N²-(3 dietilaminopropil) carbodiimida) por 3 h e lavado com tampão salino de fosfato (PBS). Em seguida, o substrato foi imerso em uma solução de BSA 0,1 mmol L⁻¹ em PBS por 6 h e lavado com PBS. Para a detecção de anti-BSA, o substrato foi imerso em uma solução de anti-BSA 1,0 mg mL⁻¹ em PBS por cerca de

12 h. Os espectros UV-VIS foram obtidos em cada passo da modificação das lâminas de vidro com AuNRs.

Figura 16: Esquema de funcionalização do AuNRs-chip para a detecção de anti-BSA por LSPR



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

3.7.2 S-AuNRs

Nanopartículas em suspensão em geral são sujeitas à agregação, o que pode interferir na observação do comportamento espectral após as modificações superficiais, além da possível agregação com precipitação do coloide, que ocasiona a perda de material. Sendo assim, os procedimentos são diferentes em relação à concentração dos reagentes e no tempo necessário para cada modificação em comparação com o trabalho realizado para os AuNRs-chip. A Figura 17 mostra o esquema para a detecção LSPR de anti-BSA utilizando o sistema S-AuNRs.

AuNRs (5,0 mL) já centrifugados e redispersos em água deionizada foram levados a agitação vigorosa, seguida pela adição de 2,0 mL de MUA $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ solubilizado em solução de NaOH, mantendo a agitação por 24 h. Após essa etapa, a suspensão foi novamente centrifugada (9,641 rcf durante 20 min) para a retirada do excesso de MUA e os AuNRs foram redispersos em duas alíquotas de 1,0 mL de PBS. Posteriormente, a 1,0 mL dessa solução de AuNRs modificadas com MUA foram adicionados 20 μL de uma solução recém-preparada de EDC ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) /NHS ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), que ficou sob agitação em vórtex por 25 min; a seguir, 50 μL de uma solução de BSA $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em PBS foi adicionada à solução resultante. A suspensão modificada com BSA foi centrifugada para retirada do excesso de BSA, redispersada em 1,0 mL de PBS e a essa suspensão foram adicionados 50 μL de uma solução de anti-BSA $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ para análise. Um experimento branco também foi feito com a adição de água deionizada no lugar da solução de anti-BSA. Espectros UV VIS foram obtidos após cada passo da modificação superficial.

Figura 17: Esquema de funcionalização do S-AuNRs para a detecção de anti-BSA por LSPR



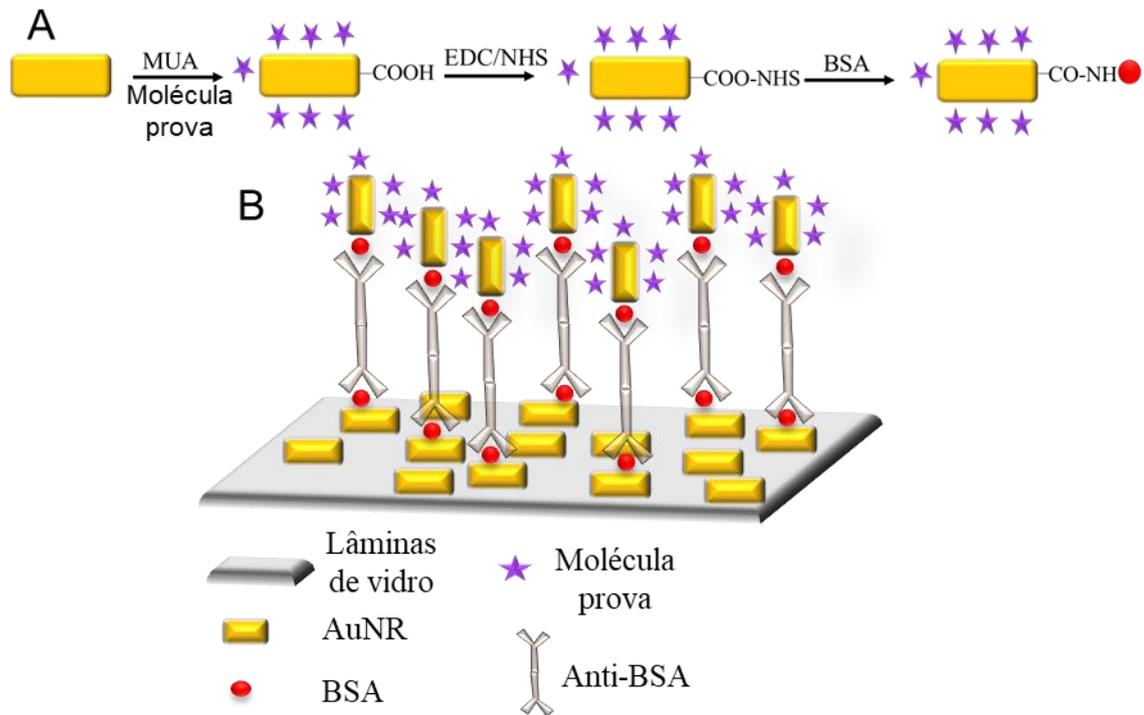
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

3.8 DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR SERS E SEF

A detecção de biomoléculas utilizando SERS e SEF foi realizada utilizando o método de imunensaio sanduíche adaptado de Qian e colaboradores (QIAN *et al.*, 2008), mostrado no esquema da Figura 18B. São utilizados então dois substratos: S-AuNRs e AuNRs-chip.

O procedimento para AuNRs-chip foi o mesmo que o utilizado para a detecção de anti-BSA por LSPR no item 3.7.1. O procedimento para a modificação da suspensão S-AuNPs também foi o mesmo utilizado em 3.7.2, porém com a adição da molécula prova, que foram os corantes IR-820 ou azul do Nilo na concentração $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 18A). A adição dos corantes foi feita 5 min antes da adição de MUA, e o sistema resultante foi deixado reagir também por 24 h sob agitação após a adição de MUA, sendo sequencialmente modificado até a imobilização de BSA. Sendo assim, a lâmina de vidro modificada com AuNRs na presença de anti-BSA foi imersa na suspensão de AuNRs com a molécula prova por 3 h e então lavada com água deionizada. Também foi feito um experimento branco no qual o substrato com AuNRs imobilizados não teve a adição de anti-BSA. Os espectros SERS/SEF destes substratos foram então obtidos. Para verificar a imobilização da molécula prova nos AuNRs, espectros SERS/SEF foram obtidos da suspensão de AuNRs funcionalizados com a molécula prova e BSA. Para o SERS foi feito um mapeamento de 400 pontos (20×20) na superfície dos AuNRs chip, com excitação em 785 nm, 50 mW de potência e 4 s de acumulação para cada ponto. A medida SEF também foi realizada através de um mapeamento Raman de 400 pontos (20×20) com excitação em 785 nm com 10 mW de potência e 4 s de tempo de exposição em cada ponto.

Figura 18: Esquema de detecção utilizando SERS e SEF



(A) Suspensão S-AuNRs marcada com a molécula prova (B) Esquema do imunoenensaio sanduíche utilizado

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

3.9 ATIVIDADE SERS DE AuNBs E AuNGs

A solução de azul do Nilo utilizada como branco foi preparada em água deionizada a partir do sólido e depois diluída para $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros do azul do Nilo na presença das AuNPs, foram obtidos a partir de uma suspensão preparada pela diluição da solução de azul do Nilo com as AuNPs (após 3 ciclos de centrifugação, a 8500 10,244 rcf por 30 min, e redispersão em água deionizada). Os espectros SERS foram obtidos na radiação de 785 nm com 90 s de tempo de exposição e 50 mW de potência.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente serão mostrados os resultados de caracterização dos surfactantes, AuNPs e da construção dos substratos. Posteriormente serão mostrados os resultados de aplicação em biossensores e substratos SERS.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SURFACTANTES

No intuito de obter morfologias diferentes de AuNRs, foram sintetizados nessa tese 3 compostos análogos ao CTAB e 3 compostos análogos ao TTAB (esse utilizado como direcionador na síntese de AuNGs), como mostrado na Tabela 1. Estes compostos foram purificados e posteriormente caracterizados por RMN.

Tabela 1: Compostos sintetizados na tese, derivados dos compostos comerciais CTAB e TTAB

Bromoalcano	Triaquilamina	Surfactante
Bromohexadecano	Trietilamina	Brometo de cetiltriethylamônio (CTEAB)
Bromohexadecano	Tripropilamina	Brometo de cetiltripropilamônio (CTPAB)
Bromohexadecano	Tributilamina	Brometo de cetiltributilamônio (CTBAB)
Bromotetradecano	Trietilamina	Brometo de tetradeciltriethylamônio (TTEAB)
Bromotetradecano	Tripropilamina	Brometo de tetradeciltripropilamônio (TTPAB)
Bromotetradecano	Tributilamina	Brometo de tetradeciltributilamônio (TTBAB)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A formação do produto durante a síntese foi acompanhada a partir de cromatografia em camada delgada, retirando alíquotas periodicamente e utilizando os precursores para padrão. Utilizou-se cada bromoalcano como reagente limitante e, portanto, o

fim da reação era diagnosticado por todo seu consumo. O produto foi purificado através de recristalização utilizando éter etílico ou acetato de etila e então esse produto purificado foi analisado por RMN, utilizando CDCl_3 como solvente. Nessas reações era esperado que houvesse a formação de um sal de amônio quaternário, onde o bromoalcano se ligaria ao nitrogênio da amina terciária liberando o brometo, que atua como contra íon no produto final.

A elucidação das estruturas sintetizadas foi realizada através de RMN de ^1H e ^{13}C . Como os espectros dos produtos obtidos são similares, esperado pela semelhança estrutural, serão discutidos em detalhe apenas os espectros para um composto de cada bromoalcano utilizado, com a apresentação dos dados para os outros compostos. É importante notar que a mudança do bromoalcano utilizado acarreta a mudança da forma da nanopartícula a ser sintetizada, a mudança da triaquilamina também influencia no rendimento da reação de síntese da nanopartícula, de modo que a determinação estrutural é relevante para o presente trabalho. Surfactantes obtidos a partir do precursor bromohexadecano foram utilizados nesse trabalho na síntese de AuNBs e surfactantes a partir do bromotetradecano na síntese de AuNGs. Os espectros de RMN de ^1H dos compostos não discutidos no texto são mostrados no apêndice B.

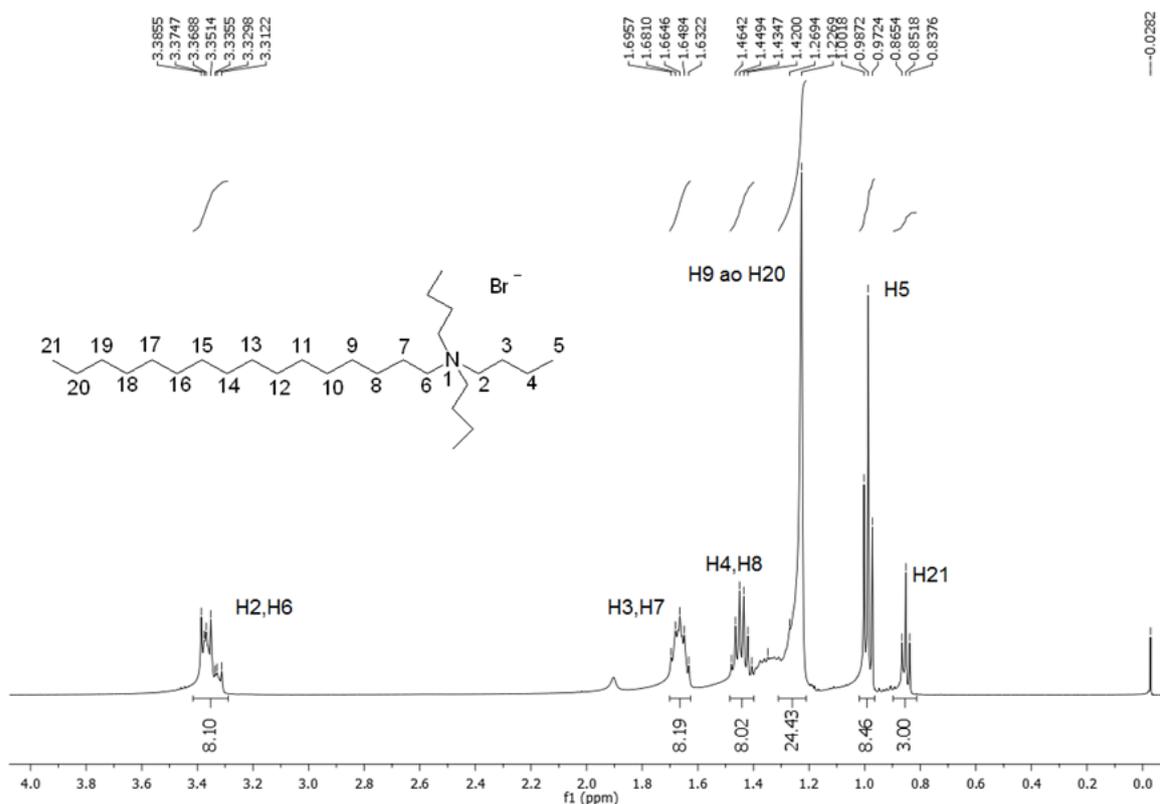
4.1.1 Caracterização do CTBAB

Na Figura 19 é mostrado o espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500MHz) do CTBAB (fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{60}\text{BrN}$). A indicação dos deslocamentos químicos medidos junto com a atribuição dos diferentes átomos de hidrogênio na molécula do CTBAB, mostrada como inserto, são vistos na Figura 19. Os hidrogênios H2 e H6, que possuem o maior deslocamento químico, apresentam um multipeto com faixa de 3,38-3,31 ppm (8H); como são hidrogênios dos carbonos ligados ao nitrogênio (átomo mais eletronegativo da molécula) são mais desblindados. Há de se ressaltar que os sinais atribuídos a esses hidrogênios da amina são observados em região muito similar à que se espera para os hidrogênios de mesma posição no bromohexadecano. Já os picos centrados ao redor de 1,66 ppm (8H), podem ser atribuídos aos H3 e H7, hidrogênios que são mais blindados, porém ainda sofrem grande efeito do nitrogênio presente na molécula.

A utilização de um equipamento com 500 MHz é bastante importante na caracterização dessas estruturas com muitos carbonos alifáticos. Por exemplo, foi possível obter picos distintos atribuídos aos hidrogênios H4 e H8, sexteto em 1,42 ppm (8H) e outro pico para os H9 ao H20 que são hidrogênios do meio da estrutura proposta, multipeto com

faixa 1,30-1,22 (24H). Por último, temos os sinais atribuídos a H5 e H21, triplete em 0,98 ppm (9H) e triplete 0,85 (3H) ppm respectivamente. Os dados de RMN de ^{13}C também corroboram os resultados de ^1H para a obtenção da molécula proposta.

Figura 19: Espectro de RMN de ^1H do CTBAB em CDCl_3 .



Inserto: Estrutura do CTBAB

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

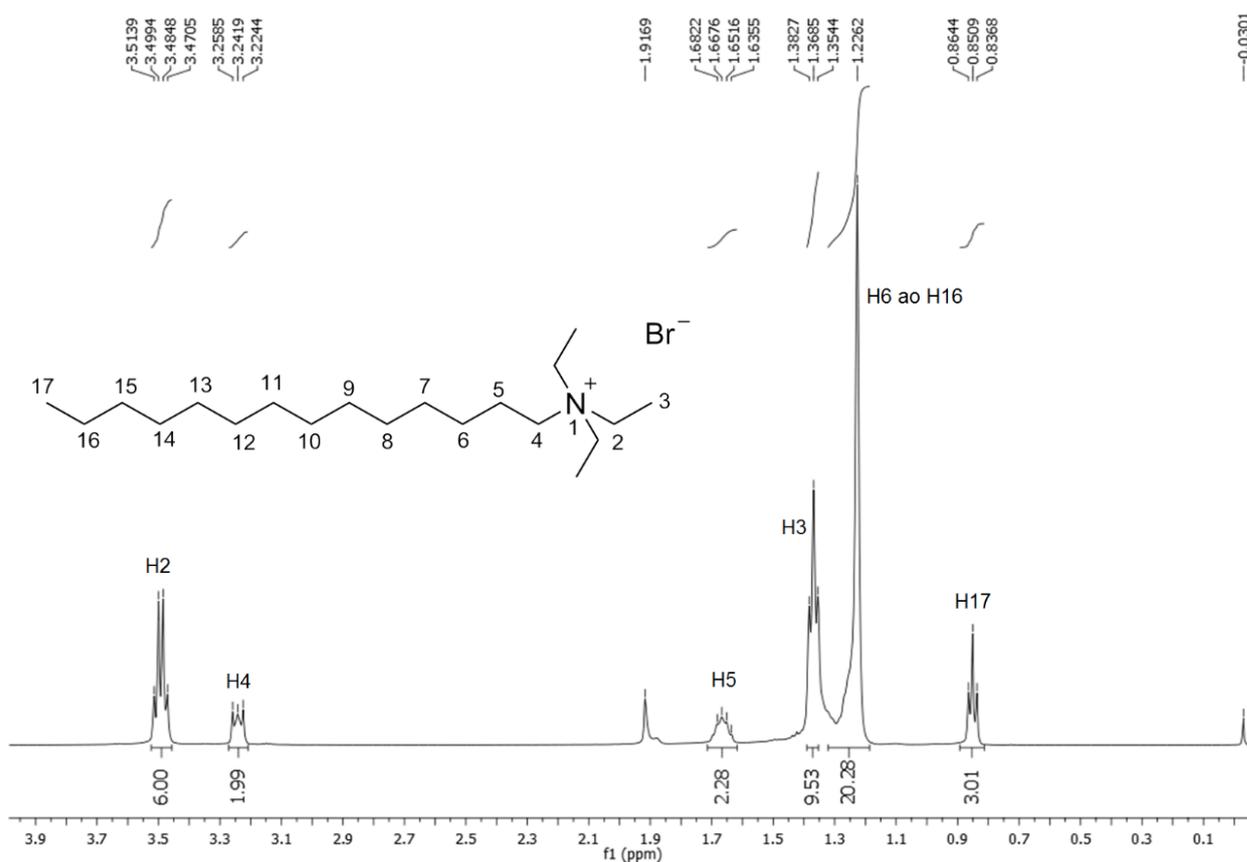
4.1.2 Caracterização do TTEAB

Utilizando o bromotetradecano como bromoalcano precursor de sal de amônio quaternário, é mostrado o espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500MHz) do TTEAB (fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{44}\text{BrN}$) na Figura 20. Os deslocamentos químicos e as indicações dos diferentes átomos de hidrogênio na molécula do TTEAB, mostrada como inserto, são apresentados na Figura 20. A análise dos espectros mostra que os hidrogênios mais desblindados são os hidrogênios ligados ao carbono mais próximo do nitrogênio, como observado para o CTBAB, porém para o TTEAB os sinais dos hidrogênios oriundos da amina terciária estão bem separados dos hidrogênios oriundos do bromoalcano. H2 são os

hidrogênios da amina mais próximos ao nitrogênio, e apresentam um quarteto em 3,49 ppm (6H), os hidrogênios do bromoalcano H4, apresentam um triplete centrado em 3,24 ppm (2H).

Os H5 apresentam um quinteto centrado em 1,67 ppm (2H), apresentando-se mais desblindados que outros sinais devido à proximidade ao nitrogênio. Os hidrogênios H6 a H16 são os hidrogênios ligados aos átomos de C da grande cadeia alifática, são menos desblindados pela distância do nitrogênio e seu sinal é um multipletto com faixa de 1,30-1,19 ppm (20H). Os hidrogênios da metila para esse composto apresentam sinais pouco diferentes do que mostrado para o CTBAB, pois nesse caso os H3, triplete centrado em 1,36 ppm (9H), estão muito mais próximos do nitrogênio do que os H17, triplete centrado em 0,85 ppm (3H). Os dados de ^{13}C também confirmam esses resultados e indicam a formação do composto proposto.

Figura 20: Espectro de RMN de ^1H do TTEAB em CDCl_3 .



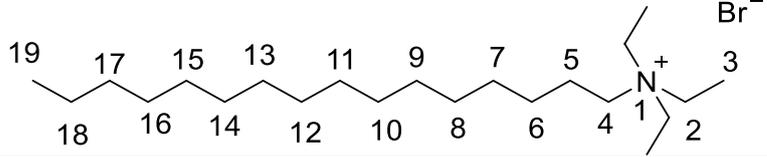
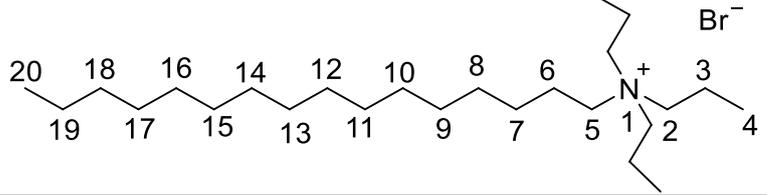
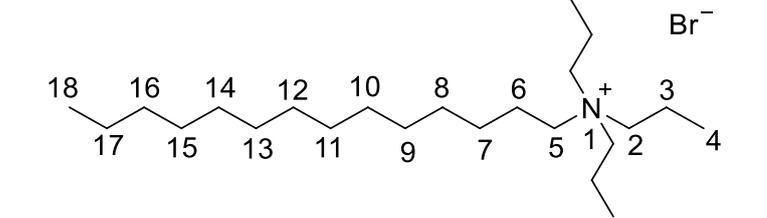
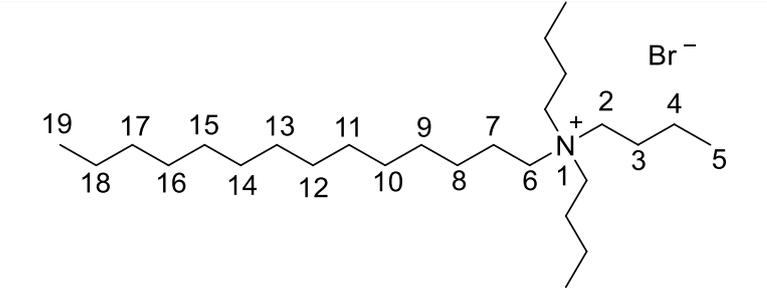
Inserto: Estrutura do TTEAB

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.1.3 Outros surfactantes

A Tabela 2 mostra a caracterização por RMN para os demais surfactantes sintetizados nesse trabalho. São apresentados os deslocamentos químicos obtidos por ^1H RMN, a numeração adotada para os átomos de H para cada composto, junto da atribuição dos hidrogênios indicados. Nota-se que os resultados de RMN para todos os compostos obtidos indicam a formação dos sais de amônio quaternário.

Tabela 2: Estruturas dos surfactantes CTEAB, CTPAB, TTPAB e TTBAB com a atribuição do espectro de RMN de ^1H para os hidrogênios marcados.

<p>CTEAB Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{BrN}$</p>	
<p>RMN de ^1H (CDCl_3; 500 MHz) δ (ppm): 3,50 (6H, q, H2); 3,26-2,23 (2H, m, H4); 1,68 (2H,q,H5); 1,38 (9H, t, H3); 1,35-1,23 (26H,m, H6 a H18); 0,86 (3H,t,H19)</p>	
<p>CTPAB Fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{54}\text{BrN}$</p>	
<p>RMN de ^1H (CDCl_3; 500 MHz) δ (ppm): 3,38-3,33 (8H,m, H2 e H5); 1,77 (6H,s,H3); 1,67 (2H,q,H6); 1,32-1,24 (26H,m,H7 ao H19); 1,05(9H,t,H4); 0,86(3H,t,H20)</p>	
<p>TTPAB Fórmula molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{50}\text{BrN}$</p>	
<p>RMN de ^1H (CDCl_3; 500 MHz) δ (ppm): 3,37-3,32 (8H, m,H2 e H5); 1,75 (6H,s,H3); 1,65 (2H,q,H6); 1,38-1,22 (22H,m,H7 ao H17); 1,03 (9H,t,H4); 0,85 (3H,t,H18)</p>	
<p>TTBAB Fórmula molecular: $\text{C}_{26}\text{H}_{56}\text{BrN}$</p>	
<p>RMN de ^1H (CDCl_3; 500 MHz) δ (ppm): 3,42-3,32 (8H, m,H2 e H6); 1,67 (8H,q,H3 e H7); 1,46 (6H,s,H4); 1,39-1,21 (22H,m,H8 ao H18); 1,00 (9H,t,H5); 0,86 (3H,t,H19)</p>	

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

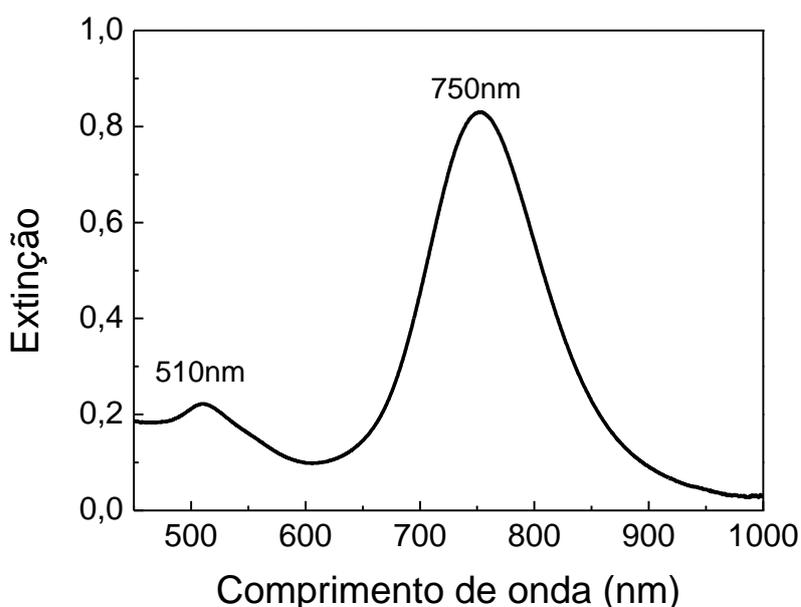
4.2. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DAS AuNPs

A espectroscopia no UV-VIS é uma técnica amplamente utilizada na caracterização de nanopartículas. Para AuNPs essa técnica é especialmente importante, pois essas possuem LSPR na região do visível e infravermelho próximo e, portanto, a caracterização das AuNPs sintetizadas nesse trabalho foi realizada primeiramente por UV-VIS. As amostras de AuNPs com melhores resultados nessa caracterização inicial por essa técnica foram posteriormente caracterizadas por SEM e TEM.

4.2.1 Nanobastões de Au (AuNRs)

As nanoestruturas mais utilizadas nesse trabalho foram os AuNRs, pela facilidade de síntese. Um espectro UV-VIS típico para os AuNRs sintetizados de acordo com a metodologia descrita em 3.4.1 nesse trabalho é mostrado Figura 21. Tal metodologia utiliza AgNO_3 como controlador da razão de aspecto do AuNR (NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003). A quantidade adicionada da solução de AgNO_3 para todas as sínteses de AuNRs utilizados nesse trabalho foi sempre de 150 μL .

Figura 21: Espectro de extinção característico para AuNRs.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

É possível observar no espectro de extinção da Figura 21 duas bandas de extinção, uma em menor comprimento de onda (510 nm) e outra em maior comprimento de onda (750 nm). Essas são bandas LSPR características para AuNRs sintetizados através dessa metodologia (NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003). A banda em 510 nm é atribuída ao LSPR-T enquanto a banda em 750 nm é atribuída ao LSPR-L dos bastões, de modo que a presença dessas duas bandas indica a formação dos AuNRs.

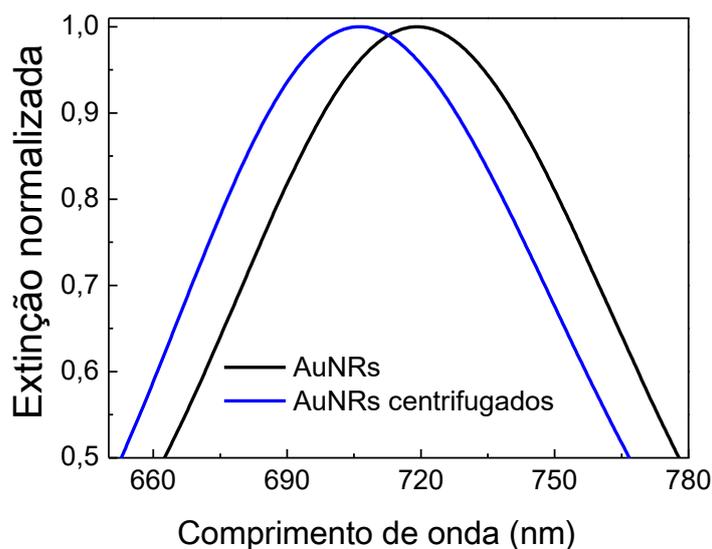
A intensidade da banda LSPR no espectro UV-VIS está relacionada à quantidade de nanopartículas sintetizadas, ou seja, está relacionada ao rendimento da síntese já que, quanto maior o número de nanopartículas com a mesma geometria (mesma frequência de ressonância LSP), maior será a intensidade dessa banda. Para a síntese de AuNRs é interessante citar a razão de intensidades entre as bandas do LSPR longitudinal sobre o transversal, porque quanto maior essa relação de intensidade, maior a tendência para um melhor rendimento das estruturas em forma de bastão. Na Figura 21, a banda em 750 nm é *ca.* 7 vezes mais intensa do que a banda em 510 nm, o que nos indica a formação de mais estruturas na forma de bastão frente a outras possíveis estruturas, como esferas.

Nota-se que a banda em 750 nm possui uma largura total à meia altura (FWHM) satisfatória, cerca de 110 nm, se comparado a outras preparações de AuNPs esféricas, cerca de 60 nm preparadas pelo método de Frens (FRENS, 1973). Para o sensoriamento esse foi um fato bastante importante, já que no sensoriamento LSPR, são observados os deslocamentos do máximo da banda LSPR com as modificações na superfície da nanoestrutura metálica e, sendo assim, quanto mais estreita a banda LSPR, melhor será a observação desses deslocamentos. Além disso, como discutido na introdução, as bandas em maiores comprimentos de onda são mais sensíveis às modificações do índice de refração do meio.

É interessante ressaltar a utilização do CTAB, que atua como direcionador de crescimento dos bastões, além de agente estabilizante, porém, como é utilizado em excesso, alguns cuidados devem ser tomados para a utilização dos AuNRs na produção de sensores. O excesso de CTAB causa um deslocamento para maior comprimento de onda da banda LSPR, porque a presença do CTAB na suspensão de AuNRs causa um aumento do índice de refração na vizinhança dos AuNRs em comparação com uma suspensão aquosa dos mesmos, livres desse excesso do surfactante. Além disso, a quantidade de CTAB utilizada na preparação dos AuNRs possui cerca de 1×10^3 vezes mais material do que outros reagentes utilizados, dificultando o acesso de eventuais analitos à superfície dos AuNRs. Sendo assim, houve a necessidade de remover este excesso para que fosse possível modificar a superfície dos

bastões. Na Figura 22 é mostrada a influência do excesso de CTAB no espectro de extinção dos AuNRs, precisamente na banda LSPR-L.

Figura 22: Espectros de extinção dos AuNRs após a síntese e após a retirada do excesso de CTAB (Três ciclos de centrifugação 10,244 rcf por 30 min e redispersão em água deionizada).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Foram feitos três ciclos de centrifugação/redispersão em água deionizada de suspensão de AuNRs, esse procedimento já havia sido utilizado pelo grupo em outros trabalhos com o CTAB e verificou-se que esse procedimento é suficiente para que analitos de interesse tenham acesso à superfície dos AuNRs. Nos espectros UV-VIS da Figura 22 é possível observar que após essas três etapas a banda LSPR-L tem um deslocamento para menor comprimento de onda, passando de 719 para 706 nm, confirmando que o excesso de CTAB causa um deslocamento do máximo da banda LSPR para maiores comprimentos de onda. Portanto, antes de utilizar os bastões para qualquer experimento dessa tese, eles foram centrifugados e redispersos em água deionizada.

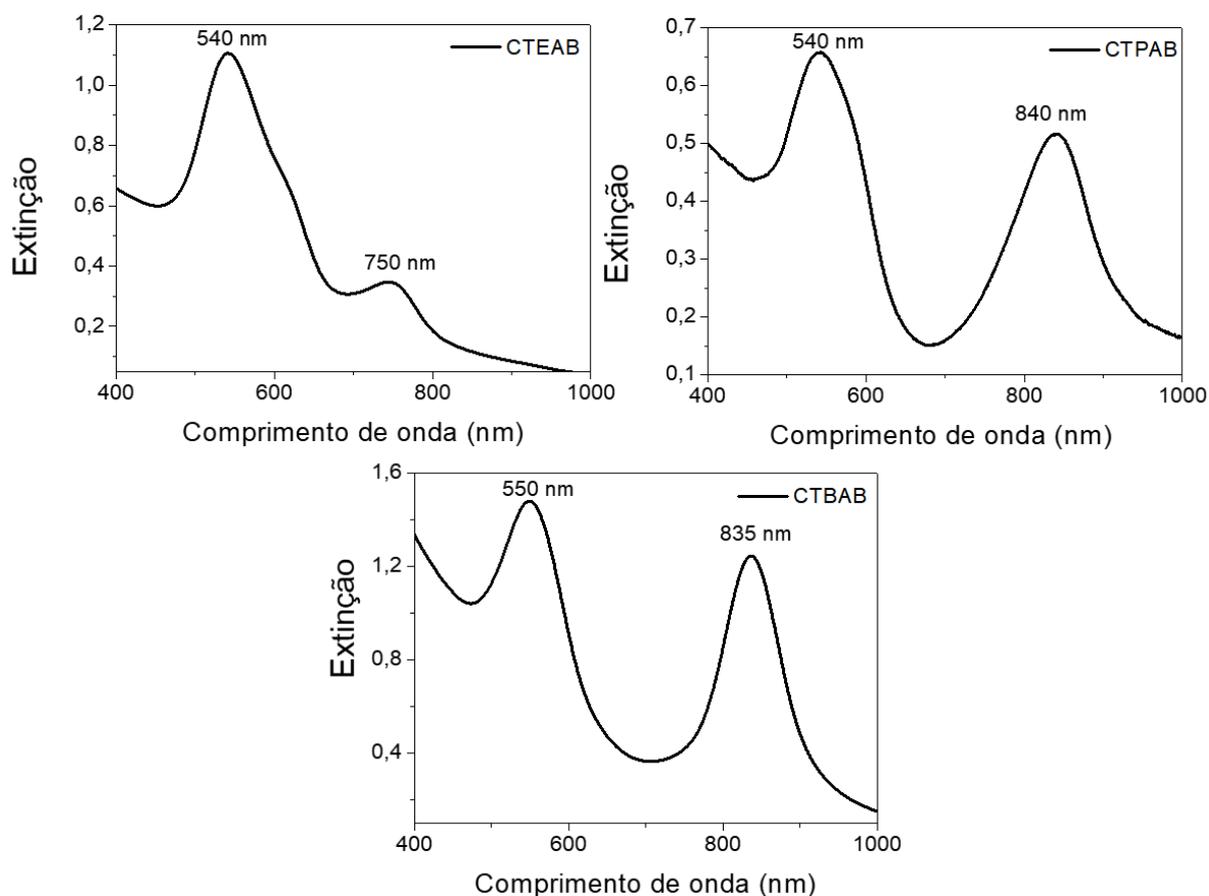
4.2.2 Nanobipirâmides de Au (AuNBs)

O segundo tipo de nanoestrutura sintetizado nessa tese foram as nanobipirâmides de Au (AuNB). As AuNBs foram sintetizadas utilizando três surfactantes análogos ao CTAB, conforme descrito no procedimento 3.4.2. Os resultados de espectroscopia no UV-VIS

mostram resultados satisfatórios, mas a síntese dessas nanoestruturas ainda precisa ser completamente otimizada para maior rendimento de bipirâmides a fim de obter resultados mais similares ao apresentado na literatura (KOU *et al.*, 2007). Na Figura 23 são mostrados os espectros LSPR para as AuNBs sintetizadas com cada surfactante análogo ao CTAB.

Observa-se na Figura 23 que assim como os AuNRs, as AuNBs apresentam duas bandas características no espectro de extinção (KOU *et al.*, 2007). Uma banda em menor comprimento de onda que varia entre 530 – 550 nm referente ao LSPR transversal dessas nanoestruturas e outra banda em maior comprimento de onda que nas AuNBs sintetizadas variou de 690 - 910 nm. A presença dessas duas bandas indica a possível formação de nanoestruturas anisotrópicas como as AuNBs, assim como reportado na literatura (KOU *et al.*, 2007). Há também a presença de um pequeno ombro em cerca de 600 nm na síntese com CTEAB, que pode indicar a formação de bastões junto das bipirâmides.

Figura 23: Espectros de extinção para as AuNBs sintetizadas para cada surfactante utilizado



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

É interessante ressaltar que os espectros da Figura 23 possuem bandas LSPR bem intensas, indicando a possibilidade de diferentes formas de nanoestruturas de Au. Porém, a banda em maior comprimento de onda, que indica a possível formação de AuNBs, não aparece com intensidade tão grande quanto a banda LSPR-L dos AuNRs. Porém, nota-se que as nanoestruturas obtidas utilizando CTBAB e CTPAB apresentaram um aumento de intensidade da banda em maior comprimento de onda em relação ao que foi obtido com CTEAB. Na literatura, já é esperado que através desse método de preparação, os surfactantes com cadeias alifáticas maiores ligadas ao N do sal de amônio quaternário possuem maior rendimento para a síntese de AuNBs (KOU *et al.*, 2007). Sabe-se que os surfactantes formam uma bicamada sobre as nanoestruturas de bastões e nanobipirâmides e que, quanto maior o tamanho da cadeia alifática da amina precursora, menor é a repulsão eletrostática entre os surfactantes dessa bicamada, fazendo com que aumente o rendimento de nanobipirâmides em relação a outras nanoestruturas.

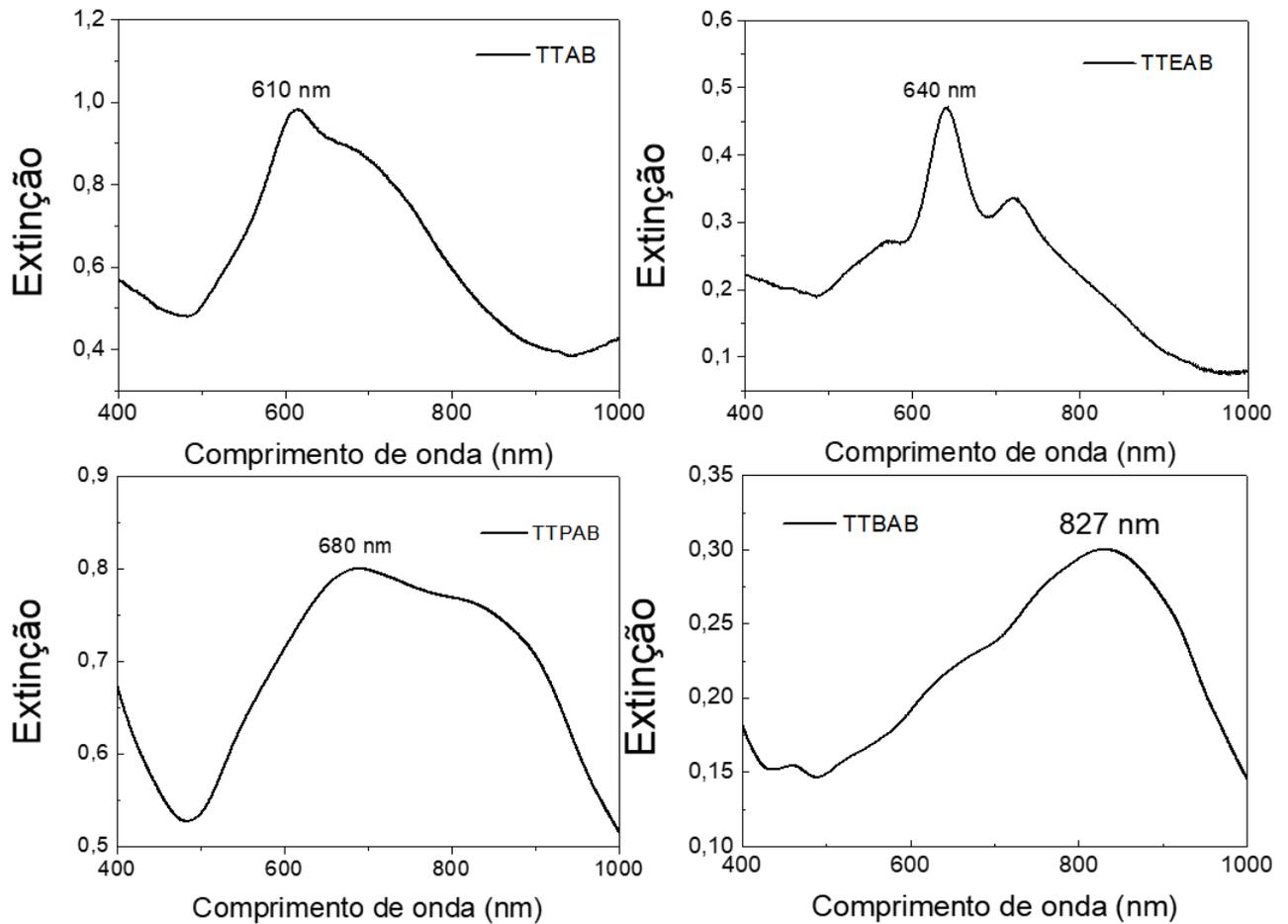
Assim como para os AuNRs, a posição da banda do LSPR-L está ligada ao tamanho dessa dimensão nas AuNBs, ou seja, quanto mais deslocada para o vermelho, maior será o tamanho da região longitudinal e conseqüentemente maior será a razão de aspecto dessas nanoestruturas. Pelos resultados de espectroscopia no UV-VIS pode-se afirmar que há indícios de que a utilização de diferentes surfactantes possa gerar bipirâmides com diferentes tamanhos e razões de aspecto.

Ainda é possível obter melhores rendimentos de AuNBs nas sínteses, porém, mostraram resultados bem interessantes, demonstrando que os surfactantes análogos ao CTAB podem ser utilizados no direcionamento do crescimento das nanoestruturas e também atuam como agentes estabilizantes.

4.2.3 Nanogalhos de Au (AuNGs)

Os AuNGs foram sintetizados a partir de 4 surfactantes diferentes, primeiramente do surfactante comercial, TTAB, e de seus três análogos TTEAB, TTPAB e TTBAB. A Figura 24 mostra os espectros de extinção para os AuNGs sintetizados com os diferentes surfactantes.

Figura 24: Espectros de extinção para as AuNGs sintetizadas para cada surfactante utilizado



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Os nanogalhos assim como nanobipirâmides e nanobastões apresentam duas bandas LSPR características segundo os artigos já reportados na literatura (CHEN *et al.*, 2008), uma em menor comprimento de onda referente ao plasmon do corpo central da nanoestrutura ou LSPR-T e outra em maior comprimento de onda que pode ser atribuída ao plasmon dos galhos ou LSPR-L, apesar dessas estruturas não apresentarem uma dimensão longitudinal definida. Esta banda do LSPR-L está relacionada ao tamanho dos galhos formados. Podemos observar que nos espectros da Figura 24, que os AuNGs sintetizados com TTAB e TTEAB não apresentaram uma banda de plasmon longitudinal intensa e definida, apenas uma banda na região onde é atribuída ao plasmon transversal em cerca de 615 nm e 640 nm respectivamente com ombros em maiores comprimentos de onda. Além de apresentarem outras bandas ou ombros como em 580 nm para a síntese com TTEAB, indicando a possível presença de outras nanoestruturas ou nanoestruturas de tamanhos muito diferentes. No entanto, para as sínteses com TTPAB e TTBAB é possível observar que a

banda do LSPR-L está mais deslocada para maior comprimento de onda, principalmente utilizando o TTBAB, para o qual o espectro de extinção possui perfil similar ao perfil espectral mostrado na literatura (CHEN *et al.*, 2008). Essa banda possui uma grande largura a meia altura, pois os nanogalhos possuem diferentes tamanhos e espessuras. Essas preparações mostram que é possível utilizar os surfactantes sintetizados e que possuem ação similar ao composto comercial.

Estes resultados indicam que pode haver formação de nanogalhos, porém ainda há necessidade de estudos adicionais voltados ao aumento do rendimento das nanoestruturas anisotrópicas.

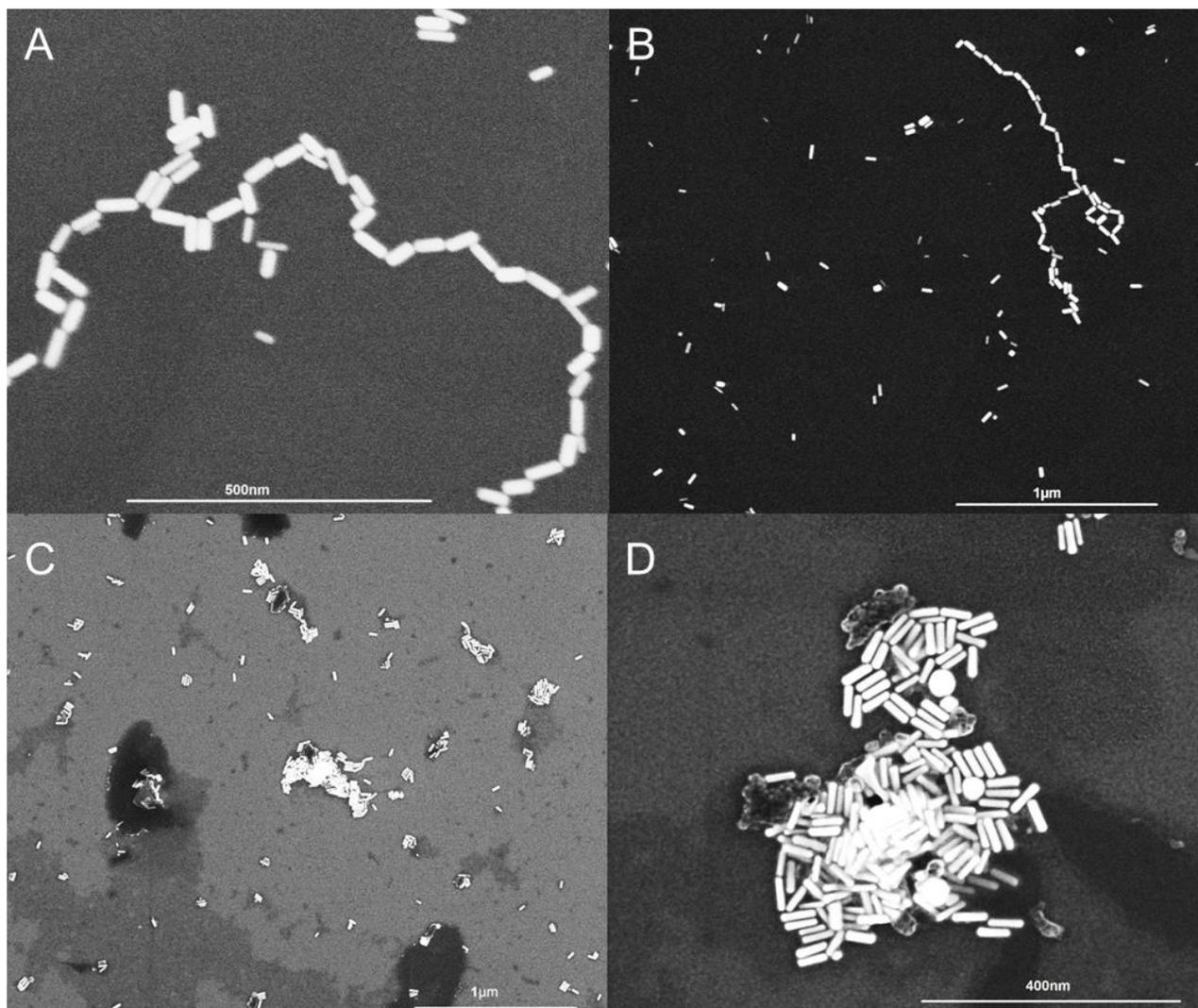
4.3. CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DAS AuNPs.

Enquanto a espectroscopia no UV-VIS dá apenas indícios sobre a morfologia das AuNPs sintetizadas nesse trabalho, por outro lado, a microscopia eletrônica dá informações mais precisas sobre a morfologia e principalmente do tamanho das nanoestruturas. Foram obtidas micrografias eletrônicas para as nanoestruturas sintetizadas.

4.3.1 AuNRs

Micrografias típicas obtidas por SEM para os AuNRs sintetizados nessa tese são mostradas na Figura 25; pela Figura 21 foi observado que os AuNRs apresentaram alta relação entre as bandas longitudinal/transversal, indicando um bom rendimento de AuNRs. As micrografias obtidas confirmam esse bom rendimento e ainda mostram que a síntese possui um alto rendimento de AuNRs frente a outras possíveis nanoestruturas, como esferas e cubos.

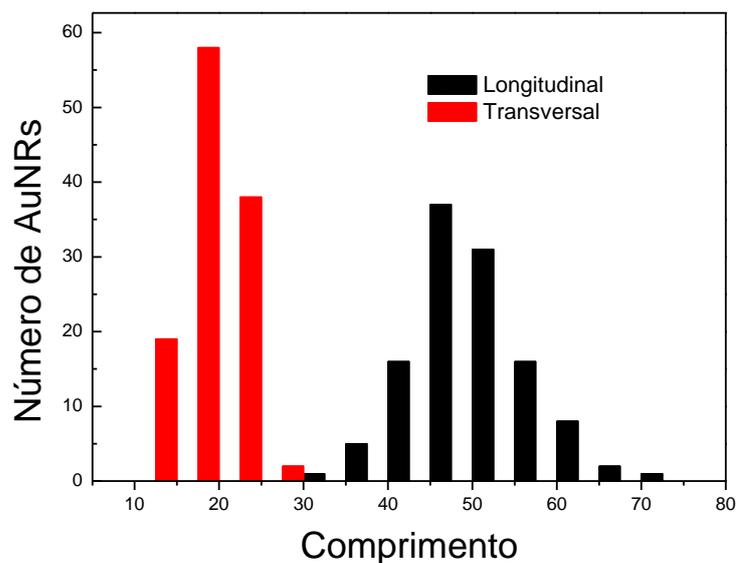
Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura para os AuNRs sintetizados



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A fim de obter a razão de aspecto média dos AuNRs preparados, foi obtida a média dos comprimentos longitudinal e transversal através da contagem de 120 bastões nas micrografias A e B da Figura 25, resultando no histograma apresentado na Figura 26. Podemos observar que há uma distribuição similar a uma distribuição normal tanto para o comprimento transversal como para o comprimento longitudinal, indicando boa homogeneidade no tamanho dos AuNRs. De fato, a partir de um ajuste de gaussiana ao histograma, foi obtido um comprimento longitudinal médio de $50,7 \pm 7,0$ nm e transversal médio de $18,5 \pm 3,2$ nm, gerando uma razão de aspecto de $2,7 \pm 0,5$. Sendo assim, os AuNRs mostrados na Figura 25 apresentam alta homogeneidade no tamanho e na forma. É necessário que os bastões possuam boa homogeneidade em tamanho e forma para a utilização em biossensoriamento.

Figura 26: Histograma da medida dos comprimentos transversal e longitudinal

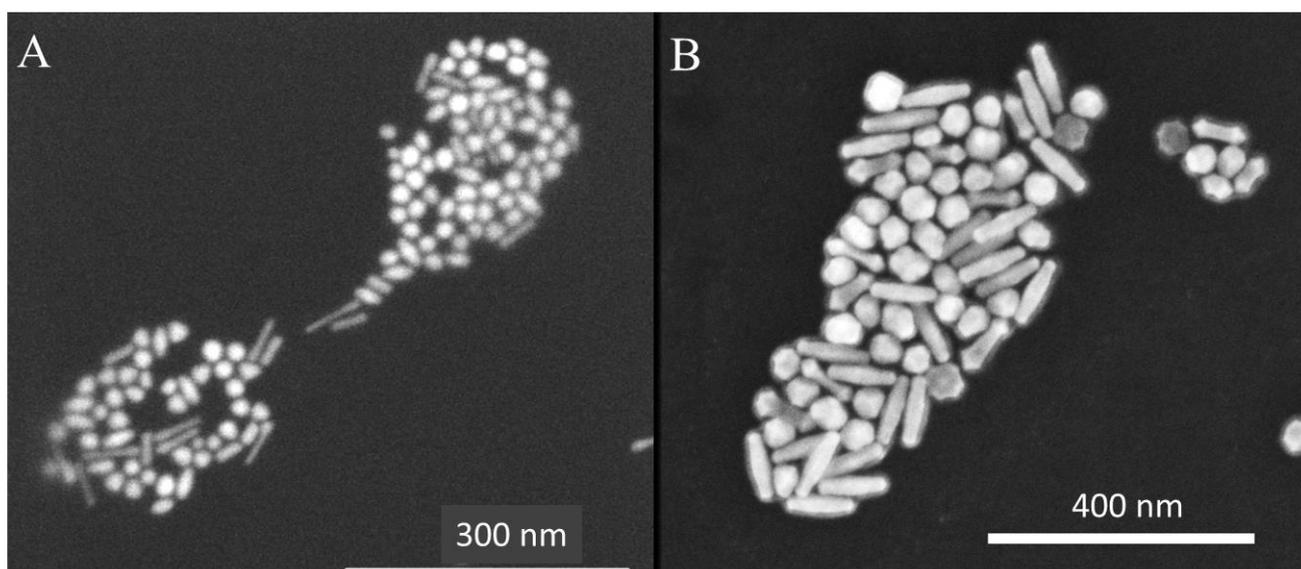


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.3.2 AuNBs

Foram obtidas micrografias de SEM para as AuNBs que apresentaram as maiores relações entre a banda transversal e longitudinal no UV-VIS (nanopartículas sintetizadas utilizando o CTPAB e CTBAB como direcionadores); essas são apresentadas na Figura 27.

Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura para os AuNBs sintetizados



(A) sintetizados com CTPAB (B) sintetizados com CTBAB

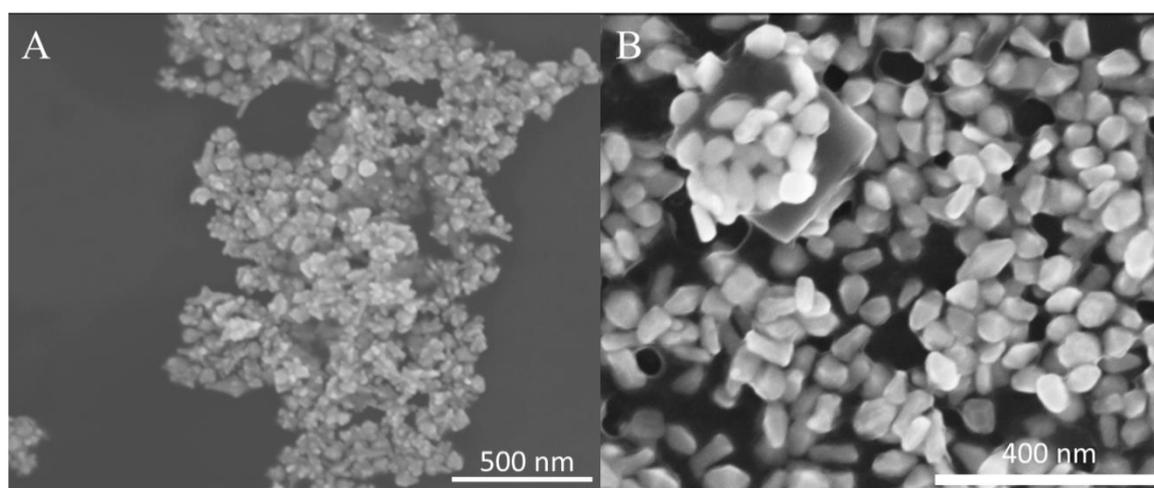
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

É possível observar a presença de diversas nanoestruturas diferentes nas duas micrografias apresentadas na Figura 27, como esferas e nanobastões, e um baixo rendimento de bipirâmides. Esse resultado está de acordo com a espectroscopia no UV-VIS, que não apresentaram bandas LSPR-L, características das AuNBs, intensas, o que indicaria um maior rendimento de estruturas como as bipirâmides. A micrografia da Figura 27B apresenta um número maior de nanobipirâmides, porém as pontas estão mais achatadas do que as da Figura 27A. É, entretanto, um resultado que mostra que as estruturas obtidas se aproximam do esperado pelo reportado na literatura, nos quais essas nanoestruturas apresentam rendimentos entre 50 e 60 % de bipirâmides quando sintetizadas com CTPAB e CTBAB (KOU *et al.*, 2007). As micrografias também comprovam que é possível sintetizar as AuNBs utilizando os surfactantes sintetizados no laboratório como direcionador de tamanho e forma, porém o método ainda pode ser otimizado para obtenção de um maior rendimento de nanobipirâmides, através da variação da concentração dos reagentes, temperatura e tempo de síntese.

4.3.3 AuNGs

A Figura 28 mostra as micrografias de SEM para os AuNGs sintetizados com TTPAB (A) e TTBAB (B).

Figura 28: Microscopia eletrônica de varredura para os AuNGs sintetizados



(A) sintetizados com TTPAB (B) sintetizados com TTBAB

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

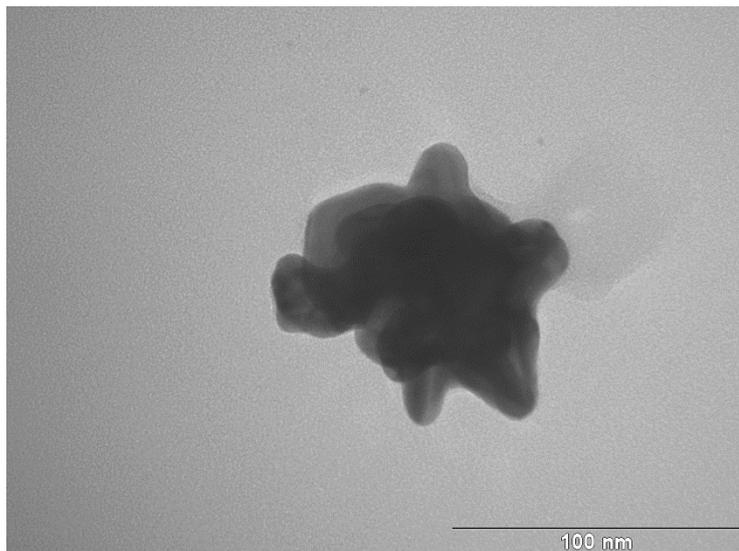
As micrografias da Figura 28A mostram que os AuNGs sintetizados com TTPAB possuem a forma de nanogalhos, porém os galhos, que são subestruturas que se separam do

corpo central na nanopartículas, apresentados são curtos e possuem diversos tamanhos e espessuras (os nanogalhos são estruturas bastante complexas e na literatura nanoestruturas semelhantes também são chamadas de ouriços ou nanoestrelas (AMENDOLA *et al.*, 2017)). A heterogeneidade no tamanho e forma das nanoestruturas observada na micrografia reflete a larga banda LSPR observada na espectroscopia no UV-VIS e é característica para esse tipo de nanoestrutura, principalmente quando há galhos de diferentes tamanhos e espessuras (REGUERA *et al.*, 2017). Para os AuNGs da Figura 28B, apesar do corpo central ser bastante parecido com os outros AuNGs na Figura 28A, os galhos cresceram menos que o esperado, de modo que diferentes nanoestruturas com formas e tamanhos bem diversos foram observadas, em acordo com a banda LSPR bem larga observada no UV-VIS.

As sínteses dos AuNGs precisam de otimização, no intuito de obter maior rendimento de nanogalhos, que pode ser pensada em termos de variações de concentração do surfactante, temperatura de banho, entre outros parâmetros de preparação; por outro lado, o resultado preliminar é extremamente interessante, pois mostrou-se que além do já reportado TTAB, que é um surfactante comercial, podem ser utilizados os análogos TTPAB e TTBAB como direcionadores de forma, resultando na preparação de AuNGs.

No intuito de melhor observar a estrutura e morfologia dos AuNGs, foram obtidas micrografias de TEM dos materiais preparados com TTPAB, que foram os que resultaram em uma banda em maior comprimento de onda mais intensa (Figura 29). É possível observar uma estrutura de galhos ou ouriços, porém, como já observado utilizando SEM na Figura 28A, os galhos possuem diversos tamanhos e espessuras, o que está de acordo com a literatura (CHEN *et al.*, 2008). Obteve-se, portanto, mais uma indicação de que os nanogalhos se formaram, mas ainda que de forma heterogênea e pouco organizada através da metodologia adotada.

Figura 29: Microscopia eletrônica de transmissão para os AuNGs sintetizados com TTPAB



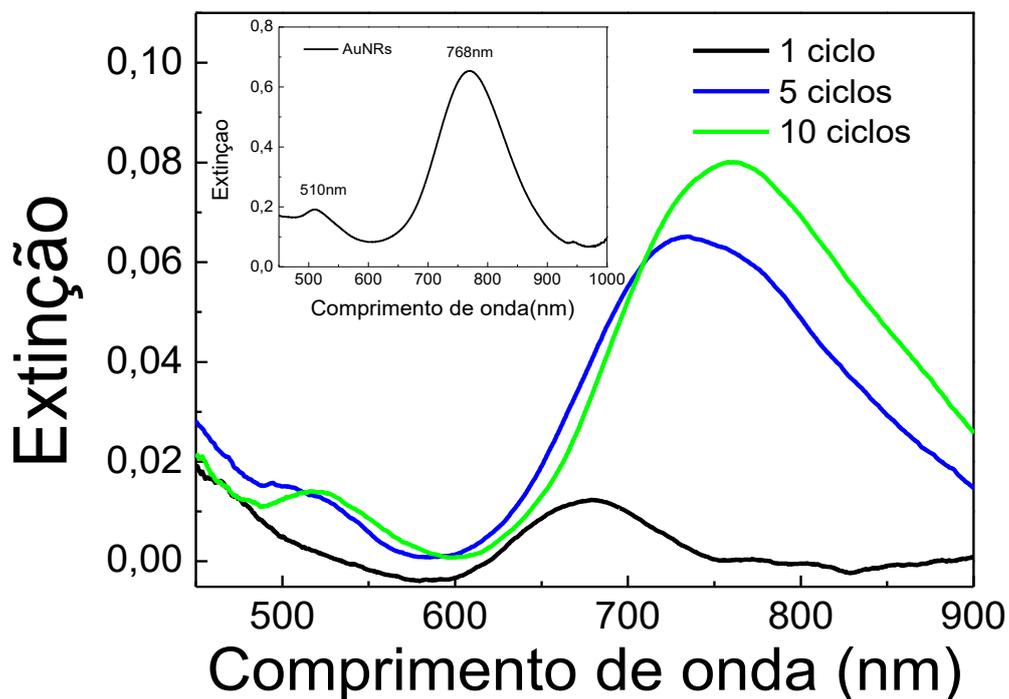
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.4 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DOS FILMES DE AuNPs SOBRE LÂMINAS DE VIDRO

Os AuNRs-chip foram construídos baseados na adsorção química dos AuNRs sobre lâminas de vidro. Foram construídos substratos utilizando apenas os AuNRs, pois a síntese deles foi realizada com maior rendimento e mostrou-se bastante reprodutível. O procedimento para deposição dos AuNRs sobre slides de vidro foi adaptado do trabalho de Fan e Brolo (FAN e BROLO, 2009), com modificações no procedimento pela adição de duas etapas de aquecimento adotadas. A primeira etapa de aquecimento foi realizada no início da adsorção do MPTMS, o que fez com que as moléculas do MPTMS tivessem uma melhor adsorção ao vidro e a segunda etapa de aquecimento permitiu que houvesse maior conexão dos átomos de oxigênio dos grupos métoxi do MPTMS com a superfície do vidro. Consequentemente, obteve-se uma melhor adsorção dos AuNRs sobre o vidro.

A caracterização inicial dos AuNRs-chip foi realizada através da espectroscopia no UV-VIS, onde o sinal característico dos AuNRs foi acompanhado. Os espectros da construção dos AuNRs-chip com 1, 5 e 10 ciclos de adsorção de AuNRs são mostrados na Figura 30.

Figura 30: Espectros de extinção dos AuNRs-chip



Inserto: Espectro LSPR dos AuNRs em suspensão coloidal utilizados.
 Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

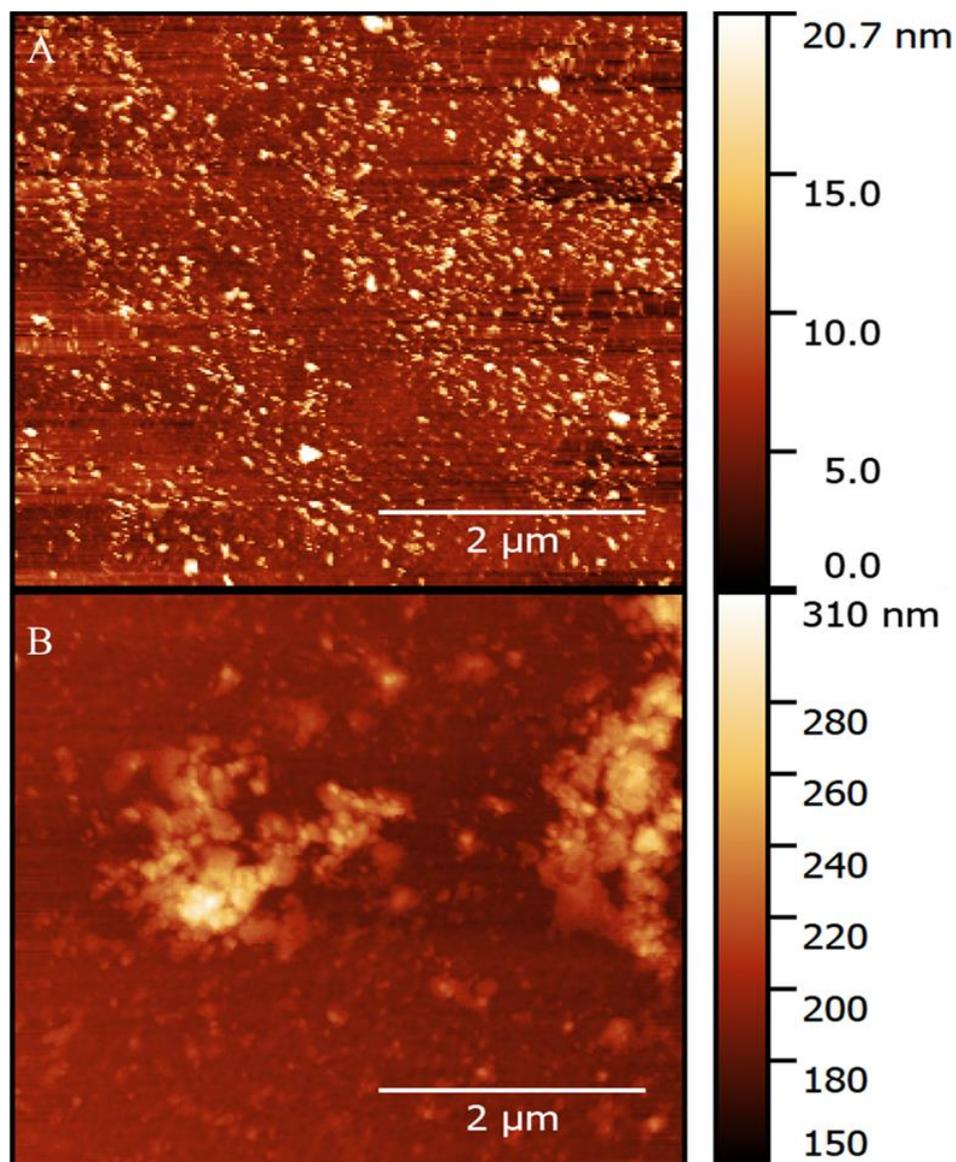
Após o primeiro ciclo de adsorção de AuNRs é possível observar uma banda LSPR pouco intensa, mas bem definida com máximo próximo aos 700 nm na Figura 30; porém, o espectro ainda não possui o sinal característico dos AuNRs, já que não é possível observar a banda LSPR-T dos bastões, próximo a 530 nm. Com 5 ciclos de adsorção o sinal característico dos AuNRs começa a aparecer no espectro de extinção, além de observar-se um aumento significativo do sinal referente a banda do LSPR-L, a banda atribuída ao LSPR-T também é observada. O aumento da intensidade do sinal LSPR é um indicativo de que mais nanoestruturas foram adsorvidas na superfície do vidro. O efeito do aumento da quantidade de nanoestruturas adsorvidas na superfície é visual, já que é possível observar que com o aumento do número de ciclos de adsorção a lâmina de vidro começa a se tornar avermelhada. A partir de 5 ciclos de adsorção, o perfil espectral dos AuNRs-chip se torna muito semelhante ao sinal característico dos AuNRs em suspensão mostrado no inserto da Figura 30. O último espectro com 10 ciclos de adsorção apresenta um sinal LSPR bastante intenso tanto para LSPR-L como para o LSPR-T. Além disso, a relação entre as duas bandas se mantém similar à observada para os AuNRs em suspensão. Apesar do sinal maior para o substrato com 10 ciclos de deposição, os AuNRs-chip foram utilizados com 5 ciclos de adsorção, pois além de apresentar intensidade LSPR satisfatória, precisou de menor tempo de preparação.

Um fato interessante a ser ressaltado é que as bandas LSPR apresentam um deslocamento para o vermelho à medida que se aumenta o número de ciclos de adsorção de AuNRs sobre a superfície do vidro. Isso se deve ao fato de que essas nanopartículas se aglomeram e interagem entre si ao serem depositadas, e uma separação interpartículas pequena causa mudanças na posição da LSPR, como predito pela teoria de Maxwell-Garnet (SANTOS *et al.*, 2016). Por exemplo, para nanoesferas, essa observação pode ser feita para valores de distância entre partículas da ordem de $d < 5R$, onde d é a distância entre as partículas e R é o raio da partícula (SANTOS *et al.*, 2016). O plasmon de superfície localizado das nanopartículas pode sofrer acoplamento para distâncias interpartículas pequenas e, assim, deslocar a banda LSPR para maiores comprimentos de onda, levando a um comportamento similar às nanopartículas maiores. Portanto, quando são formados aglomerados de nanopartículas com vários tamanhos diferentes, esses podem causar tanto o deslocamento do máximo da banda LSPR como, no caso de formação de aglomerados com diversos números de partículas diferentes, também seu alargamento, o que foi efetivamente observado nos espectros de extinção da Figura 30.

4.5 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DOS AuNRs-CHIP

Foi realizada uma caracterização dos AuNRs-chip através da técnica de AFM. Essa técnica foi escolhida no caso dos AuNRs-chip porque a utilização de SEM é adequada para substratos condutores, o que não é o caso das lâminas de vidro, resultando no acúmulo de cargas na superfície, o que dificulta ou impossibilita a aquisição das imagens por essa técnica.

Figura 31: Microscopia de força atômica para os AuNRs-chip



(A) 1 ciclo de deposição (B) 5 ciclos de deposição de AuNRs. A escala ao lado da figura indica a altura medida em nm.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

É possível observar na micrografia na Figura 31A, a escala ao lado indica a altura medida em nm, apenas estruturas que podem ser associadas à AuNRs com espaçamento uma das outras, o que está de acordo com o espectro da Figura 30, onde há um sinal LSPR de baixa intensidade. Por outro lado, na micrografia AFM para o substrato após 5 ciclos de deposição há um número maior de nanoestruturas além de se observar a aglomeração dessas em diversas regiões do suporte de vidro; esse resultado está de acordo com o aumento e alargamento do sinal LSPR que foi observado na Figura 30, e confirmado pela micrografia B. É possível observar também a formação dos aglomerados de AuNRs, o que confirma o

proposto pela espectroscopia no UV-VIS, que a formação de agregados diminui a distância entre as partículas e geram o deslocamento para o vermelho e o alargamento da banda LSPR.

4.6 ESTUDO DA SENSIBILIDADE LSPR

O estudo da sensibilidade é de grande importância para avaliar a performance de um biossensor LSPR. Sabe-se que a partir da teoria de Gans, que a variação do índice de refração próximo à superfície metálica do material plasmônico causa deslocamentos na frequência de ressonância do plasmon de superfície. A magnitude do deslocamento da banda LSPR com a variação do índice de refração para os substratos preparados nessa tese foi feito pelo monitoramento através de espectroscopia no UV-VIS. Para que seja utilizado como biossensor é necessário que o substrato apresente uma variação significativa da posição da banda LSPR com as mudanças do índice de refração; conhecendo sua sensibilidade ao índice de refração do meio, é possível assumir que o mesmo também será sensível a alterações no índice de refração causadas pela adsorção de biomoléculas, como proteínas ou interações do tipo antígeno-anticorpo.

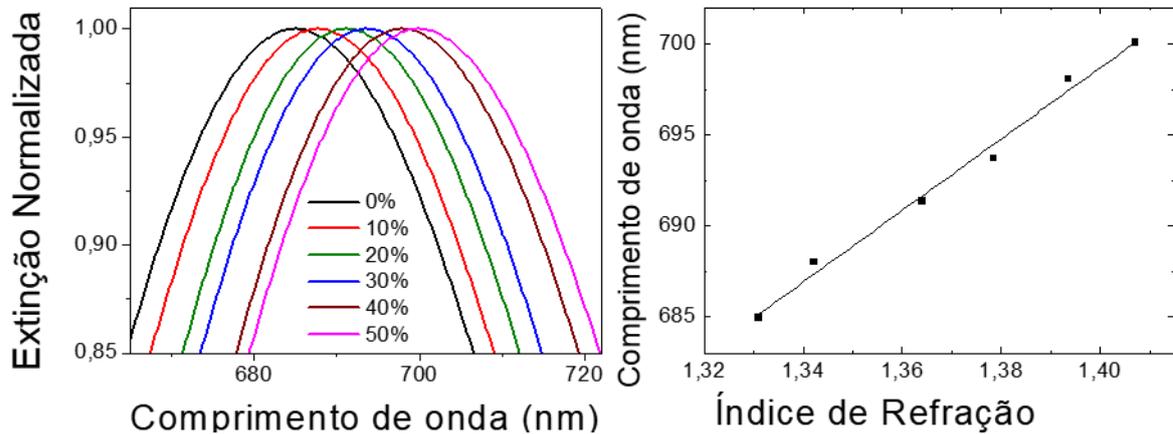
Uma regressão linear de um gráfico com os dados do máximo da banda LSPR em função do índice de refração da solução ou solvente utilizado foi obtida para encontrar a sensibilidade dos dois tipos de substratos estudados nesse trabalho de doutorado. O coeficiente angular dessa reta, em unidades de nm (variação do máximo da banda LSPR) por unidade de índice de refração, RIU (apesar do índice de refração ser adimensional, o RIU é utilizado na literatura para mostrar a variação de nm por elemento de índice de refração), foi chamado de sensibilidade. A sensibilidade e FOM foram calculadas para os dois substratos construídos: (1) S-AuNRs; (2) AuNRs-chip e foram discutidas para os dois separadamente, devido às variações de procedimento impostas pelo estado em que cada substrato se encontrava.

4.6.1 S-AuNRs

A **Figura 32** mostra os espectros de extinção para os S-AuNRs redispersos em diferentes concentrações de glicerol, variadas de 0 % V/V até 50 % V/V em água deionizada, de modo que os índices de refração variaram de 1,3310 até 1,4071. A banda do plasmon longitudinal foi utilizada para o monitoramento, por ser mais sensível às mudanças no índice de refração. Os valores de extinção dos espectros foram normalizados entre 0 e 1,

procedimento realizado em todos os resultados onde há o eixo de extinção normalizada. Os resultados da Figura 32A mostram um deslocamento da banda LSPR para o vermelho com o aumento do índice de refração.

Figura 32: Sensibilidade dos AuNRs em suspensão



A) Espectros de extinção para os AuNRs em suspensão, redispersos em diferentes concentrações de glicerol. B) Gráfico da regressão linear do deslocamento do máximo da banda LSPR em relação ao índice de refração das soluções

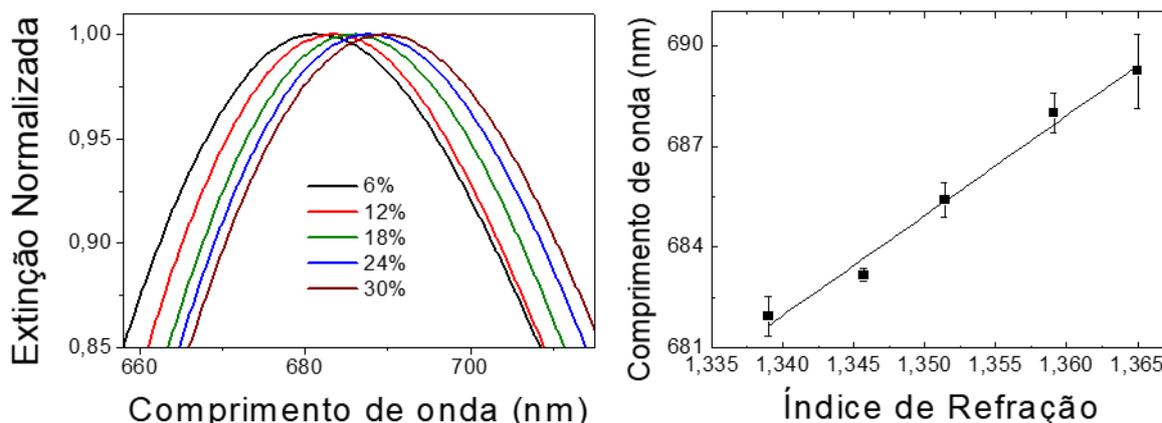
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A curva de regressão linear é mostrada na Figura 32B. O coeficiente de correlação é de $R^2 = 0,98866$ indicando um comportamento linear que favorece a aplicação em biossensores. A partir do coeficiente angular dessa curva obtém-se a sensibilidade, que foi de 196 nm RIU^{-1} para os AuNRs em suspensão. Outra ferramenta importante para análise da performance do biosensor é a FOM e essa foi calculada de acordo com a Equação 11 obtendo-se o valor de $2,2 \text{ RIU}^{-1}$.

4.6.2 AuNRs-chip

Os espectros de extinção para os AuNRs-chip imobilizados em diferentes concentrações de glicose são mostrados Figura 33A. Os AuNRs-chip foram imersos em diferentes soluções de glicose com concentrações variando entre 6 % m/V até 30 % m/V em água deionizada, com índices de refração que variaram entre 1,339 até 1,365 RIU. Do mesmo modo que para os AuNRs em suspensão, a banda do plasmon longitudinal foi monitorada e o deslocamento do máximo da banda para o vermelho foi observado com o aumento do índice de refração.

Figura 33: Sensibilidade dos AuNRs-chip.



A) Espectro de extinção dos AuNRs imobilizados imersos em diferentes soluções de glicose B) Gráfico da regressão linear do deslocamento do máximo da banda LSPR em relação ao índice de refração das soluções

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A regressão linear para os dados dos AuNRs-chip é mostrada na Figura 33B. É importante notar que para os AuNRs-chip foi feito o ajuste linear da curva a partir da média de três medidas em diferentes pontos da lâmina do máximo de absorção para cada uma das soluções de glicose, de modo que os respectivos erros associados a essa média são apresentados pelas barras de erro na Figura 33B. O valor de $R^2 = 0,98377$ indica um comportamento linear e a sensibilidade calculada para esse substrato foi 297 nm RIU^{-1} , com FOM calculada de $3,0 \text{ RIU}^{-1}$.

4.6.3 Comparação com a literatura

A partir desses resultados de sensibilidade e FOM foi possível comparar as duas configurações de biossensores com a literatura, como mostrado na Tabela 3. Os S-AuNRs apresentaram resultados semelhantes à literatura para nanoestruturas com razões de aspecto semelhantes (CHEN *et al.*, 2008). Esse resultado era esperado pois a síntese de bastões foi reproduzida sem alterações da literatura (NIKOUBAKHT e EL-SAYED, 2003). Por outro lado, para os AuNRs-chip onde o procedimento de adsorção na superfície do vidro foi aprimorado, os resultados indicam um aumento de 18% na sensibilidade e de 15% na FOM para bastões com razão de aspecto semelhantes. Esse resultado indica que os AuNRs-chip são substratos bastante promissores para aplicação como biossensores.

Tabela 3: Comparativo entre a sensibilidade e FOM dos AuNRs-chip com biosensores baseados em AuNRs com razão de aspecto similares

Material	Razão de aspecto	Sensibilidade (nm RIU ⁻¹)	FOM (RIU ⁻¹)	Aumento na sensibilidade ^a	Aumento na FOM ^b	Referência
AuNRs-chip	2,7	297	3,0	-	-	Essa Tese
S-AuNRs	2,7	196	2,2	-	-	Essa Tese
AuNRs em lâminas de vidro	2,2	252	n.i. ^c	18%	-	(MARINA KOS <i>et al.</i> , 2007)
AuNRs em lâminas de vidro	3,3	170	1,3	75%	131%	(MAYER <i>et al.</i> , 2008)
AuNRs	2,4	195	2,6	52%	15%	(CHEN <i>et al.</i> , 2008)
AuNRs	3,4	224	2,1	33%	43%	(CHEN <i>et al.</i> , 2008)
AuNRs em lâminas de vidro	5,2	366	n.i. ^c	-	-	(CHEN <i>et al.</i> , 2007)
AuNRs em lâminas de vidro	3,5	330	1,4	-	15%	(PAI <i>et al.</i> , 2017)

^aAumento na sensibilidade dos AuNRs-chip construídos nessa tese em relação a outros estudos reportados na literatura ^b Aumento na FOM dos AuNRs-chip construídos nessa tese em relação a outros estudos reportados na literatura ^c n.i. = não informado

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.7 DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR LSPR

A detecção de biomoléculas utilizando os substratos preparados e a técnica LSPR foi realizada para uma interação antígeno-anticorpo modelo, entre BSA e anti-BSA. Essa detecção foi feita utilizando as duas configurações de biosensores, S-AuNRs e AuNRs-chip.

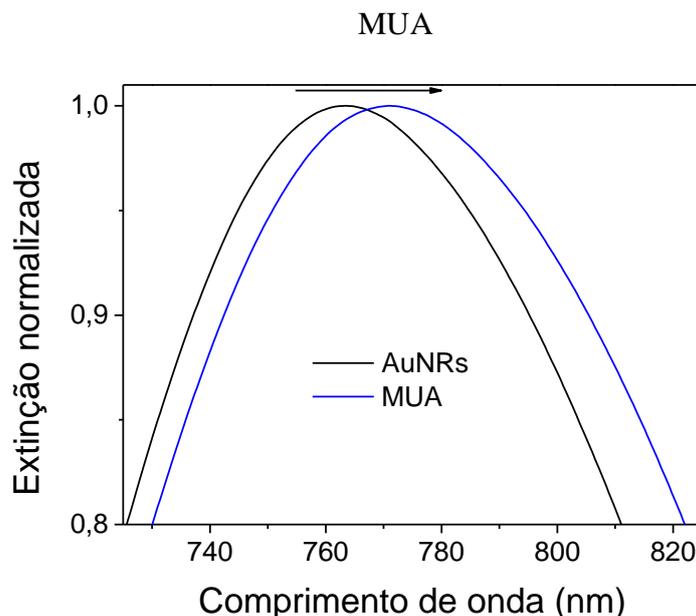
A detecção de anti-BSA por LSPR foi realizada a partir de um ensaio de quatro etapas. A primeira etapa consistiu na modificação da superfície dos AuNRs com MUA, que é um ácido carboxílico alifático de cadeia longa, com um grupo tiol na posição 11. O grupo tiol tem grande afinidade pela superfície metálica de Au, devido à forte ligação Au-S. A utilização do MUA foi essencial no presente trabalho, pois o CTAB forma uma bicamada na superfície dos AuNRs, mesmo após a retirada do excesso por centrifugação, e a ligação Au-S é bastante forte, capaz de separar essa bicamada de CTAB do AuNR e substituir por uma monocamada de MUA (CAO *et al.*, 2012).

Após a funcionalização com MUA, o grupo carboxila foi modificado com moléculas que permitem a imobilização de biomoléculas como a BSA. O procedimento utilizou o par EDC/NHS, onde o EDC atua como catalisador da reação, e o NHS fica ligado a superfície dos nanobastões, permitindo a imobilização de biomoléculas que contenham grupos amina. Sendo assim a BSA foi imobilizada e a detecção de anti-BSA ocorreu através da interação antígeno-anticorpo .

4.7.1 Detecção de Anti-BSA utilizando os S-AuNRs

Na Figura 34 são mostrados os espectros UV-VIS dos S-AuNRs modificados por MUA, etapa inicial de todo o processo de modificação. Podemos observar o deslocamento característico para maior comprimento de onda devido à adsorção de moléculas na superfície metálica. O deslocamento do máximo da banda LSPR após a modificação com MUA foi de 8,0 nm, média feita a partir de 4 amostras, em relação aos S-AuNRs não modificados. O MUA é uma molécula pequena se comparada a proteínas, portanto é comum que não haja deslocamentos expressivos na banda LSPR de nanopartículas de Au, devido à pequena variação do índice de refração local próximo à superfície metálica.

Figura 34: Espectros de extinção para a etapa de modificação da superfície dos S-AuNRs com



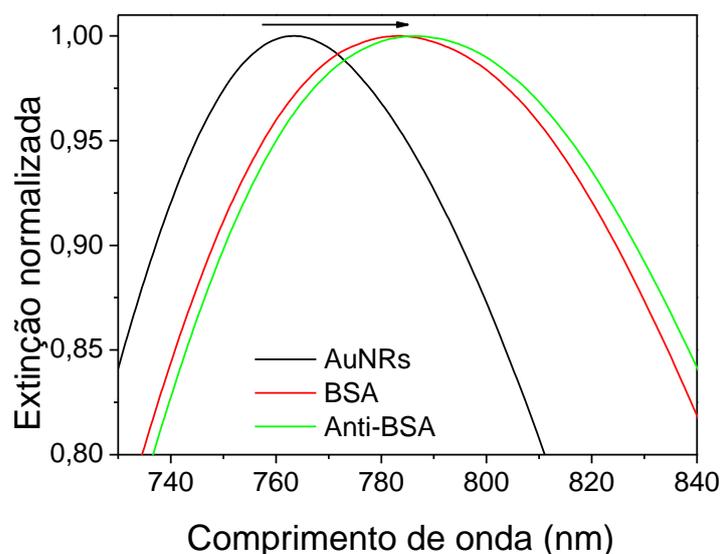
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A Figura 35 mostra os espectros no UV-VIS dos S-AuNRs após a adição de BSA e de anti-BSA. Primeiramente, é possível observar um grande deslocamento para o vermelho com a imobilização de BSA na superfície dos S-AuNRs. Como a BSA é uma proteína e, conseqüentemente, tem um tamanho muito maior que o MUA, por exemplo, sua imobilização causa grande variação do índice de refração local e como resultado apresenta deslocamentos significativos do máximo da banda LSPR que, nesse caso, foi de 17,2 nm na média para 4 amostras de S-AuNRs, valor de deslocamento relacionado aos S-AuNRs sem modificação. A imobilização de BSA é um resultado bastante interessante nesse trabalho, primeiramente pelo fato de caracterizar a imobilização de uma biomolécula no substrato e por essa modificação ser essencial para todos os ensaios de detecção feitos, tanto para LSPR como para SERS e SEF e, portanto, esse resultado torna-se uma maneira de verificar a imobilização de BSA na superfície dos bastões.

O deslocamento para maiores comprimentos de onda na presença de anti-BSA em relação à BSA imobilizada, também mostrado na Figura 35, é de 2,76 nm na média para 4 amostras de S-AuNRs. O deslocamento causado pela adição de anti-BSA é consideravelmente menor do que o observado para a BSA, o que é esperado, visto que a BSA e a anti-BSA são biomoléculas grandes, de modo que após a imobilização da primeira resulta no aumento da distância do anti-BSA em relação à superfície metálica, o que faz com que a interação entre as duas esteja longe da superfície metálica e, conseqüentemente haja um decréscimo da sensibilidade para a detecção de anti-BSA em relação a imobilização do antígeno. Esse

deslocamento, porém, é suficiente para que haja a detecção de anti-BSA através do fenômeno do LSPR por uma interação de antígeno-anticorpo, indicando inclusive que o método é sensível à imobilização dessa biomolécula.

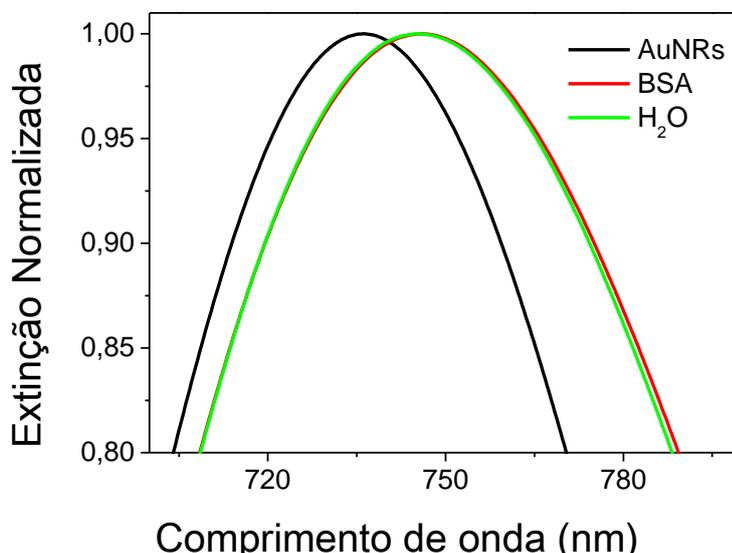
Figura 35: Espectros de extinção para imobilização de BSA e posterior detecção de anti-BSA utilizando os S-AuNRs



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Um experimento branco foi feito no intuito de verificar a seletividade do biosensor em relação à adição de anti-BSA. No lugar da anti-BSA foi adicionada a mesma quantidade de água deionizada a fim de confirmar se a interação antígeno-anticorpo é a causa do deslocamento da banda LSPR. Na Figura 36 são apresentados os espectros de extinção para o experimento branco. Assim como para os espectros da Figura 35, há um grande deslocamento para maior comprimento de onda com a imobilização de BSA, contudo após a adição de água deionizada (espectro em verde), não há nenhum deslocamento ou mudança significativa no perfil espectral dos S-AuNRs-BSA. Este resultado indica que o substrato construído é sensível especificamente à presença de anti-BSA, comprovando que a interação antígeno-anticorpo é a responsável pelo deslocamento da banda LSPR dos S-AuNRs.

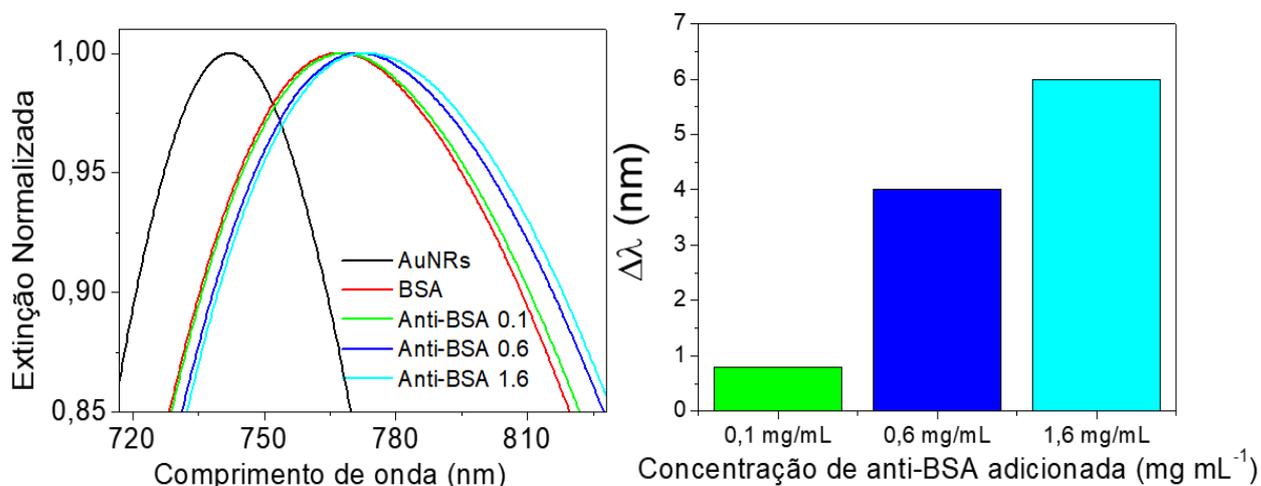
Figura 36: Espectros de extinção do experimento branco



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Avaliou-se a influência da concentração da biomolécula no ensaio de detecção do biossensor. Foram adicionadas sequencialmente alíquotas de 50 μL com diferentes concentrações de anti-BSA, os espectros de extinção são mostrados na Figura 37A. É possível observar que o deslocamento está relacionado à concentração do analito utilizada, já que se observa, tanto nos espectros quanto no gráfico de barras mostrado na Figura 37B (os valores embaixo de cada barra indicam a concentração de anti-BSA adicionada no total), que para maiores concentrações de anti-BSA adicionadas, há um maior deslocamento da banda LSPR para o vermelho. Porém, com a elevação da concentração (adição de mais 50 μL de solução 1 mg mL^{-1} de anti-BSA à alíquota, resultando em 1,6 mg mL^{-1} adicionado no total) nota-se um deslocamento de apenas 2 nm em relação ao anterior. A diminuição da variação com o aumento da concentração do anticorpo é uma indicação preliminar de que está próximo de se atingir um limite de concentração que satura a superfície dos AuNRs, diminuindo a sensibilidade dos mesmos.

Figura 37: Influência da concentração de Anti-BSA no deslocamento da banda LSPR.



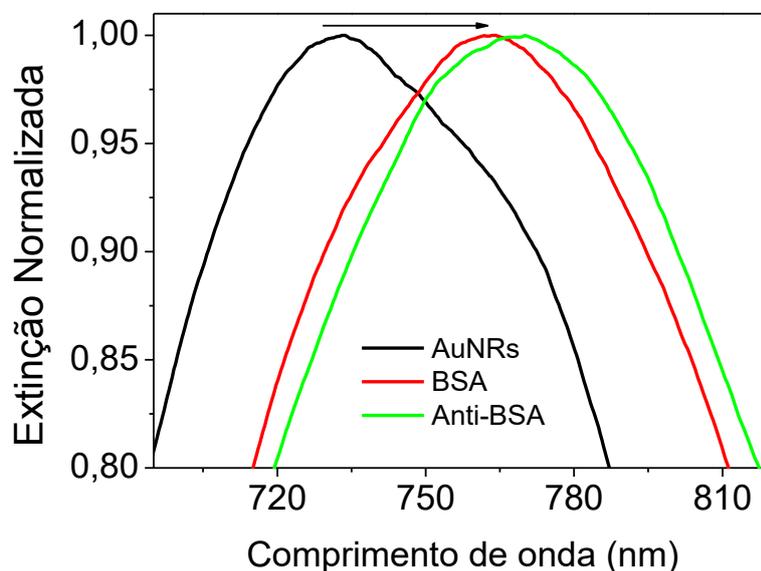
Os valores embaixo de cada barra do gráfico de barras indicam a concentração de anti-BSA adicionada no total.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.7.2 Detecção de Anti-BSA utilizando o AuNRs-chip

A detecção de Anti-BSA através dos AuNRs-chip segue o mesmo procedimento para os S-AuNRs, porém algumas mudanças nas concentrações e tempos de adsorção, já que os AuNRs-chip são muito mais estáveis. Todas as modificações superficiais foram acompanhadas por espectroscopia no UV-VIS e os espectros de extinção são mostrados na Figura 38. Pode-se observar o deslocamento característico para o vermelho com a imobilização de BSA e posteriormente para a detecção de anti-BSA. Da mesma maneira que foi observado para os experimentos com S-AuNRs, houve um grande deslocamento para BSA e um menor para o anti-BSA. O deslocamento médio, para 6 medidas em diferentes regiões de dois AuNRs-chip, para BSA foi de 30,3 nm e a média para o anti-BSA de 33,1 nm em relação aos AuNRs-chip sem modificação. O deslocamento médio entre BSA e anti-BSA, portanto, foi de 2,85 nm, indicando a detecção específica do anticorpo, também pela interação antígeno-anticorpo.

Figura 38: Espectros de extinção para imobilização de BSA e posterior detecção de anti-BSA utilizando os AuNRs-chip



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.8 COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO ENTRE AS DUAS CONFIGURAÇÕES

Na Tabela 4 são mostradas as principais figuras de mérito para avaliar o desempenho dos substratos estudados, que são os deslocamentos médios da banda LSPR e o limite de detecção (LOD) para as duas configurações de biossensor. A sensibilidade e FOM para os AuNRs-chip são maiores do que os S-AuNRs; esses valores maiores podem ser atrelados ao acoplamento entre nanopartículas próximas, mostrados tanto por UV-VIS como por AFM nas seções 4.4 e 4.5, que levam a uma maior intensificação do campo eletromagnético local, fazendo com que o substrato fique mais sensível a modificações no índice de refração local. O LOD foi calculado utilizando os AuNRs imobilizados com BSA como branco para a detecção de Anti-BSA, através da equação $LOD = 3\sigma_B / S$, (sendo σ_B o desvio padrão do branco). O LOD para os AuNRs-chip é menor se comparado aos S-AuNRs, também devido à maior sensibilidade (S). Os AuNRs utilizados na construção dos dois tipos de biossensor foram preparados da mesma forma, porém durante os experimentos de modificação superficial, as vizinhanças e disposição espacial afetaram sua performance como biossensor.

Tabela 4: Comparação de performance entre os AuNRs-chip e os S-AuNRs

Material	Sensibilidade (nm RIU⁻¹)	FOM (RIU⁻¹)	$\Delta\lambda_{\max}$ AuNRs – BSA (nm)	$\Delta\lambda_{\max}$ AuNRs – Anti-BSA (nm)	$\Delta\lambda_{\max}$ detecção de Anti-BSA (nm)	LOD RIU
S- AuNRs	196	2,2	17,2 ± 4,2	19,9 ± 4,7	2,76 ± 0,58	0,064
AuNRs- chip	297	3,0	30,3 ± 5,4	33,1 ± 6,6	2,85 ± 2,41	0,054

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

É interessante destacar que apesar dos AuNRs-chip apresentarem melhor FOM e sensibilidade, e mesmo os dois substratos sendo construídos com os mesmos AuNRs, os deslocamentos obtidos nos ensaios para detecção de anti-BSA (aproximadamente 3 nm para os dois biossensores) são bastante similares. Esse resultado indica que o ambiente nos arredores dos AuNRs influencia na eficiência de detecção. Alguns fatores devem ser avaliados para explicar esse comportamento parecido: (1) os S-AuNRs possuem uma maior área superficial disponível para a interação antígeno-anticorpo em comparação ao AuNRs-chip (configuração 3D comparada a uma 2D), porque os bastões imobilizados precisam ter um de seus lados adsorvidos na lâmina de vidro; (2) o volume e a área dos AuNRs sintetizados é similar nos dois casos, porém, a área dos AuNRs efetivamente disponível no filme formado sobre a lâmina de vidro e na suspensão de AuNRs é diferente, justamente pela mudança de uma configuração 2D para 3D. Realizou-se uma estimativa com base nos resultados de microscopia, de que a suspensão S-AuNRs possui cerca de 10^3 mais AuNRs disponíveis para a imobilização de biomoléculas do que os AuNRs-chip. Além disso, considerando a intensidade da banda LSPR, os S-AuNRs possuem uma intensidade cerca de $10\times$ maior. Segundo a Equação 9, uma maior superfície disponível para imobilização, aumenta o n_{ads} , que é o índice de refração efetivo do analito (anti-BSA no presente caso) na vizinhança à superfície e, conseqüentemente causa aumento do deslocamento do máximo da banda LSPR. Esse comportamento não é observado na imobilização de BSA devido ao fato de que a concentração de BSA é 6 vezes maior para os AuNRs-chip.

Finalmente, é importante notar que os desvios padrão calculados são sempre menores para os S-AuNRs nos ensaios reportados, porém, apenas na detecção de anti-BSA se

observa um desvio padrão alto para os AuNRs-chip. Esse maior erro pode ser atribuído à heterogeneidade de distribuição dos AuNRs, porque, apesar do acoplamento do LSPR-L devido à agregação das nanopartículas aumentar a intensificação do campo eletromagnético local e consequentemente aumentar a intensidade, o alargamento da banda LSPR diminui a resolução.

Os dois biossensores não apresentaram mudanças apreciáveis na posição da banda LSPR, aumento na largura, nem deslocamentos consideráveis da banda LSPR e perda de intensidade, mantendo sempre o perfil espectral característico dos AuNRs durante os processos de modificação superficial e detecção de anti-BSA, circunstância essencial na construção e aplicação de um biossensor do tipo proposto.

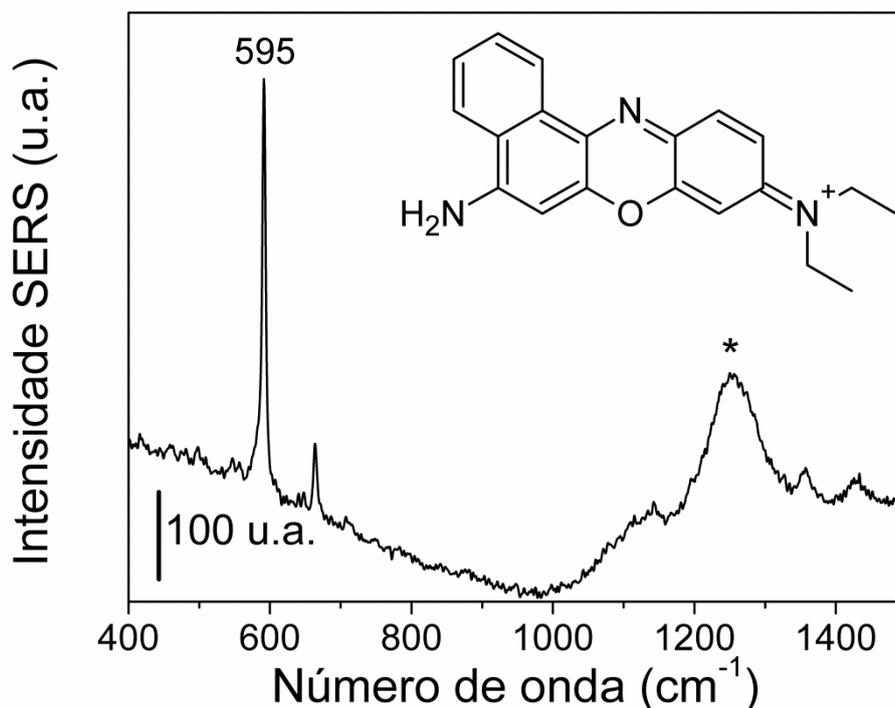
4.9 DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR SERS E SEF

A detecção por SERS E SEF foi realizada utilizando um imunensaio tipo sanduíche, como mostrado na Figura 18, que envolve um método de detecção extrínseco (indireto). O imunensaio utilizou os dois substratos de AuNRs estudados para a detecção por LSPR: os S-AuNRs e os AuNRs-chip. Uma diferença importante foi que os S-AuNRs tiveram a adição da molécula prova, que é a responsável pelo sinal SERS ou SEF a ser analisado na detecção de biomoléculas pelo método proposto. A molécula prova foi adicionada na mesma solução em que foi adicionado o MUA nos S-AuNRs para adsorção. Os AuNRs-chip com a anti-BSA imobilizada em sua superfície foram imersos na suspensão S-AuNRs modificados com a molécula repórter e logo os espectros SERS ou SEF foram obtidos.

4.9.1 Detecção de anti-BSA por SERS

Primeiramente na detecção de biomoléculas utilizando o método extrínseco foi necessário que a suspensão de AuNRs modificada com a molécula prova possuísse sinal SERS intenso o bastante para que pudesse ser analisado no ensaio de detecção. Para a detecção utilizando a técnica SERS, a molécula prova utilizada foi o corante azul do Nilo; então, primeiramente realizou-se um experimento para verificar se a suspensão de S-AuNRs, após as modificações superficiais e adição da molécula prova (chamada a partir daqui de AN-S-AuNRs) possuía sinal SERS detectável. O espectro SERS dessa suspensão e a estrutura do corante são mostrados na Figura 39.

Figura 39: Espectro SERS dos AN-S-AuNRs com concentração inicial da molécula prova $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, excitado em 785 nm.



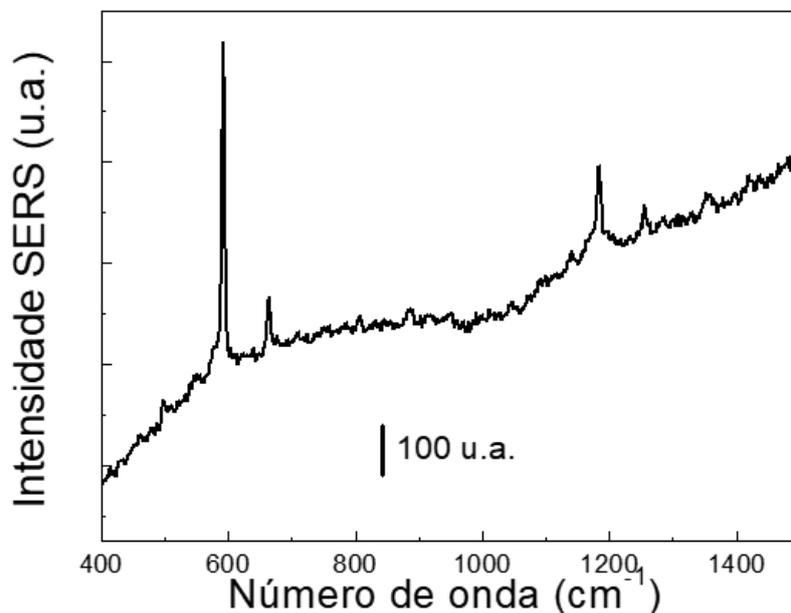
Inserto: estrutura do corante AN. * Artefato aparente na excitação em 785 nm

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A Figura 39 mostra o espectro SERS característico para o azul do Nilo excitado em 785 nm. O espectro apresenta sinal SERS intenso com alta relação sinal/ruído considerando que a concentração do azul do Nilo foi de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, apresentado de forma bem clara a banda em 595 cm^{-1} atribuída ao anel fenoxazina (BROLO e SANDERSON, 2004; REKHA *et al.*, 2018). Este resultado indica que a suspensão AN-S-AuNRs possui sinal SERS com boa intensidade, que foi, portanto, utilizada como suspensão de prova no imunoensaio sanduíche baseado no efeito SERS.

Espera-se através da interação antígeno-anticorpo que os AN-S-AuNRs fiquem adsorvidos nos AuNRs-chip. O sinal analítico utilizado foi a intensidade SERS do corante azul do Nilo, que foi monitorada através do mapeamento químico utilizando a técnica Raman, monitorando especificamente a banda mais intensa do espectro do corante, em 595 cm^{-1} . Na Figura 40 é mostrado um espectro SERS selecionado do azul do Nilo com radiação excitante em 785 nm na superfície do AuNRs-chip após sua imersão na suspensão dos AN-S-AuNRs.

Figura 40: Espectro SERS da superfície do AuNRs-chip após imersão na suspensão AN-S-AuNRs, excitado em 785nm.

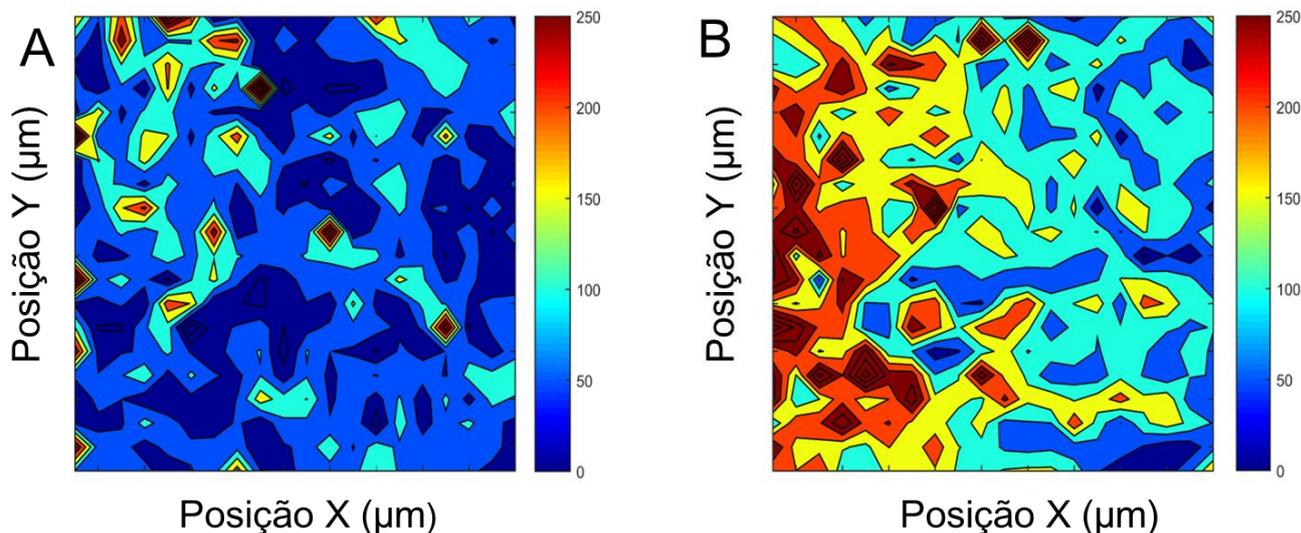


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A Figura 40 mostra o espectro SERS do corante azul do Nilo com razoável intensidade e relação sinal/ruído, apesar do número de moléculas espalhadoras ter sido menor do que nos AN-S-AuNRs. Esse resultado confirmou a presença do corante na superfície dos AuNRs-chip e conseqüentemente a interação dos AuNRs-chip com os AN-S-AuNRs. Porém, a presença do corante não permitiu identificar diretamente se o tipo da adsorção foi uma adsorção física ou se foi de fato a adsorção devido à interação antígeno-anticorpo entre BSA e Anti-BSA que aconteceu entre AN-S-AuNRs e AuNRs-chip.

Realizou-se um experimento branco no qual os AuNRs-chip tiveram a superfície modificada apenas até a etapa de imobilização de BSA e, portanto, sem a presença do analito anti-BSA. Foi então analisado os AuNRs-chip com e sem a presença de anti-BSA através do mapeamento SERS de 400 pontos na superfície de cada lâmina, apresentado na Figura 41. A escala em cores ao lado de cada mapeamento indica a intensidade do sinal SERS. Os mapeamentos foram construídos com base na área da banda em 595 cm^{-1} que é a banda mais intensa da molécula-prova (REKHA *et al.*, 2018). Através do mapeamento SERS foi possível monitorar a intensidade e homogeneidade do sinal SERS do corante azul do Nilo adsorvido na superfície dos AuNRs-chip.

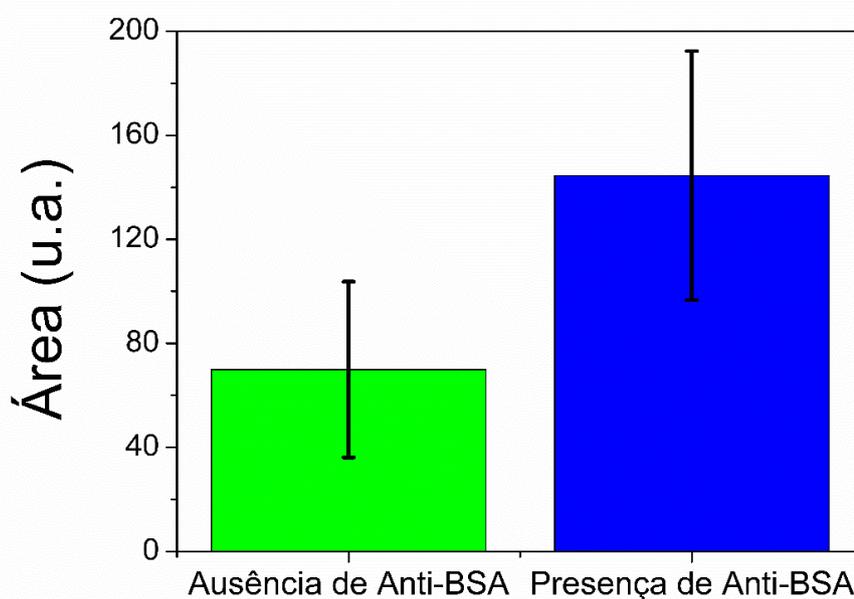
Figura 41: Mapeamento SERS de 400 pontos dos AuNRs-chip após imersão nos AN-S-AuNRs. A integral utilizada foi da banda em 595 cm^{-1} do azul do Nilo, excitado em 785nm .



A) Imunoensaio sanduíche na ausência de anti-BSA. B) Imunoensaio sanduíche na presença de anti-BSA. O tamanho da área mapeada no item A foi de $6200 \times 3100\ \mu\text{m}^2$ e no item B, $5720 \times 4400\ \mu\text{m}^2$.
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Na Figura 41B é possível observar que na presença de anti-BSA há um aumento na observação de eventos com alta intensidade SERS em quase todas as regiões monitoradas em relação ao que é observado na Figura 41A, o que pode ser notado pela predominância das cores quentes (próximas ao vermelho) no mapeamento. Observa-se que a distribuição de intensidades é heterogênea nos dois substratos, mesmo na presença de anti-BSA. Como já discutido nos experimentos envolvendo o sensoriamento por LSPR, os AuNRs-chip possuem essa heterogeneidade associada à presença de regiões com maior densidade de bastões e regiões com poucos bastões, que foi demonstrado pelos resultados de UV-VIS e AFM (Figura 30 e Figura 31), resultando em uma heterogeneidade intrínseca desse substrato. Afim de garantir que essa heterogeneidade não interferisse na performance do substrato como biossensor, foi utilizado um procedimento proposto por Bohn e colaboradores, onde os 10% de eventos com valores de intensidade extremos (tanto maiores quanto menores) foram desconsiderados (BOHN *et al.*, 2010). Utilizando esse procedimento, um gráfico de barras da intensidade média SERS com uma barra de erros (considerada como o desvio padrão da média após o sugerido acima) foi construído e é mostrado na Figura 42.

Figura 42: Gráfico de barras da média das integrais da banda do AN em 595 cm^{-1} com seus respectivos desvios padrão para os 400 pontos dos mapeamentos SERS da Figura 41, utilizando o procedimento de Bohn e colaboradores onde foram retirados 10% dos menores e maiores valores de intensidade.



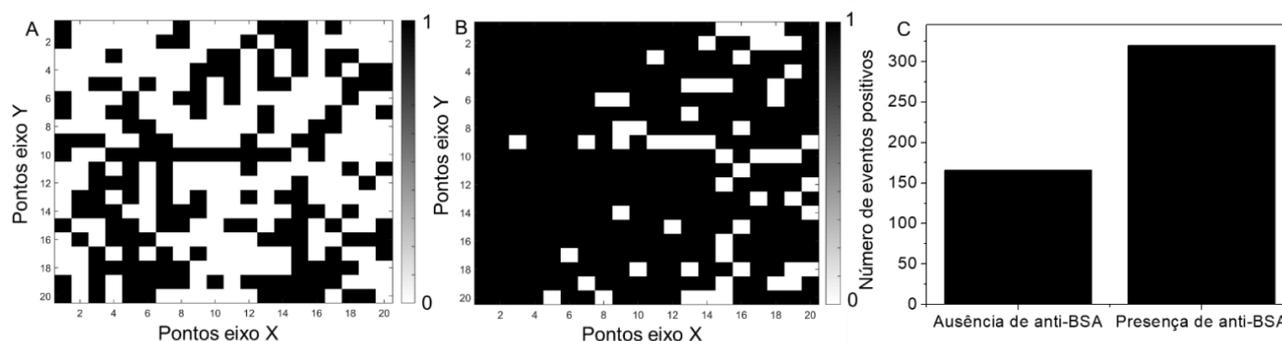
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Através do gráfico de barras da Figura 42 pode-se observar que o sinal SERS na presença de anti-BSA é cerca de duas vezes maior na média do que em sua ausência, o que evidencia a detecção da anti-BSA através do método proposto. Além disso, outra evidência é o maior valor de incerteza percentual da intensidade SERS na ausência de anti-BSA. A presença do analito poderia levar à formação de um grande número de *hot spots* SERS, que teriam desempenho altamente variado, porém aumentam a intensidade SERS média, já que não há controle sobre a região espacial em que a proteína está ligada às nanopartículas. A presença de muitas regiões com baixa intensidade de sinal SERS no mapeamento da Figura 41A, junto do maior sinal SERS na presença de anti-BSA indica que a detecção do analito é através da interação específica entre o anti-BSA presente nos AuNRs-chip com a suspensão AN-S-AuNRs contendo BSA. Apesar do processo de lavagem, após a imersão na suspensão repórter ainda foi possível obter o sinal SERS do corante azul do Nilo, mesmo na ausência do anticorpo, o que indica que há também uma adsorção física dos AN-S-AuNRs na superfície dos AuNRs-chip.

Para garantir que a heterogeneidade intrínseca do substrato não interfisse na performance do biossensor, também foi utilizado o protocolo de Albuquerque e colaboradores

(DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018). Esse procedimento envolve a construção de um mapeamento digital da medida SERS para condições próximas a uma única molécula (SM-SERS); no presente trabalho o procedimento foi adaptado para o biossensor construído, já que não envolveu estudos de SM-SERS como no procedimento original. Para tanto, o mapeamento SERS digital foi construído a partir dos mapeamentos da Figura 41, onde os valores de intensidade SERS acima de um valor limite foram considerados como eventos positivos, atribuído o valor 1, por outro lado, para os valores abaixo desse limite foi atribuído o valor 0 e esses são considerados eventos nulos, gerando, então, um mapeamento de eventos positivos e nulos. O valor limite foi obtido a partir da média da intensidade dos 400 pontos do experimento branco. Foi construído então o mapeamento SERS digital do experimento branco, utilizando essa média, que foi de 79 contagens. O mapeamento da Figura 41B, experimento na presença de anti-BSA foi reconstruído, considerando a média de 79 contagens, onde todos os pontos onde a intensidade é maior, foi atribuído o valor 1. A Figura 43 mostra os mapeamentos SERS digitais para os experimentos na ausência e presença de anti-BSA e um gráfico de barras do número de eventos positivos em cada.

Figura 43: Tratamento de dados para o mapeamento SERS da Figura 41, considerando o procedimento de Albuquerque e colaboradores.



A) Mapeamento SERS digital construído a partir do mapeamento do experimento branco da Figura 41A. (B) Mapeamento SERS digital construído a partir do experimento na presença de anti-BSA da Figura 41B. (C) Gráfico de barras com o número de eventos positivos em A e B. Onde os pontos em preto são eventos positivos (atribuído o valor 1).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Pela Figura 43B pode-se observar um elevado número de eventos positivos, bem maior do que o observado na Figura 43A. O gráfico de barras na Figura 43C evidencia essa diferença, são 320 eventos positivos na presença de anti-BSA, enquanto que em sua ausência foram apenas 166 eventos, demonstrando que a presença de anti-BSA gera um sinal SERS

maior em todo o substrato, comparado ao branco, portanto, demonstrando através desse método a detecção de anti-BSA.

A proposta de Albuquerque e colaboradores de reconstrução do mapeamento SERS, além de diminuir a interferência da heterogeneidade intrínseca do substrato, gera um mapeamento digital que considera apenas o contraste entre eventos positivos (que têm intensidade SERS apreciável) e negativos. Essa abordagem mostra o resultado de forma bastante simples e visual, o que potencialmente pode permitir uma análise direta do resultado. Esse tipo de abordagem pode permitir a construção de biossensores com simplicidade de análise.

4.9.2 Detecção de Anti-BSA por SEF

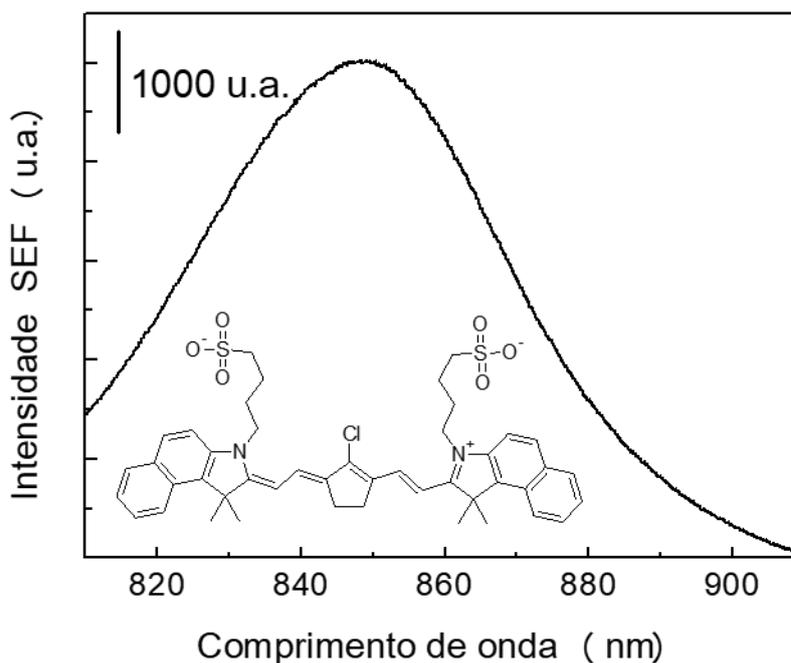
O método de imunensaio sanduíche foi utilizado para a detecção de anti-BSA por SEF, com os mesmos procedimentos utilizados para os ensaios utilizando a técnica SERS. Contudo, houve a troca da molécula prova para o corante IR-820, pois este possui duas bandas de absorção em 690 nm e 819 nm (NEVES e ANDRADE, 2015) sendo, portanto, pré-ressonante em 633 nm e ressonante em 785 nm. Para esses ensaios foi utilizada a linha laser em 785 nm, linha na qual a molécula prova apresenta alta eficiência de fluorescência. Assim como para o SERS, primeiramente foi testado o sinal do corante presente na suspensão de AuNRs, que agora será intitulada de IR-S-AuNRs.

É interessante notar que o uso do MUA como modificador superfície dos AuNRs e do MPTMS como molécula ligante entre vidro e AuNRs e entre as nanopartículas pode favorecer o fenômeno de fluorescência no sistema proposto. Isso porque a presença dessas moléculas causa o aumento da distância entre o corante e a superfície dos bastões, impedindo que as moléculas do corante IR-820 se adsorvam diretamente na superfície metálica, conseqüentemente, permitem que a intensificação do campo eletromagnético local próximo à superfície das nanopartículas causada pela LSPR seja mais importante que a supressão pela presença de uma superfície metálica; resultando em uma possível intensificação do sinal de fluorescência. O mesmo pode ser observado com o MPTMS, uma vez que na construção dos AuNRs-chip são feitos vários ciclos de adsorção de AuNRs e MPTMS, fazendo com que a superfície metálica de certo modo esteja protegida.

A ideia do uso dos AuNRs-chip para detecção utilizando o fenômeno SEF, veio das interferências observadas na otimização dos substratos para detecção SERS, porque, dependendo da concentração do corante e da linha laser utilizada havia uma intensidade de

fluorescência muito alta. Para confirmar se seria possível utilizar o sinal de fluorescência foi feito um experimento com os AuNRs-chip sem nenhuma modificação de superfície; para isso foi obtido o espectro SEF do corante IR-820 adsorvido na superfície da lâmina, mostrado na Figura 44.

Figura 44: Espectro SEF do corante IR-820 10^{-5} mol L⁻¹ sobre os AuNRs-chip sem modificação, excitado em 785 nm.



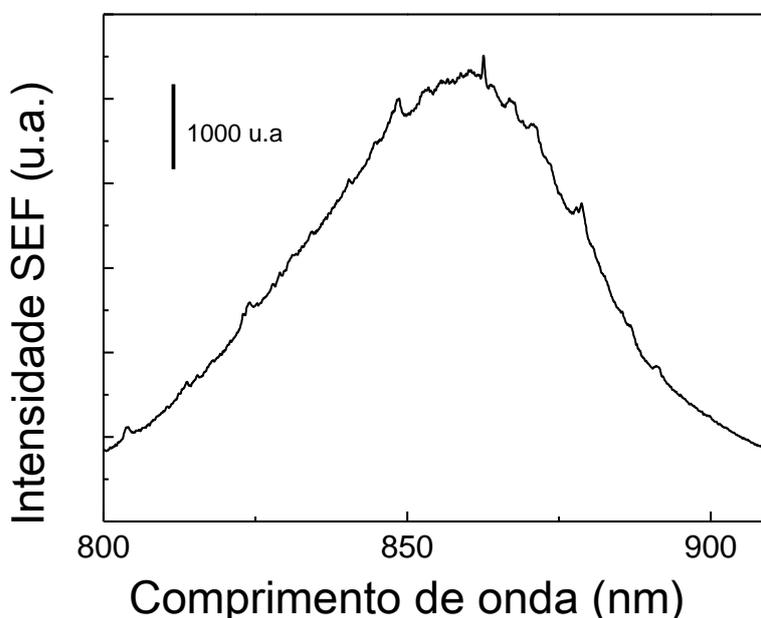
Inserto: Estrutura do corante IR-820

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

No espectro de fluorescência do IR-820 apresentado na Figura 44 observa-se uma intensidade muito mais alta do que o esperado na presença de nanopartículas de ouro, o que indica que se trata do espectro SEF do IR-820. Essa possibilidade foi confirmada, pois ao fazer o mesmo experimento com uma lâmina de vidro não se obtém praticamente nenhum sinal de fluorescência da molécula. Tal resultado indica que é possível então utilizar os AuNRs-chip como um substrato para SEF, assim como foi utilizado para SERS. Deve-se ressaltar também que a utilização dos substratos para a fluorescência não implica que os mesmos sejam inviáveis para uso como substato SERS, já que pode ser selecionada linha laser em que a molécula prova não seja um fluoróforo eficiente; esse tipo de procedimento foi mostrado na seção anterior.

A suspensão IR-S-AuNRs também precisa possuir alta intensidade SEF característica da molécula prova. Na Figura 45 é mostrado o espectro SEF da suspensão IR-S-AuNRs, que é característico do corante IR-820. Também é possível observar algumas bandas SERS sobrepostas ao sinal de fluorescência. Este resultado comprova que os IR-S-AuNRs estão marcados com a molécula prova e, portanto, podem ser utilizados para a detecção no imunoensaio sanduíche.

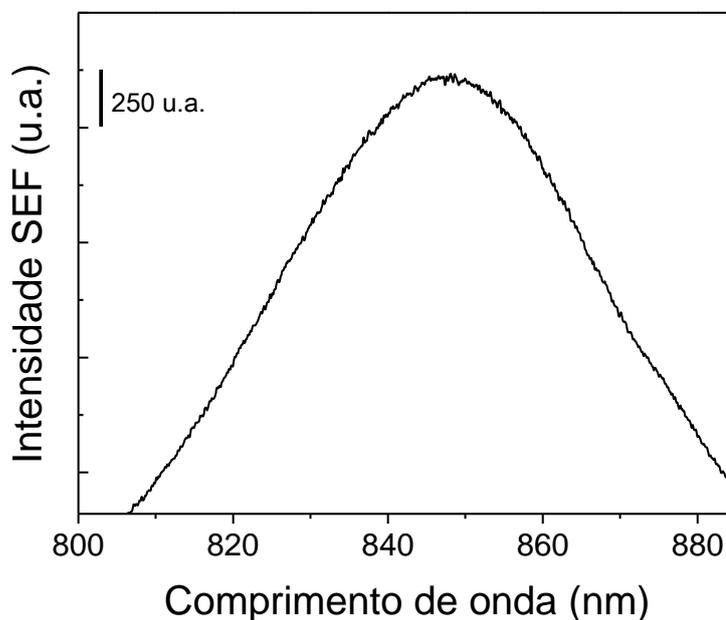
Figura 45: Espectro SEF do IR-820 imobilizado na superfície de AuNRs em suspensão com MUA, excitado em 785 nm.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Com o resultado mostrado na Figura 45, considera-se que a suspensão IR-S-AuNRs pode ser utilizada para os ensaios de detecção de anti-BSA por SEF. Então, assim como feito para a detecção SERS, os AuNRs-chip foram imersos nessa suspensão, e então um mapeamento de 400 pontos foi feito em dois substratos de AuNRs-chip. Um desses substratos com o analito, anti-BSA, e outro na ausência do mesmo. Na Figura 46 é mostrado um espectro SEF obtido em um dos pontos do mapeamento feito na superfície dos AuNRs-chip com Anti-BSA. Observa-se o sinal SEF característico do corante com alta relação sinal/ruído; indicando a detecção da molécula de interesse, já que houve a interação entre o AuNRs-chip e a suspensão IR-S-AuNRs.

Figura 46: Espectro SEF da superfície do AuNRs-chip após imersão na suspensão IR-S-AuNRs

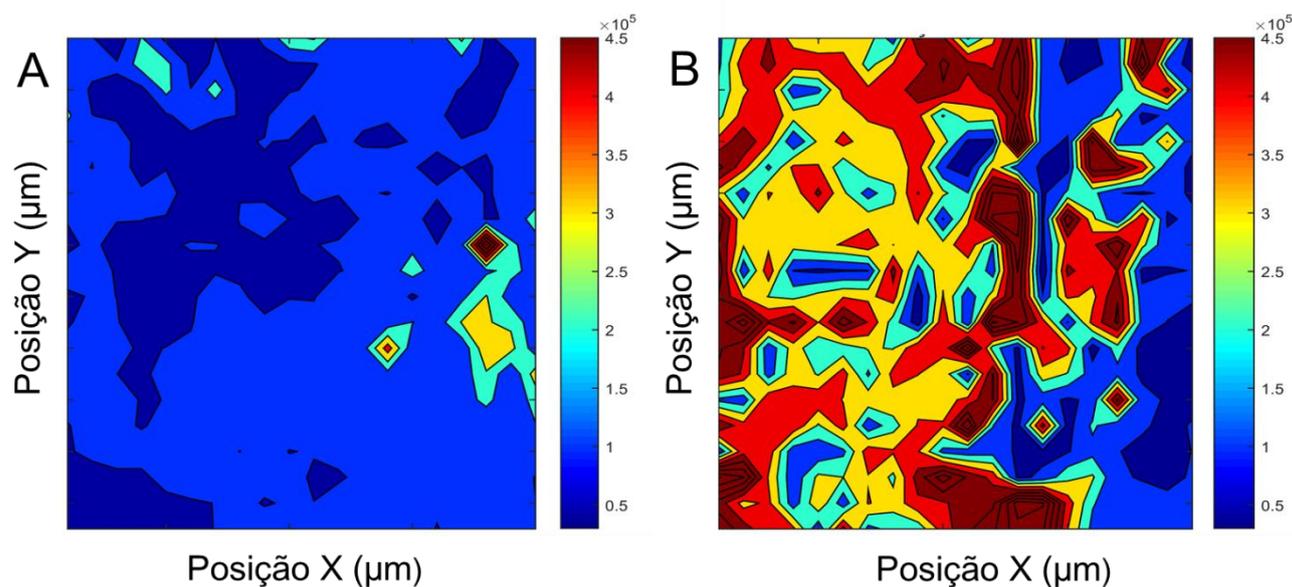


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Apenas com o espectro da Figura 46 não é possível entender se a adsorção dos bastões marcados com IR-820 é através de uma adsorção física apenas ou de uma interação antígeno-anticorpo. Para verificar a influência da interação específica antígeno-anticorpo foi analisado o mapeamento como um todo, assim como para os ensaios envolvendo a técnica SERS. Os mapeamentos foram obtidos utilizando a integral da banda de fluorescência do corante IR-820, e são mostrados na Figura 47. A escala de cores ao lado de cada mapeamento indica que quanto mais quente a cor (ou seja, tendendo para o vermelho), mais intenso o sinal SEF.

Nos mapeamentos da Figura 47 pode-se observar que na presença de anti-BSA (A), o sinal da fluorescência é maior do que o que foi obtido para o ensaio na ausência do anticorpo (B).

Figura 47: Mapeamento SEF de 400 pontos dos AuNRs-chip após imersão nos IR-S-AuNRs. A integral utilizada foi da banda de fluorescência do IR-820, excitado em 785 nm.

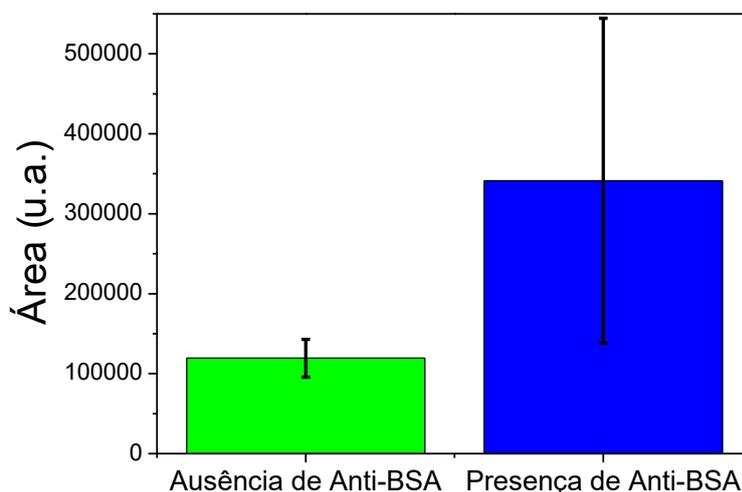


A) Imunoensaio sanduíche na ausência de Anti-BSA. B) Imunoensaio sanduíche na presença de Anti-BSA. O tamanho da área mapeada no item A foi de $6800 \times 3200 \mu\text{m}^2$ e no item B, $6600 \times 3700 \mu\text{m}^2$.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Os mapeamentos da Figura 47 mostram que o sinal SEF também é heterogêneo nos dois AuNRs-chip; de modo a diminuir a interferência da heterogeneidade intrínseca desses substratos na resposta do biossensor, obtendo melhor performance, plotou-se um gráfico de barras utilizando a proposta de Bohn e colaboradores, que é apresentado na Figura 48.

Figura 48: Gráfico de barras da média das integrais da banda de fluorescência com seus respectivos desvios padrão para os 400 pontos dos mapeamentos SEF da Figura 47, utilizando o procedimento de Bohn e colaboradores onde foram retirados 10% dos menores e maiores valores de intensidade.

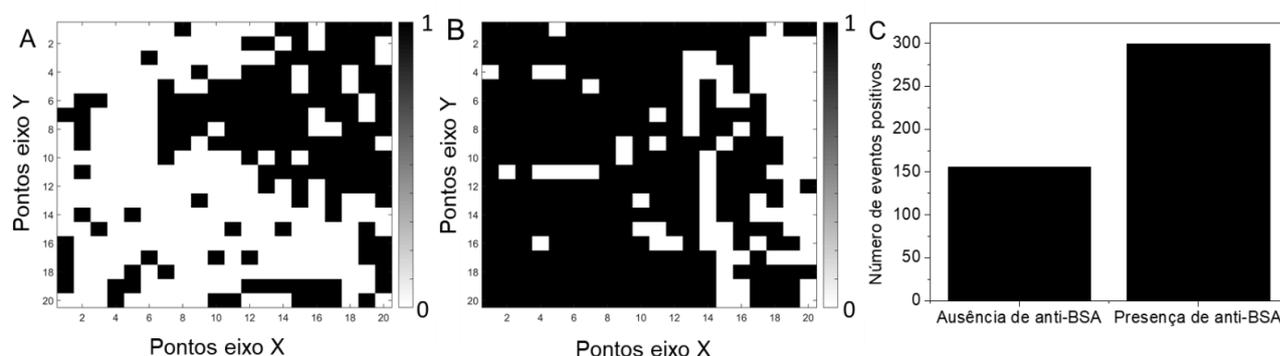


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

É possível observar através do gráfico de barras da Figura 48 que o sinal SEF na presença de anti-BSA é cerca de $3\times$ maior na média do que em sua ausência, evidenciando a detecção do anticorpo através do imunoenensaio sanduíche baseado na detecção por SEF. O maior sinal mostrado pelas regiões de cores quentes no mapeamento da Figura 47A e pelo gráfico de barras indicam que a detecção do analito é através da interação específica entre o anti-BSA e o BSA, assim como na detecção SERS que utiliza o mesmo método. Do mesmo modo, mesmo com os processos de lavagem após imersão na suspensão IR-S-AuNRs, o AuNRs-chip sem Anti-BSA ainda apresenta sinal do corante, o que pode ser devido à adsorção física dos bastões marcados na superfície do substrato.

A proposta de Albuquerque e colaboradores (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018), foi aplicada para os mapeamentos SEF. A Figura 49 mostra os mapeamentos reconstruídos dos experimentos na presença e ausência de anti-BSA da Figura 47 e um gráfico de barras do número de eventos positivos para esses experimentos.

Figura 49: Tratamento de dados para o mapeamento SEF da Figura 47, considerando o procedimento de Albuquerque e colaboradores



(A) Mapeamento SEF digital construído a partir do mapeamento do experimento branco da Figura 47A. (B) Mapeamento SEF digital construído a partir do experimento na presença de anti-BSA da Figura 47B. (C) Gráfico de barras com o número de eventos positivos em A e B. Onde os pontos em preto são eventos positivos (atribuído o valor 1).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A presença de anti-BSA gera um grande aumento no número de eventos positivos como mostra a Figura 49B, em sua ausência (Figura 49A) o número de eventos positivos é bem menor, para a construção desses mapeamentos foi utilizado o valor limite de 128192 contagens (média do experimento branco). O gráfico de barras em C indica essa diferença: na presença de anti-BSA observam-se 299 eventos positivos contra 156 eventos positivos em sua ausência. Esse maior número de eventos positivos indica a detecção de anti-BSA através desse método de tratamento de dados.

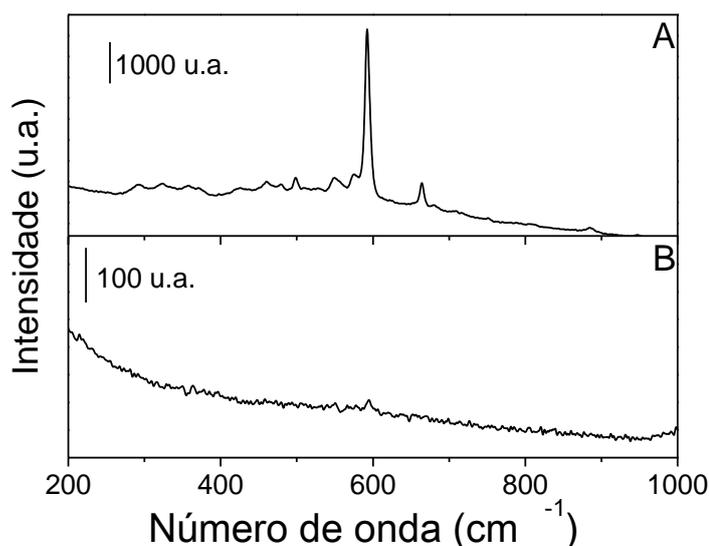
4.10 ATIVIDADE SERS DE AuNBs E AuNGs

Foram realizados testes da atividade SERS das AuNBs e AuNGs, para possível aplicação como biossensores. AuNBs e AuNGs são nanoestruturas promissoras para aplicação em biossensores baseados em LSPR (CHEN *et al.*, 2008). Porém, também são estruturas muito interessantes para aplicação como substratos SERS e SEF, o que pode eventualmente levar à aplicação na construção de biossensores baseados nessas duas técnicas, devido ao grande aumento do campo eletromagnético local nas pontas desse tipo de nanoestruturas. Isso é especialmente verdadeiro para os AuNGs, que possuem subestruturas nanométricas com diferentes tamanhos e espessuras (REGUERA *et al.*, 2017).

4.10.1 Atividade SERS das AuNBs em 785 nm

Para determinar atividade SERS das AuNBs foi monitorado o sinal do corante AN na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ como molécula prova, excitado em 785 nm. Foram selecionadas as AuNBs preparadas utilizando os surfactantes CTPAB e CTBAB, que foram as que apresentaram melhores resultados na espectroscopia UV-VIS e pelas micrografias da seção 4.3.2. Na Figura 50 tem-se o espectro SERS do AN $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ na suspensão de AuNBs sintetizadas com CTPAB. É possível observar no espectro SERS obtido uma grande intensificação do sinal Raman em relação ao azul do Nilo em solução aquosa, que fica clara pela observação do aumento de intensidade da banda característica do corante em 595 cm⁻¹. O AEF foi utilizado para avaliar a intensificação gerada por essas nanoestruturas, para as AuNBs com CTPAB o AEF calculado para essa banda foi de 178.

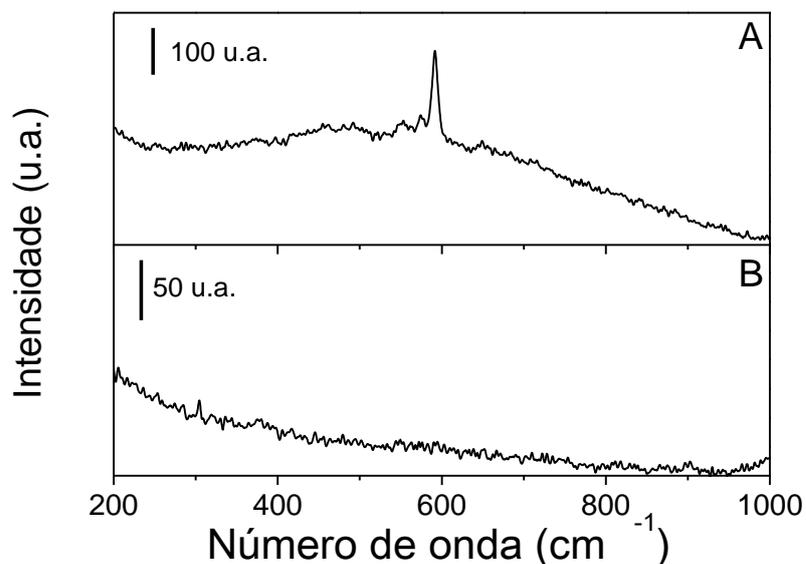
Figura 50: Espectros SERS do azul do Nilo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.



(a) em suspensão de AuNBs (sintetizadas com CTPAB) (b) em solução aquosa

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

A Figura 51 mostra a atividade SERS para o AN na presença de AuNBs sintetizadas com CTBAB; essas AuNBs também possuem uma intensificação do sinal Raman do corante, porém em menor escala do que para as mesmas estruturas sintetizadas com CTPAB. O AEF medido para a banda em 595 cm⁻¹ foi de 17.

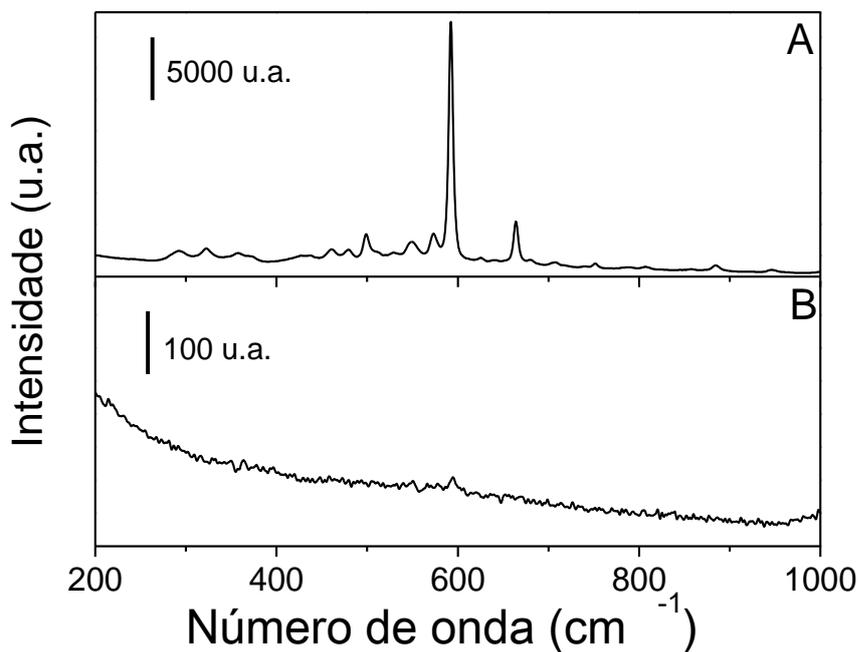
Figura 51: Espectros SERS do azul do Nilo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

(a) em suspensão de AuNBs (sintetizadas com CTBAB) (b) em solução aquosa

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.10.2 Atividade SERS das AuNGs em 785 nm

O AN na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ também foi utilizado para monitorar o desempenho como substrato SERS dos AuNGs. Na Figura 52 são mostrados o espectro SERS do corante na presença das AuNGs sintetizadas com TTAB e o espectro Raman do AN disperso em solução aquosa. Há grande intensificação do sinal Raman em todas as bandas do espectro do corante, resultando em valor do AEF para banda em 595 cm^{-1} de 910.

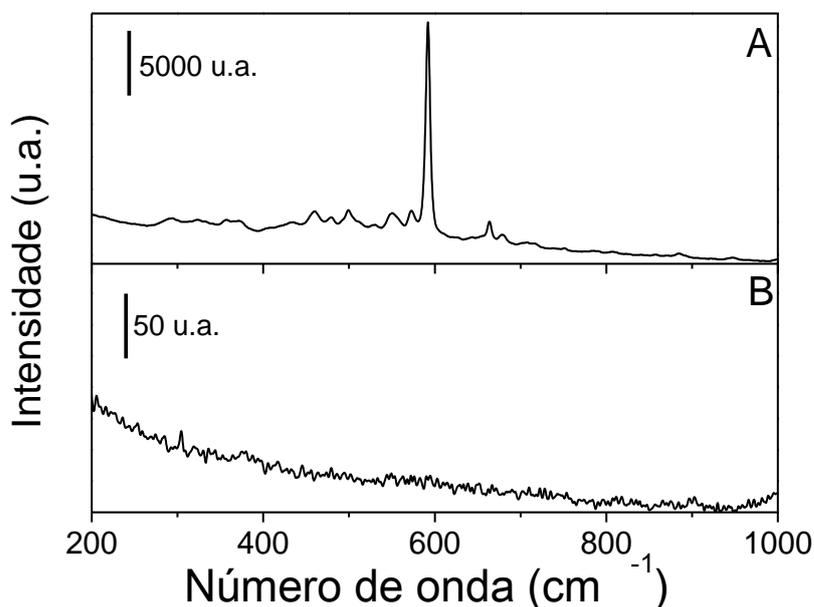
Figura 52: Espectros SERS do azul do Nilo $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 

(a) em suspensão de AuNGs (sintetizadas com TTAB) (b) em solução aquosa.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Também foi realizado o espectro SERS do corante na mesma concentração na presença de AuNGs sintetizadas com o TTAB, apresentado na Figura 53. É possível observar grande intensificação do sinal Raman de todas as bandas do corante na presença dos AuNGs, observa-se que no espectro do corante em solução aquosa, praticamente não há nenhum sinal Raman característico do mesmo. O AEF para a banda em 595 cm^{-1} foi de 1521.

Figura 53: Espectros SERS do azul do Nilo $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em suspensão de AuNBs (sintetizadas com TTBAB) e em solução aquosa.



(a) em suspensão de AuNBs (sintetizadas com TTBAB) (b) em solução aquosa.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.10.3 Fatores de intensificação

Os AEF calculados para a banda em 595 cm^{-1} do corante azul do Nilo são mostrados na Tabela 5. Entre as AuNBs, é observado um maior AEF para as preparações com CTBAB, contudo as duas preparações de AuNBs possuem AEF relativamente baixo se comparado aos AuNGs. Deve-se destacar que a banda de absorção do corante não está em ressonância com o comprimento de onda de excitação do laser (785 nm), indicando que essas nanoestruturas possuem alto AEF. Cabe ressaltar que o AEF calculado a partir da Equação 14 só leva em consideração o quanto o sinal é intensificado na presença das AuNPs em relação ao sinal Raman normal do analito, não considera o quanto de material é adsorvido na superfície metálica e nem as características do analito, sendo, portanto, esse AEF é subestimado (NOBREGA *et al.*, 2013). A presença de nanoestruturas muito finas nas pontas dos nanogalhos e também nas pontas das bipirâmides faz com que o campo eletromagnético local aumente nas regiões de alta curvatura e, conseqüentemente, aumente o AEF, de modo que essas nanoestruturas mostraram-se excelentes como substratos SERS (REGUERA *et al.*, 2017). Há de se ressaltar que os resultados de espectroscopia no UV-VIS e microscopias eletrônicas indicam a necessidade de otimização para obtenção de melhor rendimento das

nanoestruturas sintetizadas nessa tese e, portanto, ainda acredita-se ser possível obter valores mais altos de AEF com melhores rendimentos nas preparações de AuNBs e AuNGs.

Tabela 5: Fatores de intensificação (AEF) calculados para a banda em 595 cm^{-1} do corante azul do Nilo, excitado em 785 nm.

Nanoestrutura	AEF
AuNBs – CTBAB	17
AuNBs – CTPAB	178
AuNGs – TTAB	910
AuNGs – TTBAB	1521

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

De acordo com a Tabela 5 os AuNGs apresentam AEF muito superiores as AuNBs. A presença de nanoestruturas muito finas (pontas) nos AuNGs (Figura 29), pode fazer com que o campo eletromagnético fique confinado próximo a essas pontas e, por isso tais nanoestruturas apresentaram grande intensificação do campo eletromagnético local e conseqüentemente maior AEF. Os AuNGs, além disso, apresentaram banda muito larga na região do laser utilizado, gerando um efeito de ressonância com a radiação excitante pelo mecanismo eletromagnético do SERS e, portanto, quanto mais próximo o máximo da banda LSPR da nanoestrutura está do comprimento de onda de excitação maior será o AEF. As preparações de AuNGs com TTBAB apresentaram maior AEF do que aquelas obtidas com TTAB. Como pode ser observado pelos espectros no UV-VIS da Figura 24 e pelas micrografias da Figura 28 que os AuNGs com TTBAB possuem um perfil similar ao reportado pela literatura (CHEN *et al.*, 2008) do que as preparações com TTAB e, portanto, espera-se melhor desempenho SERS. Obviamente, também são estruturas muito promissoras como substratos SERS, principalmente para aplicação como sensores.

Um fator interessante a respeito das nanoestruturas de Au sintetizadas nessa tese é que todas possuem bandas LSPR-L que podem ter a posição razoavelmente controlada com mudanças simples nas condições de síntese, como a concentração de AgNO_3 ou ácido ascórbico ou na quantidade de nanopartículas precursoras adicionadas (NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003; REGUERA *et al.*, 2017), podendo então utilizar diferentes radiações laser em ressonância com a absorção das AuNPs, como é observado na diferença de AEF entre as preparações de AuNGs.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram sintetizados e caracterizados seis diferentes surfactantes com alto grau de pureza, utilizando da reação de bromoalcano e de trialquilaminas. Tais surfactantes obtiveram bons resultados como direcionadores de forma na síntese de AuNBs e AuNG, porém o rendimento precisa ser melhorado. AuNRs também foram sintetizados e caracterizados com boa homogeneidade de forma e tamanho.

Os AuNRs foram adsorvidos sobre lâminas de vidro de forma bastante eficiente, caracterizados por UV-VIS e AFM. Foram aplicados como biossensores LSPR em duas configurações diferentes: (i) S-AuNRs (ii) AuNRs-chip. Os S-AuNRs apresentaram sensibilidade de 196 nm RIU⁻¹ e FOM de 2,2 RIU⁻¹ e os AuNRs-chip, sensibilidade de 297 nm RIU⁻¹ e FOM de 3,0 RIU⁻¹. Comparado à literatura os AuNRs-chip apresentaram ao menos 18% de melhora na sensibilidade e 15% na FOM. Apesar dos melhores resultados de FOM e sensibilidade, na prova-de-conceito de detecção de anti-BSA, os dois substratos mostraram resultados semelhantes. Indicando que os arredores das nanoestruturas influenciam na eficiência da detecção.

Os dois substratos foram utilizados em conjunto na detecção pelas técnicas SERS e SEF na detecção de anti-BSA. O método de imunensaio sanduíche utilizado mostrou bons resultados nas detecções utilizando o método de detecção extrínseco, onde foram analisados sinais das moléculas prova azul do Nilo para o SERS e IR-820 para o SEF. A presença de anti-BSA acarretou o aumento do sinal SERS do azul do Nilo em 2 vezes na média e um maior número de eventos positivos no mapeamento digital. No SEF, o aumento do sinal do IR-820 foi 3 vezes na média com a presença do anticorpo, o mapeamento SEF digital na presença de anti-BSA teve maior número de eventos positivos.

As AuNGs e AuNBs mostraram bom desempenho como substratos SERS utilizando o corante azul do Nilo como molécula prova. São estruturas promissoras para a construção de biossensores SERS e SEF.

Os biossensores construídos utilizando as três técnicas são de baixo custo, rapidez e simplicidade de análise. Os métodos utilizados mostraram excelentes resultados nos ensaios de PdC e são promissores para detecção de anticorpos específicos de doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalous intense raman-spectra of pyridine at a silver electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 15, p. 5215-5217, 1977.
- AMENDOLA, V.; PILOT, R.; FRASCONI, M.; MARAGO, O. M.; IATI, M. A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. **Journal of Physics-Condensed Matter**, v. 29, n. 20, p. 48, 2017.
- AROCA, R. F. Plasmon enhanced spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 15, p. 5355-5363, 2013.
- BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P. Introduction to biosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 1, 2016.
- BOHN, J. E.; LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. A Statistical Criterion for Evaluating the Single-Molecule Character of SERS Signals. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 16, p. 7330-7335, 2010.
- BROLO, A. G. Plasmonics for future biosensors. **Nature Photonics**, v. 6, n. 11, p. 709-713, 2012.
- BROLO, A. G.; FERREIRA, J.; SANTOS, M. J. L.; ESCOBEDO, C.; SINTON, D.; GIROTTO, E. M.; EFTEKHARI, F.; GORDON, R. Development of plasmonic substrates for biosensing. p.703503-703513, 2008.
- BROLO, A. G.; SANDERSON, A. C. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) from a silver electrode modified with oxazine 720. **Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie**, v. 82, n. 10, p. 1474-1480, 2004.
- CAO, J.; GALBRAITH, E. K.; SUN, T.; GRATTAN, K. T. V. 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.
- CARDINAL, M. F.; VANDER ENDE, E.; HACKLER, R. A.; MCANALLY, M. O.; STAIR, P. C.; SCHATZ, G. C.; VAN DUYN, R. P. Expanding applications of SERS through versatile nanomaterials engineering. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 13, p. 3886-3903, 2017.
- CHEN, C.-D.; CHENG, S.-F.; CHAU, L.-K.; WANG, C. R. C. Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 6, p. 926-932, 2007.

CHEN, H.; KOU, X.; YANG, Z.; NI, W.; WANG, J. Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, n. 10, p. 5233-5237, 2008.

CIALLA-MAY, D.; ZHENG, X. S.; WEBER, K.; POPP, J. Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 13, p. 3945-3961, 2017.

CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, v. 75, n. 0, p. 790-798, 1979.

DAMBORSKÝ, P.; ŠVITEL, J.; KATRLÍK, J. Optical biosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 91, 2016.

DE ALBUQUERQUE, C. D. L.; SOBRAL-FILHO, R. G.; POPPI, R. J.; BROLO, A. G. Digital Protocol for Chemical Analysis at Ultralow Concentrations by Surface-Enhanced Raman Scattering. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 2, p. 1248-1254, 2018.

DING, S.-Y.; YI, J.; LI, J.-F.; REN, B.; WU, D.-Y.; PANNEERSELVAM, R.; TIAN, Z.-Q. Nanostructure-based plasmon-enhanced Raman spectroscopy for surface analysis of materials. **Nature Reviews Materials**, v. 1, p. 16021, 2016.

DREADEN, E. C.; ALKILANY, A. M.; HUANG, X.; MURPHY, C. J.; EL-SAYED, M. A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2740-2779, 2012.

DREXHAGE, K. H. Influence of a dielectric interface on fluorescence decay time. **Journal of Luminescence**, v. 1-2, p. 693-701, 1970.

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.

ENGLEBIENNE, 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.; CHOU, Y.-W.; RAHMAN, M.; DUAN, X.; GORDON, R.; SINTON, D.; BROLO, A. G.; FERREIRA, J. 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. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 34, p. 7381-7389, 2009.

FAN, M. K.; THOMPSON, M.; ANDRADE, M. L.; BROLO, A. G. 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**, 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.

FARKA, Z.; JUŘÍK, T.; KOVÁŘ, D.; TRNKOVÁ, L.; SKLÁDAL, P. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 15, p. 9973-10042, 2017.

FERREIRA, J.; SANTOS, M. J. L.; RAHMAN, M. M.; BROLO, A. G.; GORDON, R.; SINTON, D.; GIROTTO, E. M. Attomolar Protein Detection Using in-Hole Surface Plasmon Resonance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 436-437, 2009.

FERREIRA, J.; SANTOS, M. J. L.; RAHMAN, M. M.; BROLO, A. G.; GORDON, R.; SINTON, D.; GIROTTO, E. M. Attomolar Protein Detection Using in-Hole Surface Plasmon Resonance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 436+, 2009.

FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163-166, 1974.

FRENS, G. Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions. **Nature-Physical Science**, v. 241, n. 105, p. 20-22, 1973.

GANS, R. Über die Form ultramikroskopischer Goldteilchen. **Annalen der Physik**, v. 342, n. 5, p. 881-900, 1912.

GIRIGOSWAMI, K.; AKHTAR, N. Nanobiosensors and fluorescence based biosensors: An overview. **International Journal of Nano Dimension**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2019.

GRAHAM, D.; MOSKOVITS, M.; TIAN, Z.-Q. SERS – facts, figures and the future. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 13, p. 3864-3865, 2017.

GREEN, N. M. Avidin. In: C.B. ANFINSEN, J. T. E. A. F. M. R. (Ed.). **Advances in Protein Chemistry**: Academic Press, v. 29, p.85-133, 1975.

GRIFFIN, E. G.; NELSON, J. M. The influence of certain substances on the activity of invertase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 3, p. 722-730, 1916.

GUO, L.; JACKMAN, J. A.; YANG, H.-H.; CHEN, P.; CHO, N.-J.; KIM, D.-H. Strategies for enhancing the sensitivity of plasmonic nanosensors. **Nano Today**, v. 10, n. 2, p. 213-239, 2015.

GUPTA, B. D.; KANT, R. Recent advances in surface plasmon resonance based fiber optic chemical and biosensors utilizing bulk and nanostructures. **Optics & Laser Technology**, v. 101, p. 144-161, 2018.

HAES, A. J.; CHANG, L.; KLEIN, W. L.; VAN DUYNE, R. P. 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 DUYNE, 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.

HAES, A. J.; VAN DUYNE, R. P. A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, n. 7-8, p. 920-930, 2004.

HALAS, N. J. Plasmonics: An Emerging Field Fostered by Nano Letters. **Nano Letters**, v. 10, n. 10, p. 3816-3822, 2010.

HAMMOND, J. L.; BHALLA, N.; RAFIEE, S. D.; ESTRELA, P. Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries. **Biosensors**, v. 4, n. 2, p. 172-188, 2014.

HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**, v. 16, n. 7, p. 262-271, 2013.

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

HOWES, P. D.; CHANDRAWATI, R.; STEVENS, M. M. Colloidal nanoparticles as advanced biological sensors. **Science**, v. 346, n. 6205, 2014.

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

HUGHES, W. S. The potential difference between glass and electrolytes in contact with the glass. **Journal of the American Chemical Society**, v. 44, n. 12, p. 2860-2867, 1922.

JAIN, P. K.; EL-SAYED, M. A. Surface Plasmon Resonance Sensitivity of Metal Nanostructures: Physical Basis and Universal Scaling in Metal Nanoshells. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 47, p. 17451-17454, 2007.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 19, p. 4065-4067, 2001.

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.

JEEVANANDAM, J.; BARHOUM, A.; CHAN, Y. S.; DUFRESNE, A.; DANQUAH, M. K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 1050-1074, 2018.

JEONG, Y.; KOOK, Y.-M.; LEE, K.; KOH, W.-G. Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: General approaches and a review of recent developments. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 111, p. 102-116, 2018.

JIANG, N. N.; ZHUO, X. L.; WANG, J. F. Active Plasmonics: Principles, Structures, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 6, p. 3054-3099, 2018.

JUDITH LANGER AND SERGEY, M. N. A. L. M. L.-M. Sensing using plasmonic nanostructures and nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 26, n. 32, p. 322001, 2015.

KALAMBATE, P. K.; DHANJAI; HUANG, Z.; LI, Y.; SHEN, Y.; XIE, M.; HUANG, Y.; SRIVASTAVA, A. K. Core@shell nanomaterials based sensing devices: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 115, p. 147-161, 2019.

KELLY, K. L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L.; SCHATZ, G. C. 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.

KOU, X. S.; NI, W. H.; TSUNG, C. K.; CHAN, K.; LIN, H. Q.; STUCKY, G. D.; WANG, J. F. Growth of gold bipyramids with improved yield and their curvature-directed oxidation. **Small**, v. 3, n. 12, p. 2103-2113, 2007.

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

LANGER, J.; NOVIKOV, S. M.; LIZ-MARZÁN, L. M. Sensing using plasmonic nanostructures and nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 26, n. 32, p. 322001, 2015.

LE RU, E. C.; BLACKIE, E.; MEYER, M.; ETCHEGOIN, P. G. 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. 688 ISBN 0-444-52779-6.

LI, M.; CUSHING, S. K.; WU, N. Q. Plasmon-enhanced optical sensors: a review. **Analyst**, v. 140, n. 2, p. 386-406, 2015.

LI, M.; CUSHING, S. K.; ZHANG, J.; LANKFORD, J.; AGUILAR, Z. P.; MA, D.; WU, N. Shape-dependent surface-enhanced Raman scattering in gold-Raman-probe-silica sandwiched nanoparticles for biocompatible applications. **Nanotechnology**, v. 23, n. 11, p. 115501, 2012.

LIEDBERG, B.; NYLANDER, C.; LUNSTRÖM, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. **Sensors and Actuators**, v. 4, p. 299-304, 1983.

LOMBARDI, J. R.; BIRKE, R. L. The theory of surface-enhanced Raman scattering. **The Journal of Chemical Physics**, v.136, p.144704, 2012.

LOPEZ-SERRANO, A.; OLIVAS, R. M.; LANDALUZE, J. S.; CAMARA, C. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. **Analytical Methods**, v. 6, n. 1, p. 38-56, 2014.

LUAN, J. Y.; LIU, K. K.; TADEPALLI, S.; JIANG, Q. S.; MORRISSEY, J. J.; KHARASCH, E. D.; SINGAMANENI, S. PEGylated Artificial Antibodies: Plasmonic Biosensors with Improved Selectivity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 36, p. 23509-23516, 2016.

MACLAUGHLIN, C. M.; MULLAITHILAGA, N.; YANG, G.; IP, S. Y.; WANG, C.; WALKER, G. C. 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.

MARINAKOS, S. M.; CHEN, S.; CHILKOTI, A. Plasmonic Detection of a Model Analyte in Serum by a Gold Nanorod Sensor. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 14, p. 5278-5283, 2007.

MAYER, K. M.; HAFNER, J. H. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 6, p. 3828-3857, 2011.

MAYER, K. M.; LEE, S.; LIAO, H.; ROSTRO, B. C.; FUENTES, A.; SCULLY, P. T.; NEHL, C. L.; HAFNER, J. H. A Label-Free Immunoassay Based Upon Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanorods. **ACS Nano**, v. 2, n. 4, p. 687-692, 2008.

MCNAMARA, K.; TOFAIL, S. A. M. Nanoparticles in biomedical applications. **Advances in Physics-X**, v. 2, n. 1, p. 54-88, 2017.

MCNAY, G.; EUSTACE, D.; SMITH, W. E.; FAULDS, K.; GRAHAM, D. 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.

MEJÍA-SALAZAR, J. R.; OLIVEIRA, O. N. Plasmonic Biosensing. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 20, p. 10617-10625, 2018.

MIE, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. **Annalen der Physik**, v. 330, n. 3, p. 377-445, 1908.

MONTEIRO, J. P.; FERREIRA, J.; SABAT, R. G.; ROCHON, P.; SANTOS, M. J. L.; GIROTTO, E. M. SPR based biosensor using surface relief grating in transmission mode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 174, n. 0, p. 270-273, 2012.

MONTEIRO, J. P.; PREDABON, S. M.; BONAFÉ, E. G.; MARTINS, A. F.; BROLO, A. G.; RADOVANOVIC, E.; GIROTTO, E. M. SPR platform based on image acquisition for HER2 antigen detection. **Nanotechnology**, v. 28, n. 4, p. 045206, 2016.

MOSKOVITS, M. Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. **The Journal of Chemical Physics**, v. 69, n. 9, p. 4159-4161, 1978.

MURRAY, W. A.; BARNES, W. L. Plasmonic Materials. **Advanced Materials**, v. 19, n. 22, p. 3771-3782, 2007.

NAKAMOTO, K. Theory of Normal Vibrations. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**, p. 1-147, 2008.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. ADSORPTION OF INVERTASE. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 5, p. 1109-1115, 1916.

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.

NIKOBAKHT, 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.

NOBREGA, M. M.; SOUZA, K. S.; ANDRADE, G. F. S.; CAMARGO, P. H. C.; TEMPERINI, M. L. A. Emeraldine Salt Form of Polyaniline as a Probe Molecule for Surface Enhanced Raman Scattering Substrates Excited at 1064 nm. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 35, p. 18199-18205, 2013.

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.

PAI, J.-H.; YANG, C.-T.; HSU, H.-Y.; WEDDING, A. B.; THIERRY, B. Development of a simplified approach for the fabrication of localised surface plasmon resonance sensors based on gold nanorods functionalized using mixed polyethylene glycol layers. **Analytica Chimica Acta**, v. 974, p. 87-92, 2017.

PAN, M.-Y.; LEE, K.-L.; WANG, L.; WEI, P.-K. Chip-based digital surface plasmon resonance sensing platform for ultrasensitive biomolecular detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 580-587, 2017.

PANNEERSELVAM, R.; LIU, G.-K.; WANG, Y.-H.; LIU, J.-Y.; DING, S.-Y.; LI, J.-F.; WU, D.-Y.; TIAN, Z.-Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: bottlenecks and future directions. **Chemical Communications**, v. 54, n. 1, p. 10-25, 2018.

PARK, K.; DRUMMY, L. F.; WADAMS, R. C.; KOERNER, H.; NEPAL, D.; FABRIS, L.; VAIA, R. A. Growth Mechanism of Gold Nanorods. **Chemistry of Materials**, v. 25, n. 4, p. 555-563, 2013.

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.

POLAVARAPU, L.; LIZ-MARZAN, L. M. Towards low-cost flexible substrates for nanoplasmonic sensing. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 15, p. 5288-5300, 2013.

PORTER, M. D.; GRANGER, J. H. Surface-enhanced Raman scattering II: concluding remarks. **Faraday Discussions**, v. 205, n. 0, p. 601-613, 2017.

QIAN, X. M.; PENG, X. H.; ANSARI, D. O.; YIN-GOEN, Q.; CHEN, G. Z.; SHIN, D. M.; YANG, L.; YOUNG, A. N.; WANG, M. D.; NIE, S. M. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 83-90, 2008.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A New Type of Secondary Radiation. **Nature**, v. 121, n. 3048, p. 501-502, 1928.

REGUERA, J.; LANGER, J.; JIMÉNEZ DE ABERASTURI, D.; LIZ-MARZÁN, L. M. Anisotropic metal nanoparticles for surface enhanced Raman scattering. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 13, p. 3866-3885, 2017.

REKHA, C. R.; NAYAR, V. U.; GOPCHANDRAN, K. G. Synthesis of highly stable silver nanorods and their application as SERS substrates. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 3, n. 2, p. 196-205, 2018.

SAHA, K.; AGASTI, S. S.; KIM, C.; LI, X. N.; ROTELLO, V. M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739-2779, 2012.

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

SANTOS, J. F. L.; SANTOS, M. J. L.; THESING, A.; TAVARES, F.; GRIEP, J.; RODRIGUES, M. R. F. LOCALIZED SURFACE PLASMON RESSONANCE APPLIED TO BIOSENSORS AND SOLAR CELLS. **Quimica Nova**, v. 39, n. 9, p. 1098-1111, 2016.

SEPÚLVEDA, B.; ANGELOMÉ, P. C.; LECHUGA, L. M.; LIZ-MARZÁN, L. M. LSPR-based nanobiosensors. **Nano Today**, v. 4, n. 3, p. 244-251, 2009.

SILVA, A. L. C. M. D.; GUTIERRES, M. G.; THESING, A.; LATTUADA, R. M.; FERREIRA, J. SPR biosensors based on gold and silver nanoparticle multilayer films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 928-934, 2014.

SUGUMARAN, S.; JAMLOS, M. F.; AHMAD, M. N.; BELLAN, C. S.; SCHREURS, D. Nanostructured materials with plasmonic nanobiosensors for early cancer detection: A past and future prospect. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 361-373, 2018.

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.

VAN DUYNE, R. P. Laser excitation of raman scattering from adsorbed molecules on electrode surfaces. In: MOORE, C. B. (Ed.). **Chemical and Biochemical Applications of Lasers**: Academic Press, p.101-185, 1979.

VIDOTTI, M.; CARVALHAL, R. F.; MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M.; KUBOTA, L. T. Biosensors based on gold nanostructures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 3-20, 2011.

WANG, Y. Y.; ZHOU, J. H.; LI, J. H. Construction of Plasmonic Nano-Biosensor-Based Devices for Point-of-Care Testing. **Small Methods**, v. 1, n. 11, 2017.

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

XU, J.; ZHANG, Y.-J.; YIN, H.; ZHONG, H.-L.; SU, M.; TIAN, Z.-Q.; LI, J.-F. Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman and Fluorescence Spectroscopies: Synthesis and Applications. **Advanced Optical Materials**, v. 6, n. 4, p. 1701069, 2018.

XU, Y.; BAI, P.; ZHOU, X.; AKIMOV, Y.; PNG, C. E.; ANG, L.-K.; KNOLL, W.; WU, L. Optical Refractive Index Sensors with Plasmonic and Photonic Structures: Promising and Inconvenient Truth. **Advanced Optical Materials**, v. 7, n. 9, p. 1801433, 2019.

ZHAN, C.; CHEN, X.-J.; YI, J.; LI, J.-F.; WU, D.-Y.; TIAN, Z.-Q. From plasmon-enhanced molecular spectroscopy to plasmon-mediated chemical reactions. **Nature Reviews Chemistry**, v. 2, n. 9, p. 216-230, 2018.

ZHANG, C.; YOU, T.; YANG, N.; GAO, Y.; JIANG, L.; YIN, P. Hydrophobic paper-based SERS platform for direct-droplet quantitative determination of melamine. **Food Chemistry**, v. 287, p. 363-368, 2019.

ZONG, C.; XU, M.; XU, L.-J.; WEI, T.; MA, X.; ZHENG, X.-S.; HU, R.; REN, B. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 10, p. 4946-4980, 2018.

APÊNDICE A – Perspectivas futuras

Existem alguns pontos chave para finalização de parte dos resultados e algumas aplicações que podem ser realizadas em trabalho futuro, especificamente:

- Refinar as sínteses de AuNBs e AuNGs variando as concentrações dos reagentes, temperatura e tempo de reação.

- Aplicação dessas nanoestruturas como biossensores SEF e SERS, utilizando as metodologias construídas para os AuNRs.

- Aplicação das três nanoestruturas sintetizadas como biossensores para marcadores específicos de doenças como o IgG utilizando o mesmo procedimento com EDC/NHS.

- Realizar a proteção superficial contra adsorção não-específica com PEG-SH ou quitosana com a finalidade de garantir a seletividade de substratos baseados na metodologia desenvolvida nessa tese.

- Estudo das propriedades plasmônicas das AuNPs através da técnica de perda de energia de elétrons (EELS, do inglês *electron energy loss spectroscopy*) e de cálculos utilizando o método de elemento de fronteira (BEM, do inglês *boundary element method*) usando o MNPBEM toolbox para Matlab poderão permitir entender em termos moleculares a influência da adsorção de proteínas em superfícies plasmônicas.

APÊNDICE B – Espectros de RMN de ^1H para os compostos sintetizados

Figura 54: Espectro de RMN de ^1H para o CTEAB CDCl_3

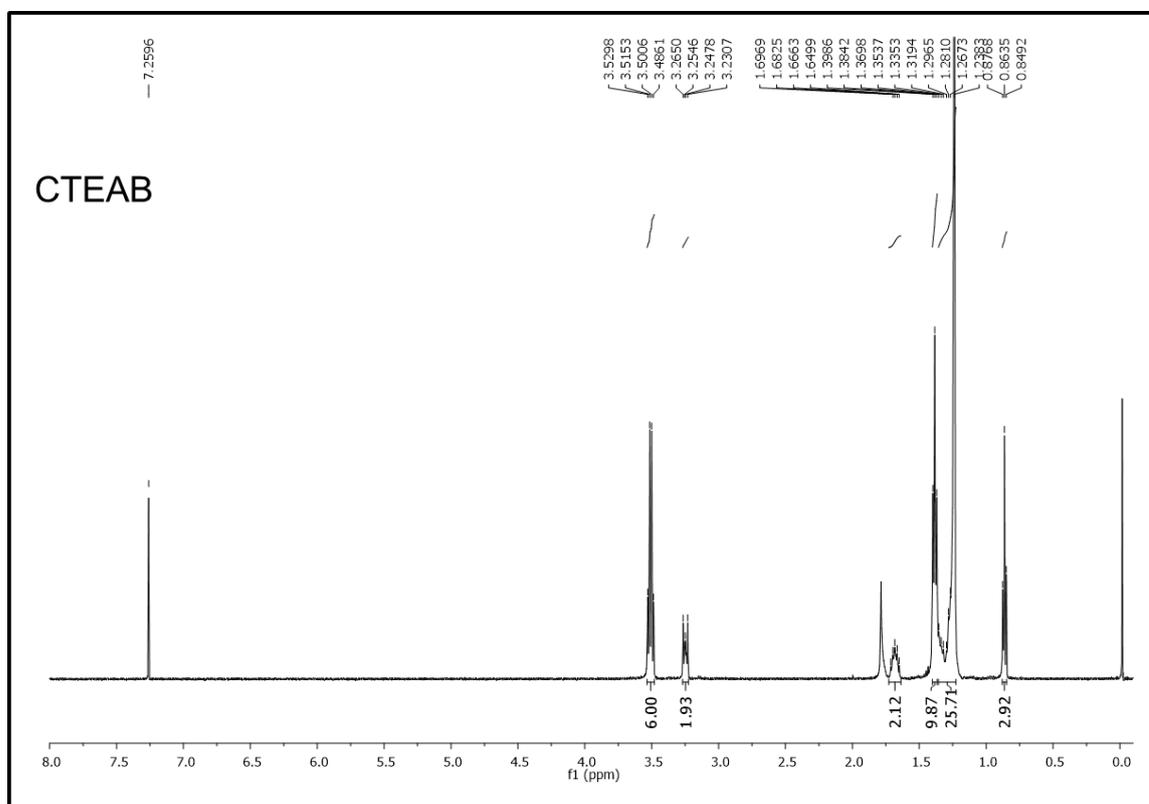


Figura 55: Espectro de RMN de ^1H para o CTPAB CDCl_3

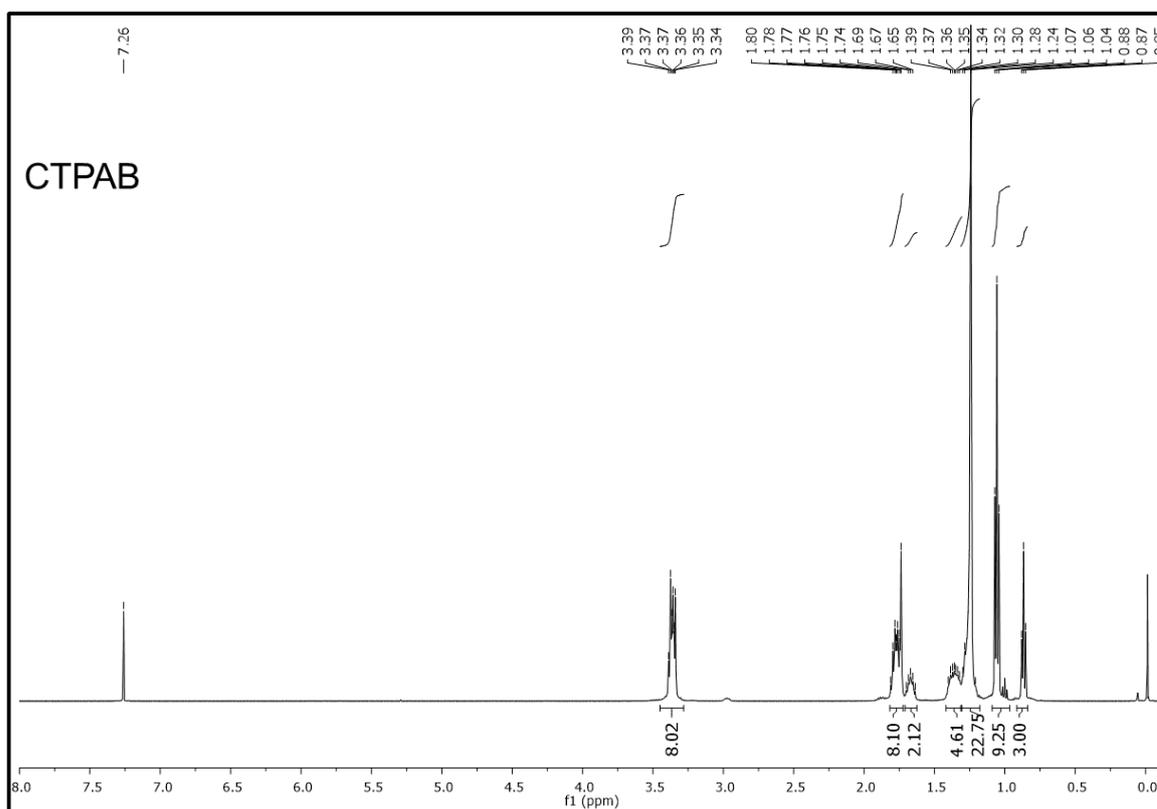
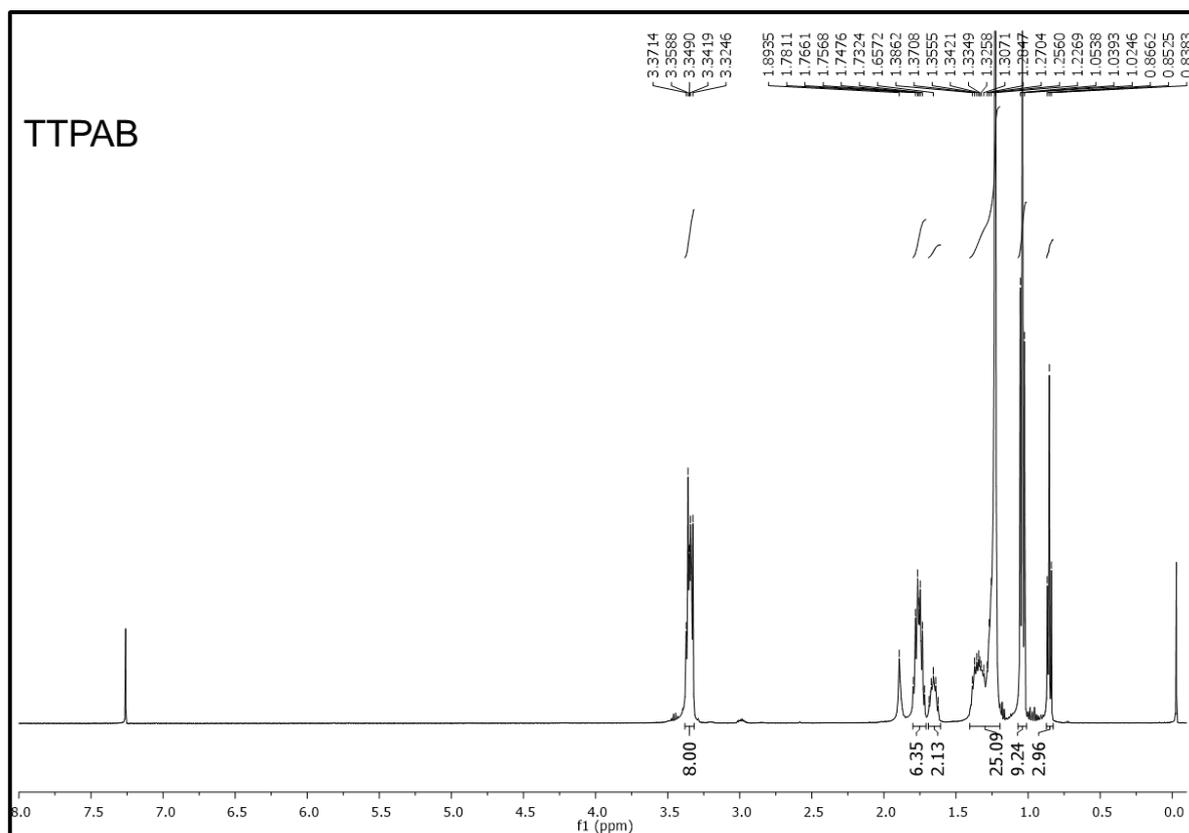


Figura 56: Espectro de RMN de ^1H para o TTPAB CDCl_3 .Figura 57: Espectro de RMN de ^1H para o TTBAB CDCl_3 .