



Wanessa Afonso de Andrade

**Caracterização e Funcionalização de Sílica Xerogel para
Biossensor Plasmônico**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Física pelo Programa de Pós-graduação em Física, do Departamento de Física da PUC-Rio.

Orientadora: Prof.^a Isabel Cristina dos Santos Carvalho
Coorientador: Prof. Alexandre de Resende Camara

Rio de Janeiro,
maio de 2023



Wanessa Afonso de Andrade

Caracterização e Funcionalização de Sílica Xerogel para Biossensor Plasmônico

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Física da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo:

Profª Isabel Cristina dos Santos Carvalho

Orientadora
Departamento de Física - PUC-Rio

Prof. Alexandre de Resende Camara

Coorientador
UERJ

Profª Juliana Fonseca de Lima

UERJ

Profª Paula Medeiros Proença de Gouvêa

Departamento de Engenharia Mecânica - PUC-Rio

Prof Victor Carôzo Gois de Oliveira

Departamento de Física - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 04 de maio de 2023

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Wanessa Afonso de Andrade

Licenciada em Física pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2021.

Ficha Catalográfica

Andrade, Wanessa Afonso de

Caracterização e funcionalização de sílica xerogel para biossensor plasmônico / Wanessa Afonso de Andrade ; orientadora: Isabel Cristina dos Santos Carvalho. – 2023.

68 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física, 2023.

Inclui bibliografia

1. Física – Teses. 2. LSPR. 3. Biossensoriamento. 4. Xerogel. I. Carvalho, Isabel Cristina dos Santos. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. III. Título.

CDD: 530

Agradecimentos

Muito obrigada, mãe, por todo o apoio em toda a trajetória de vida.

Muito obrigada, Leone, pelo companheirismo e pelo cuidado.

Muito obrigada, Zoe, por ser a melhor “filha pet” e apoio emocional em tempos tão desafiadores.

Muito obrigada Patrícia, minha psicóloga, pois sem seu apoio eu não estaria mais aqui agora.

Muito obrigada, Prof^a Isabel, pela orientação, pela compreensão e pelo acolhimento no LOpEL.

Muito obrigada, Prof. Alexandre, pela coorientação, pelo apoio e suporte durante o percurso.

Muito obrigada, Fredy, por além de técnico ser um ótimo amigo.

Muito obrigada Lívio, Caíque, João, Anupama, Thaís, Lanna, Arthur, Aline e Juan por todos os cafés, rolês e risadas no bandejão.

Muito obrigada, Gleice, por ser uma amiga para além do LOpEL, pelos cafés, rolês, trocas de memes e desabafos.

Muito obrigada, Yan e Leonardo, por todas as vezes que me auxiliaram no laboratório, me indicaram bibliografias, fizeram piadas durante o trabalho e pelos salgados consumidos.

Muito obrigada, Mariana, por todos os estudos via WhatsApp e pela ajuda nas disciplinas.

Muito obrigada, Débora, pelas conversas sobre a vida na copa.

Muito obrigada Julinho, Márcia, Laís, Giza e Eduardo, pelo suporte burocrático.

Muito obrigada Juliana, minha querida amiga de infância, por todos os dias em que a exaustão mental batia e fazíamos nossos “rolês de descanso”.

Muito obrigada Haiashi, Nathalia e Christian, pelas discussões sobre o cotidiano e as caminhadas e cafés aleatórios.

Muito obrigada a meus companheiros do Coletivo Martha Trindade, Aline, Flávio e Jamilly, por todas as trocas e por me inspirarem sempre na luta por justiça em todos os espaços que ocupo.

Muito obrigada ao Prof. Marcelo Neves que, desde a graduação, me deu suporte nessa caminhada.

Muito obrigada ao Prof. Edison Pecoraro pela colaboração e pela ajuda em todo o trabalho.

Muito obrigada CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Andrade, Wanessa Afonso de, Isabel Cristina dos Santos Carvalho (orientadora) e Alexandre de Resende Camara (coorientador) **Caracterização e Funcionalização de Sílica Xerogel para Biossensor Plasmônico**. Rio de Janeiro, 2023. 68p. Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Investigamos as propriedades ópticas de sistemas compostos por nanoilhas de ouro (Au) funcionalizadas com biotina, na superfície de monolitos de xerogéis de sílica (SiO₂), visando desenvolver uma plataforma para biossensores baseados na Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR), devido à sua elevada sensibilidade a alterações no ambiente químico próximo. Os xerogéis foram sintetizados por meio de um processo de sol-gel de catálise em duas etapas. Uma solução de água deionizada, etanol e tetraetil ortossilicato foi misturada sob agitação magnética a frio, com uma proporção molar de 8,5:3,5:1, e soluções de ácido clorídrico e hidróxido de amônio foram utilizadas como catalisadores para hidrólise e condensação, respectivamente, em moldes de polipropileno. Os géis foram envelhecidos nos moldes e convertidos em xerogéis por secagem a 600°C em um forno. Foi depositado um filme de Au de 20 nm na superfície dos xerogéis por *sputtering*. Em seguida, os xerogéis de sílica com filme de ouro (Au@SiO₂) foram submetidos a um tratamento térmico em forno elétrico, para criar as nanoilhas de Au. Observou-se uma mudança de coloração, de azul para rosa, característica das AuNPs. Em seguida, os sistemas AuNP@SiO₂ xerogéis foram funcionalizados em dois passos consecutivos com cisteamina (CA) e N-hidroxissuccinimidobiotina (NHSB) para a detecção de avidina em meio aquoso. O par biotina-avidina é um sistema amplamente conhecido para testar biossensores, devido à sua alta especificidade e sensibilidade muito baixa. O processo de funcionalização foi monitorado por absorvância óptica UV-vis para cada passo. Soluções aquosas com concentrações de avidina (10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M e 10⁻¹⁰ M) foram utilizadas para testar a detecção e a sensibilidade. Observou-se um deslocamento médio de 52 nm na absorvância de todas as concentrações testadas, indicando que este sistema é promissor para aplicações em biossensores plasmônicos.

Palavras-chave

LSPR, biossensoriamento, xerogel

Abstract

Andrade, Wanessa Afonso de, Isabel Cristina dos Santos Carvalho (advisor) e Alexandre de Resende Camara (co-advisor) **Characterization and Functionalization of Silica Xerogel for Plasmonic Biosensor**. Rio de Janeiro, 2023. 68p. Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

In this study, the optical properties of systems composed of biotin-functionalized gold nanoislands on the surface of silica xerogel monoliths (SiO₂) were investigated, aiming to develop an inorganic and inert solid platform for biosensors based on Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) due to their high sensitivity to changes in the nearby chemical environment. The silica xerogels were synthesized through a two-step catalytic sol-gel process, where a solution of deionized water, ethanol, and tetraethyl orthosilicate was mixed under cold magnetic stirring, with a molar ratio of 8.5:3.5:1, and solutions of hydrochloric acid and ammonium hydroxide were used as catalysts for hydrolysis and condensation, respectively, in polypropylene molds. Later, the gels were aged in molds and converted to xerogels by drying at 600°C in an oven. To create the gold nanoislands, a thin film of 20 nm Au was deposited on one of the top surfaces of the xerogels by sputtering, and then the Au@SiO₂ xerogels were subjected to heat treatment in an electric furnace. A color change of the samples from blue to pink was observed, characteristic of gold nanoparticles. Then, the AuNP@SiO₂ xerogel systems were functionalized in two consecutive steps with cysteamine (CA) and N-hydroxysuccinimide-biotin (NHSB) for the detection of avidin in an aqueous solution. The biotin-avidin pair is a well-known system for testing biosensors, due to its high specificity and very low sensitivity. The functionalization process was monitored by UV-Vis optical absorbance for each step. Aqueous solutions with concentrations of avidin (10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M and 10⁻¹⁰ M) were used to test detection and sensitivity. An average shift of 52 nm was observed in the absorbance spectrum of all tested concentrations, indicating that this system is a promising structure for plasmonic biosensor applications.

Keywords

LSPR, biosensing, xerogel

Sumário

1	Introdução	14
2	Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR)	18
2.1	Biossensoriamento LSPR	18
2.2	Teoria LSPR	22
3	Materiais e Métodos	27
3.1	Síntese do Xerogel	27
3.2	Síntese de Nanopartículas de Ouro (AuNPs)	29
3.3	MEV	32
3.3.1	Caracterização morfológica das amostras por MEV	32
3.4	Funcionalização	34
3.5	Espectroscopia	36
3.5.1	Espectrofotômetro USB 4000 (Ocean Optics, EUA)	36
3.5.2	Espectrofotômetro Lambda 950 (Perkin Elmer, EUA)	37
4	Resultados e Discussões	38
4.1	Caracterização das AuNPs sobre xerogel de sílica	38
4.1.1	Espectroscopia de Absorção	38
4.1.1.1	Caracterização da síntese das AuNPs do primeiro conjunto de amostras – 1 a 16	39
4.1.1.2	Caracterização da síntese das AuNPs do segundo conjunto de amostras – 17 a 42	41
4.2	Caracterização da funcionalização	43
4.2.1	Caracterização da funcionalização do primeiro conjunto de amostras – 1 a 16	43
4.2.1.1	Absorção das amostras 1 a 5 – Cisteamina (CA)	44

4.2.1.2 Absorção das amostras 6 a 10 – Cisteamina e Biotina (CA+NHSB)	45
4.2.1.3 Absorção das amostras 11 a 16 – Cisteamina, Biotina e Avidina (CA+NHSB+AV)	47
4.2.2 Caracterização da funcionalização do segundo conjunto de amostras – 17 a 42	48
5 Conclusões e Perspectivas Futuras	59
6 Referências Bibliográficas	61
8 Anexo I	66

Lista de Figuras

FIGURA 1-1 FORMAÇÃO DO AEROGEL (À ESQUERDA) E DO XEROGEL (À DIREITA). (ADAPTADO DE: LANDAU, 2008)	16
FIGURA 2-1 A) NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE OURO E PRATA, COM DIFERENTES TAMANHOS E GEOMETRIAS E CORES DAS SOLUÇÕES; B) ESPECTRO DE EXTINÇÃO DE CADA SOLUÇÃO APRESENTADA (HAES E VAN DUYNÉ, 2004).....	21
FIGURA 2-2 ESQUEMA ILUSTRATIVO LSPR (ADAPTADA DE HAES, VAN DUYNÉ, 2004)	23
FIGURA 2-3 ESFERA HOMOGÊNEA EM UM CAMPO ELETROSTÁTICO (JACKSON, 1999)	24
FIGURA 3-1 TRATAMENTO TÉRMICO - FORNO BRASIMET K150	28
FIGURA 3-2 AMOSTRAS APÓS O TRATAMENTO: XEROGÉIS COM COLORAÇÃO BRANCA AZULADA	28
FIGURA 3-3 DENTON VACUUM DESK V – EQUIPAMENTO PARA <i>SPUTTERING</i> DO FILME DE AU.	29
FIGURA 3-4 XEROGÉIS APÓS A DEPOSIÇÃO DE AU FEITA ATRAVÉS DO PROCESSO DE <i>SPUTTERING</i>	30
FIGURA 3-5 AMOSTRAS NO FORNO A) PRIMEIRO FORNO - TRATAMENTO ATÉ 250°C B) SEGUNDO FORNO - TRATAMENTO TÉRMICO A 600°C – BRASIMET K150	31
FIGURA 3-6 XEROGÉIS APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO PARA A CRIAÇÃO DAS AUNPs	31
FIGURA 3-7 XEROGÉIS NO EQUIPAMENTO DESK V FIXADOS COM FITA DE CARBONO	32
FIGURA 3-8 IMAGENS DA SUPERFÍCIE DO SISTEMA AUNPs@SiO ₂ . NANOILHAS DE AU PODEM SER VISUALIZADAS ATRAVÉS DE IMAGENS DO MEV EM UMA ESCALA DE (A) 1 μm E (B) 2 μm.....	33
FIGURA 3-9 EDS - COMPOSIÇÃO DO SISTEMA AUNPs@SiO ₂	33
FIGURA 3-10 COMPOSIÇÃO DO SISTEMA AUNPs@SiO ₂ . A PARTE COLORIDA INDICA A PRESENÇA DO ELEMENTO E A PARTE PRETA INDICA A AUSÊNCIA DO ELEMENTO.	34

FIGURA 3-11 TABELA DE COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE 1 A 16. AMOSTRAS DE 1 A 5 CONTENDO CISTEAMINA (CA), AMOSTRAS DE 6 A 10 CONTENDO CISTEAMINA E BIOTINA (NHSB) E AMOSTRAS DE 11 A 16 CONTENDO CISTEAMINA, BIOTINA E AVIDINA (AV). CORTESIA: DR. EDISON PECORARO.....	35
FIGURA 3-12 MONTAGEM PARA MEDIDA DA ABSORBÂNCIA. CORTESIA: YAN MACHADO.....	36
FIGURA 3-13 PERKIN ELMER LAMBDA 950	37
FIGURA 4-1 ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DO XEROGEL APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO, SEM DEPOSIÇÃO DE AU	38
FIGURA 4-2 AMOSTRAS DE 1 A 7 - AUNPs@SiO ₂	39
FIGURA 4-3 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DAS AMOSTRAS DE 1 A 7	40
FIGURA 4-4 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA AMOSTRA 6 COM AUNPs	41
FIGURA 4-5 MÉDIA DA ABSORBÂNCIA DE 8 AMOSTRAS COM AUNPs.....	42
FIGURA 4-6 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA SOLUÇÃO COM AUNPs ESFÉRICAS..	42
FIGURA 4-7 ESPECTRO DE ABSORÇÃO PRÉ FUNCIONALIZAÇÃO (VERMELHO) E PÓS FUNCIONALIZAÇÃO (PRETO) PARA A) AMOSTRA 1, B) AMOSTRA 2, C) AMOSTRA 3, D) AMOSTRA 4 E E) AMOSTRA 5.....	44
FIGURA 4-8 ESPECTRO DE ABSORÇÃO PRÉ FUNCIONALIZAÇÃO (VERMELHO) E PÓS FUNCIONALIZAÇÃO (PRETO) PARA A) AMOSTRA 6, B) AMOSTRA 7, C) AMOSTRA 8, D) AMOSTRA 9 E E) AMOSTRA 10.....	46
FIGURA 4-9 ESPECTRO DE ABSORÇÃO PRÉ FUNCIONALIZAÇÃO (VERMELHO) E PÓS FUNCIONALIZAÇÃO (PRETO) PARA A) AMOSTRA 11, B) AMOSTRA 12, C) AMOSTRA 13, D) AMOSTRA 15 E E) AMOSTRA 16	47
FIGURA 4-10 ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DAS AMOSTRAS 19, 20 E 21, FUNCIONALIZADAS COM CONCENTRAÇÃO DE AVIDINA DE 10 ⁻⁷ M.	49
FIGURA 4-11 ESPECTRO DE REFLETÂNCIA DIFUSA EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DA AMOSTRA 19 (CURVA PRETA). A CURVA VERMELHA É RELACIONADA AO SMOOTH DO SOFTWARE ORIGIN.	50
FIGURA 4-12 ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DAS AMOSTRAS 24, 25 E 26, FUNCIONALIZADAS COM CONCENTRAÇÃO DE AVIDINA DE 10 ⁻⁸ M.	51

FIGURA 4-13 ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DAS AMOSTRAS 32, 33 E 36, FUNCIONALIZADAS COM CONCENTRAÇÃO DE AVIDINA DE 10^{-9} M.	52
FIGURA 4-14 ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DAS AMOSTRAS 40, 41 E 42, FUNCIONALIZADAS COM CONCENTRAÇÃO DE AVIDINA DE 10^{-10} M.	53
FIGURA 4-15 ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DAS AMOSTRAS 15 (CURVA AZUL) E 19 (CURVA VERMELHA) COM FUNCIONALIZAÇÃO CA+NHSB+AV E DO SISTEMA AUNPs@SiO ₂ (CURVA PRETA)	54
FIGURA 4-16 ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DAS AMOSTRAS 9 (CURVA LARANJA) E 24 (CURVA AZUL) E DO SISTEMA AUNPs@SiO ₂ (CURVA PRETA)	55
FIGURA 4-17 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NORMALIZADA EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DAS AMOSTRAS 7 (CURVA LARANJA) E 24 (CURVA VERMELHA)	56
FIGURA 4-18 ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DAS AMOSTRAS 8 (CURVA LARANJA) E 24 (CURVA VERMELHA)	57
FIGURA 4-19 ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DAS AMOSTRAS 9 (CURVA LARANJA) E 24 (CURVA VERMELHA)	57

“Sorte é o que acontece quando a preparação encontra a oportunidade.”

Sêneca

1 Introdução

Os biossensores plasmônicos são dispositivos capazes de detectar a presença de um analito em um meio, seja através de interações físico-químicas ou reações químicas específicas utilizando nanopartículas metálicas como transdutores ópticos, que são capazes de detectar, por exemplo, vírus e bactérias[1]. Nos dias atuais, são amplamente utilizados em diversas áreas, incluindo diagnóstico médico [1], controle de qualidade [2], detecção ambiental [3] e monitoramento de processos industriais [4].

Em trabalhos anteriores realizados pelo Laboratório de Optoeletrônica da PUC-Rio, coordenado pela Professora Dra. Isabel Carvalho, e pelo Prof. Dr. Edison Pecoraro do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, estudaram-se previamente as propriedades dos aerogéis e dos xerogéis para biossensoriamento plasmônico. Entretanto, os aerogéis demonstraram desvantagens em relação à sensibilidade e tamanho das nanopartículas, optando-se posteriormente pelo xerogel como base mais adequada para biossensoriamento.

De 2018 a 2022, através do Projeto Universal – CNPq, coordenado pela Prof^a Isabel Carvalho, intitulado “Dispositivos Plasmônicos em Nanobio-sensor e Nanofotônica”, foi proposta uma plataforma óptica que utilizaria os princípios de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR) e reflexão especular para a detecção de patógenos em meio aquoso. Essa plataforma agregaria fibras ópticas ocas com aerogel (ou xerogel) em seu interior e um optodo (xerogel ou aerogel) de Au@SiO₂. Em 2019 foi realizado um estudo sobre rugosidade através de simulações no COMSOL Multiphysics, que indicou que os xerogéis seriam mais adequados para o sensoriamento na plataforma. Em 2020 foi realizada a síntese dos xerogéis utilizados nesse trabalho. Em 2021, foram realizadas a síntese e a caracterização das nanopartículas de ouro no xerogel, a funcionalização dos xerogéis com um sistema conhecido (cisteamina e biotina para detecção de avidina) e a caracterização da funcionalização. Em 2022, foi realizada uma nova etapa de

funcionalização para detecção de diferentes concentrações de avidina e a caracterização dessa funcionalização.

O xerogel é, de acordo com a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), “uma rede aberta formada pela remoção de todos os agentes de intumescimento de um gel” [5]. No caso do xerogel utilizado nesse trabalho, o processo de envelhecimento ocorre em temperatura e pressão ambientes e ele é feito por um processo sol-gel de duas etapas.

O processo sol-gel é utilizado para sintetizar sólidos orgânicos, híbridos ou puramente inorgânicos, com formas variadas como filmes finos ou espessos, pós particulados, monólitos ou a combinação deles, a partir de reagentes em fase líquida e em condições brandas de pressão e temperatura. Essa técnica apresenta diversas vantagens, como: o controle da estrutura; tamanho e forma das partículas coloidais; bem como a possibilidade de incorporação de diferentes dopantes e funcionalidades nos materiais resultantes. Devido a essas propriedades, o processo sol-gel é amplamente utilizado em diversas aplicações, incluindo a produção de revestimentos [6], materiais ópticos e eletrônicos [7], catalisadores [8] e biomateriais [9]. Esse processo foi utilizado na obtenção dos xerogéis de SiO₂ utilizados nesse estudo e ele corresponde à conversão de um sistema coloidal de partículas em fase líquida (uma suspensão coloidal - sol), em um gel sólido. A conversão ocorre pelo crescimento dessas partículas, e pela formação de uma rede tridimensional (no presente estudo, de SiO₂) a partir de reações de condensação-polimerização entre grupos silanois (-Si-OH), presentes majoritariamente na superfície dessas partículas. Tais géis possuem uma estrutura porosa 3D, que retém a fase líquida em seu interior. Essa fase pode ser removida por técnicas que envolvam ou não evaporação. Se a técnica utilizada for evaporação da fase via aquecimento convencional, o sólido resultante é chamado de xerogel. Se envolver sua extração supercrítica, o sólido resultante é chamado aerogel. Se for realizada via liofilização, o mesmo será descrito como liogel. A estrutura sólida 3D evolui durante os processos de remoção da fase líquida, resultando em sólidos com microestrutura, porosidade e área superficial diferentes. Uma ilustração dessa evolução é apresentada na Figura 1-1. No presente estudo, considera-se que essas diferentes características de superfície e de microestrutura podem influenciar no desempenho do biossensor, e serão discutidas posteriormente a partir dos resultados obtidos.

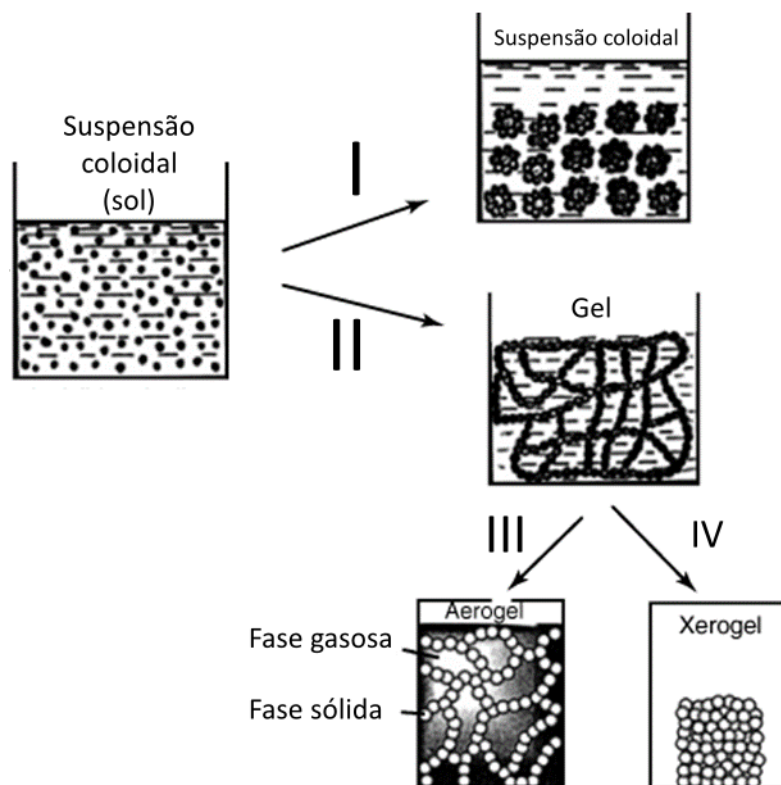


Figura 1-1 Formação do aerogel (à esquerda) e do xerogel (à direita). (Adaptado de: LANDAU, 2008)

Neste projeto foram estudadas as propriedades ópticas de sistemas compostos por xerogéis de sílica (SiO_2) com nanopartículas de ouro (AuNPs) formadas na superfície que, posteriormente, foram funcionalizadas com cisteamina, N-hidroxissuccinimidabiotina e avidina aviária na primeira rodada de funcionalização e com avidina aviária em diferentes concentrações na segunda rodada de funcionalização. O objetivo foi, utilizando-se um sistema padrão ouro, verificar se o xerogel de sílica seria um bom substrato para biossensoriamento LSPR. O presente trabalho é composto por sete capítulos. O Capítulo 1, intitulado "Introdução", apresenta a motivação para o desenvolvimento deste estudo. No Capítulo 2, "Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR)", é apresentado o conceito do efeito de LSPR (Localized Surface Plasmon Resonance) e é apresentada uma visão geral da tecnologia de biossensoriamento atual. No Capítulo 3, "Materiais e Métodos", são descritos os materiais utilizados neste estudo, incluindo a síntese do xerogel de SiO_2 , a síntese das AuNPs, a caracterização morfológica e o processo de funcionalização. O Capítulo 4, "Resultados e Discussões", apresenta as caracterizações ópticas e os resultados

obtidos por meio das medidas de espectrometria óptica. No Capítulo 5, "Conclusões e Perspectivas futuras", são abordadas as possibilidades de continuidade deste estudo. O Capítulo 6, "Referências", traz as fontes bibliográficas utilizadas neste trabalho. Por fim, o Capítulo 7, "Anexo", traz as informações sobre as amostras utilizadas no trabalho.

2

Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR)

2.1 Biossensoriamento LSPR

Os biossensores consistem em uma configuração de dispositivo que integra um transdutor e um analito. O transdutor é o componente responsável pela geração do sinal que possibilita a medição. O analito, por sua vez, é conceituado como uma entidade química ou biológica que é alvo de interesse em um dado sistema. Dentre as possíveis formas de analitos encontram-se proteínas, materiais genéticos, vírus, bactérias ou anticorpos. O emprego de biossensores visa possibilitar a detecção e quantificação da presença de um analito em um determinado meio. O presente estudo tem como objetivo discutir o emprego da técnica de biossensoriamento LSPR na detecção da avidina aviária. A avidina aviária foi escolhida por ser uma glicoproteína tetramérica que possui muita afinidade com a biotina que, junto com a cisteamina, foi escolhida como funcionalização para testarmos o substrato de xerogel de sílica.

Um exemplo atual de aplicação de biossensor é o teste *swab* para a detecção do vírus da Covid-19. Esses testes utilizam técnicas de biossensoriamento para identificar a presença do material genético do vírus em amostras coletadas do nariz ou da garganta [10].

Na pesquisa de biossensores, o substrato é a parte na qual o elemento biológico se fixa e interage, podendo ser fabricado com materiais como sílica, ouro ou platina, e contendo anticorpos ou antígenos fixados. Antígenos são partículas de vírus ou bactérias que ativam o sistema imunológico. O transdutor é a parte que detecta os sinais físicos e/ou químicos liberados da reação, tais como variação de massa, transferência de calor ou elétrons. O detector é o dispositivo que amplifica e analisa os sinais obtidos do transdutor. Biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de analito a ser identificado ou de acordo com seu

funcionamento, como eletroquímicos [11-12], ópticos, piezoelétricos [12], entre outros. Biossensores ópticos [13] são baseados nas modificações das propriedades da luz, tais como mudanças de absorção, comprimento de onda, índice de refração, fluorescência, entre outros.

Existem diversos tipos de biossensores baseados em Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR). Alguns dos tipos mais comuns incluem biossensores LSPR baseados em filmes finos de metal [14], nanopartículas [1], nanocristais [15] e nanotubos [16].

Biossensores baseados em LSPR são dispositivos que se baseiam na interação da luz com as nanopartículas metálicas que estão em sua superfície. Quando a nanopartícula se liga a moléculas biológicas, essa interação muda, fazendo com que o comprimento de onda LSPR (λ_{LSPR}) se desloque, podendo sofrer um *blueshift* (deslocamento de banda para o azul) ou um *redshift* (deslocamento de banda para o vermelho).

Esse deslocamento (*blueshift* ou *redshift*) pode ser medido e utilizado para detecção de uma determinada molécula biológica que é o alvo do estudo. Para isso, as nanopartículas metálicas são funcionalizadas com proteínas ou anticorpos específicos que se liguem à molécula que será estudada.

A escolha do tipo de biossensor LSPR depende das propriedades do material e da aplicação específica. Por exemplo, os biossensores baseados em filmes finos de metal são comumente usados para aplicações em biomedicina [17-18], enquanto os biossensores baseados em nanotubos são adequados para aplicações em biossensores eletroquímicos [19]. Biossensores utilizando SiO_2 possuem baixo custo de produção, fácil reprodutibilidade e alta compatibilidade com compostos biológicos [20]. A seleção do xerogel para a criação do sistema nanopartículas de ouro em substratos de sílica xerogel ($AuNPs@SiO_2$) foi baseada em estudos preliminares realizados no Laboratório de Optoeletrônica do Departamento de Física - PUC-Rio, sob coordenação da Professora Isabel Carvalho [21]. A resposta do sistema $AuNPs@SiO_2$ utilizando substrato aerogel e xerogel foi investigada e verificaram que o xerogel apresentou uma melhor resposta na deposição do filme de Au no desenvolvimento do sistema $AuNPs@SiO_2$, sendo empregado no proposto trabalho. O xerogel é quimicamente inerte em condições fisiológicas e estável.

A investigação de biossensores baseados em LSPR envolve o desenvolvimento contínuo de novos materiais e técnicas para melhorar a sensibilidade, seletividade e estabilidade dos dispositivos. Um avanço significativo nessa área tem sido o uso de nanopartículas metálicas com formatos e tamanhos controlados [22], o que aumenta a sensibilidade e a seletividade do sensor. As nanopartículas metálicas são capazes de produzir um espectro de absorção de luz característico que muda em resposta a mudanças na densidade de carga na superfície da partícula, permitindo a detecção de moléculas específicas [23].

Outro avanço recente na área de biossensores LSPR é o uso de técnicas de engenharia de proteínas para melhorar a seletividade do sensor [24]. Proteínas com alta afinidade para um alvo específico podem ser imobilizadas na superfície das nanopartículas metálicas, permitindo a detecção seletiva de moléculas-alvo. Uma das principais vantagens da metodologia que utiliza a engenharia de proteínas para melhorar a seletividade de biossensores LSPR é a capacidade de alcançar maior seletividade e especificidade na detecção de moléculas-alvo, além de poder ser aplicada a uma ampla gama de biomarcadores. Apesar disso, a metodologia apresenta algumas limitações, uma vez que o processo de engenharia de proteínas pode ser complexo e dispendioso, e há possíveis problemas com a estabilidade e atividade da proteína imobilizada na superfície das nanopartículas. Contudo, essa abordagem pode ser restrita a alvos para os quais existam proteínas com alta afinidade disponíveis.

A mudança espectral LSPR foi adotada como uma estratégia de transdução para investigar a interação de ligação de uma variedade de moléculas biológicas e patogênicas, em uma abordagem fora de sua aplicação original [25,26]. A transmissão refere-se à fração de energia luminosa que atravessa a espessura de um material sem ser absorvida, ou seja, a capacidade de transmitir luz, enquanto a absorvância indica a energia luminosa absorvida pelo material. Devido à dependência do efeito LSPR em relação ao tamanho e formato das nanopartículas, é possível detectar o comprimento de onda LSPR em diferentes regiões do espectro visível para partículas com diferentes formatos e tamanhos. No trabalho de HAES e VAN DUYNÉ (2004), foram estudadas várias soluções de nanopartículas de ouro e prata de diferentes tamanhos e geometrias. Foi observado que a cor observada na solução está diretamente ligada com os formatos e tamanhos das nanopartículas metálicas, como exemplificado na figura abaixo [Fig.2-1].

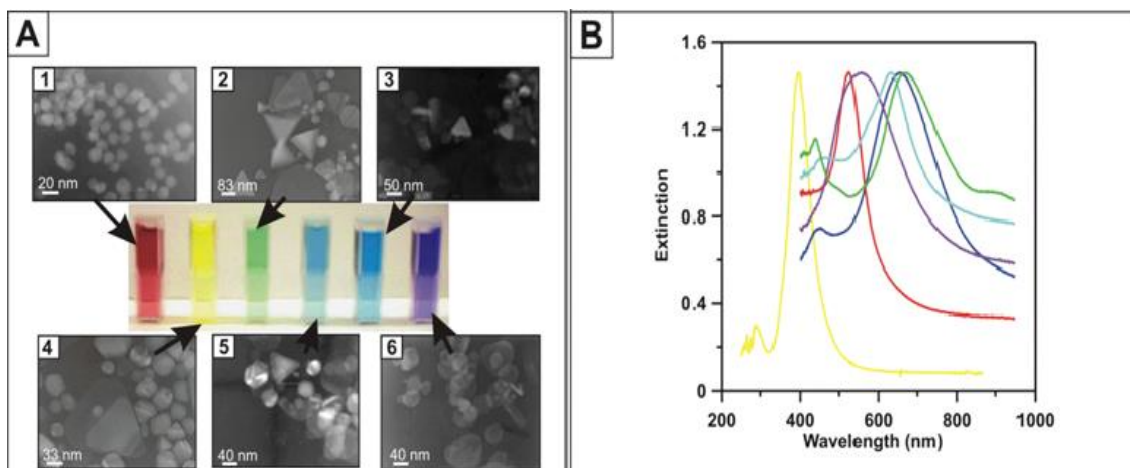


Figura 2-1 a) Nanopartículas metálicas de ouro e prata, com diferentes tamanhos e geometrias e cores das soluções; b) espectro de extinção de AuNPs esféricas e AgNPs de diversas geometrias e tamanhos para cada solução apresentada (HAES e VAN DUYNNE, 2004)

Metais nobres apresentam Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada no visível. Para NPs de ouro e prata, a Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada não poderia ser diferente. A partir disso, no trabalho eles mostram que:

- 1) A solução vermelha corresponde a nanopartículas esféricas de Au de aproximadamente 13 nm de diâmetro.
- 2) A solução verde é inhomogênea e mistura nanopartículas esféricas, prismas triangulares, etc, de prata, com diâmetros variados.
- 3) A solução azul escura também é inhomogênea, com nanopartículas de prata com tamanhos variados, mas não possui nanopartículas esféricas.
- 4) A solução amarela também é inhomogênea, com nanopartículas de prata com diâmetros menores, porém ainda variados.
- 5) A solução azul clara possui nanopartículas de prata com diâmetros variados, mas menores que a solução azul escura.
- 6) A solução roxa também é inhomogênea, mas possui nanopartículas de prata de formato mais oblongo.

Esse trabalho, além de diversos outros [27] nos indica que, para um melhor aproveitamento de um biossensor LSPR, tanto o meio onde estão as nanopartículas quanto o seu tamanho, geometria e material devem ser considerados. Essa relação será mostrada na seção 2.2.

ASTRUC e WANG, 2014, afirmam que nanopartículas esféricas de cobre, prata e ouro em meio aquoso mostram uma absorção forte no visível, que seria referente a 580 nm , 400 nm e 530 nm aproximadamente. Apesar disso, cobre e prata sofrem oxidação mais rapidamente. Isso faz com que o ouro seja uma escolha mais assertiva para sistemas na presença de oxigênio.

Além disso, o desenvolvimento de novos materiais para a fabricação de substratos LSPR, como materiais porosos (como é o caso desse trabalho e de (DA ROCHA, 2005) [8]), multicamadas e polímeros funcionalizados, tem permitido a detecção de moléculas em concentrações cada vez mais baixas e em diferentes tipos de amostras biológicas [28].

Sabe-se que os biossensores LSPR possuem o potencial de revolucionar a detecção de biomoléculas em diversas áreas, incluindo diagnóstico médico [1], monitoramento ambiental [3] e segurança alimentar [2]. É necessária, então, a compreensão da teoria associada à Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada.

2.2 Teoria LSPR

A Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR) é um fenômeno óptico que ocorre quando a luz incide sobre nanopartículas metálicas muito menores que o comprimento de onda incidente. Esse efeito é observado desde o século 4 d.C. através da transmissão da luz, tendo como exemplo a Taça de Lycurgus (BARBER, 1990). Essa taça, feita com nanopartículas de ouro e prata de aproximadamente 50 nm , refletia a luz na região do verde e transmitia a luz na região do vermelho.

A interação da luz com os elétrons livres da superfície causa uma oscilação coletiva dessa nuvem de elétrons, que são chamadas de plasmons [Fig. 2-2]. Como essas oscilações podem sofrer alterações com alguma mudança no meio ao redor dessas nanopartículas, a resposta espectral da LSPR é dependente do meio externo sendo muito utilizado para sensoriamento. O deslocamento da banda de absorção de LSPR sofre influência também devido às propriedades das nanopartículas, como tamanho, geometria e material (PETRAYEVA, 2011).

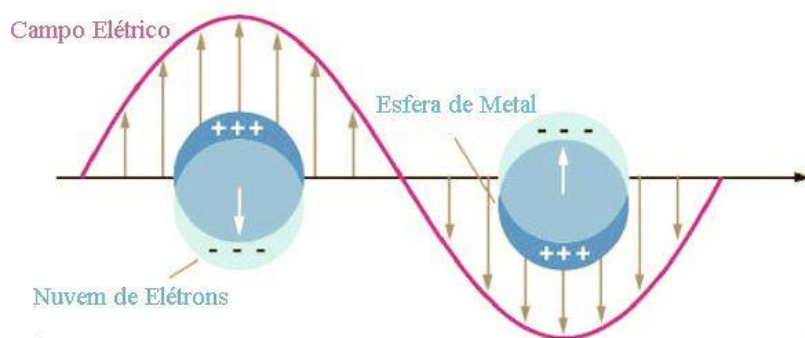


Figura 2-2 Esquema ilustrativo LSPR (Adaptada de Haes, Van Duyne, 2004)

Para compreender o efeito LSPR, é possível partir da aproximação quasi estática para uma partícula de diâmetro muito menor que o comprimento de onda da luz incidente (CAMARA, 2010). Nessa aproximação, pode-se considerar que a fase do campo eletromagnético é aproximadamente constante, e, assim, analisar o problema de uma partícula num campo eletrostático (MAIER, 2007).

Consideremos uma esfera de raio a [Fig. 2-3] que é homogênea, isotrópica e está localizada na origem de um campo eletrostático dado $\mathbf{E} = E_0 \hat{z}$. O meio em que a esfera está inserida é isotrópico e possui constante dielétrica ϵ_m . As linhas de campo são paralelas ao eixo z . A resposta dielétrica da esfera é dada por $\epsilon(\omega)$, onde $\epsilon(\omega)$ é dado pelo modelo de Drude-Lorentz.

O modelo de Drude-Lorentz é uma teoria clássica da óptica que descreve a resposta óptica de um material dielétrico quando submetido a um campo elétrico de altas e baixas frequências. Essa teoria considera que os elétrons livres em um material podem ser tratados como osciladores harmônicos fracos, que são influenciados por um campo elétrico externo e por forças de amortecimento, tais como colisões com íons no material. De acordo com o modelo, a resposta óptica de um material dielétrico pode ser descrita por meio de uma função dielétrica complexa, a qual leva em consideração a frequência da luz incidente, a densidade de elétrons do material e os parâmetros de amortecimento que afetam a resposta dos elétrons do material. Essa função dielétrica complexa é usada para descrever propriedades ópticas do material, como o índice de refração, absorção e dispersão [29].

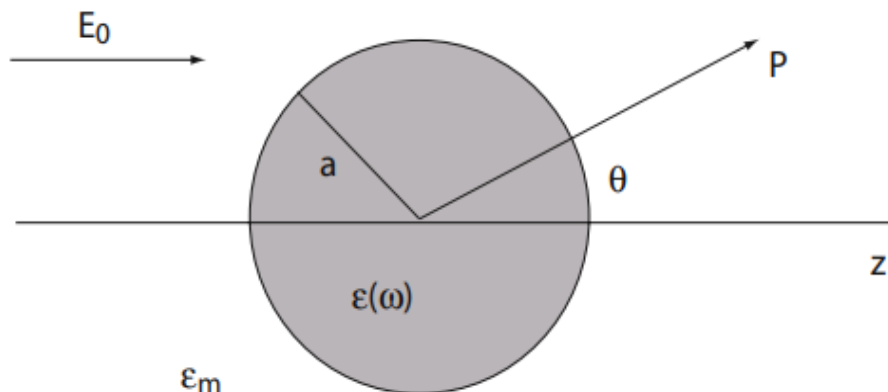


Figura 2-3 Esfera homogênea em um campo eletrostático (JACKSON, 1999)

Para o campo eletrostático, devemos resolver o laplaciano do potencial $\nabla^2 \phi = 0$ e com isso calcular o campo elétrico através de $\mathbf{E} = -\nabla\phi$, sendo ϕ o potencial eletrostático.

Em coordenadas esféricas, teremos:

$$\phi_0 = -E_0 z = -E_0 a \cos\theta \quad (2.1)$$

A simetria do problema nos indica o uso dos Polinômios de Legendre. Então, nesse caso, teremos o seguinte potencial:

$$\phi(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} [A_l r^l + B_l r^{-(l+1)}] P_l(\cos\theta) \quad (2.2)$$

Sendo $P_l(\cos\theta)$ o polinômio de Legendre de Ordem l , e θ o ângulo entre \mathbf{r} e o eixo z . As soluções para os potenciais dentro e fora da esfera, tendo em vista que eles são finitos na origem, serão dadas por

$$\phi(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} A_l r^l P_l(\cos\theta), \text{ dentro da esfera} \quad (2.3)$$

$$\phi(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} [B_l r^l + C_l r^{-(l+1)}] P_l(\cos\theta), \text{ fora da esfera} \quad (2.4)$$

Os coeficientes A_l , B_l e C_l podem ser definidos pelas condições de contorno quando $r \rightarrow \infty$ e na superfície da esfera, onde $r = a$.

Então, fora da esfera ($r \rightarrow \infty$):

$$\phi(r, \theta) \rightarrow -E_0 r \cos\theta, \text{ então } B_1 = -E_0 \text{ e } B_l = 0 \text{ se } l \neq 1 \quad (2.5)$$

Na superfície da esfera ($r = a$), temos que igualar $-\frac{1}{a} \frac{\partial \phi(r, \theta)}{\partial \theta}$ dentro com $-\frac{1}{a} \frac{\partial \phi(r, \theta)}{\partial \theta}$ fora quando $r = a$. Fazendo isso, e sabendo que

$$-\epsilon_0 \epsilon \frac{\partial \phi_{dentro}(r, \theta)}{\partial \theta} = -\epsilon_0 \epsilon_m \frac{\partial \phi_{fora}(r, \theta)}{\partial \theta} \quad (2.6)$$

Chega-se a:

$$\phi_{dentro}(r, \theta) = -\frac{3\epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} E_0 r \cos\theta, \text{ dentro da esfera} \quad (2.7)$$

$$\phi_{fora}(r, \theta) = -E_0 r \cos\theta + \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \frac{E_0 a^3 \cos\theta}{r^2}, \text{ fora da esfera} \quad (2.8)$$

Esse $\phi_{fora}(r, \theta)$ descreve a superposição entre o dipolo localizado e o campo aplicado. Reescrevendo a equação 2.8 a partir do momento de dipolo \mathbf{p} , tem-se que

$$\phi_{fora}(r, \theta) = -E_0 r \cos\theta + \frac{\mathbf{p} \cdot \mathbf{r}}{4\pi\epsilon_0 r^3 \epsilon_m} \quad (2.9)$$

$$\mathbf{p} = 4\pi\epsilon_0 a^3 \epsilon_m \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \mathbf{E}_0 \quad (2.10)$$

Podemos definir então a polarizabilidade complexa de uma esfera pequena de tamanho menor que o comprimento de onda incidente α como (JACKSON, 1999):

$$\alpha = 4\pi a^3 \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \quad (2.11)$$

A polarizabilidade, então, apresenta ressonância quando $|\epsilon + 2\epsilon_m|$ é um mínimo – o que, para o caso de uma variação pequena e lenta, $Im[\epsilon]$ em torno da ressonância, nos dá a condição de Fröhlich:

$$Re[\epsilon(\omega)] = -2\epsilon_m \quad (2.12)$$

E essa condição é o modo associado à ressonância de plasmon do dipolo da nanopartícula metálica, que depende da morfologia, do meio e do tamanho onde a nanopartícula metálica está inserida.

Uma vez discutida a teoria, o próximo capítulo mostrará a síntese do xerogel, como as nanopartículas são sintetizadas e depositadas nos substratos de xerogel, além da funcionalização das amostras.

3 Materiais e Métodos

3.1 Síntese do Xerogel

A síntese do sol-gel foi realizada na UNESP-Araraquara pelo Professor Dr. Edison Pecoraro e pelo Dr. Leonardo Araújo.

O método utilizado foi o de dupla catálise ácido-base. Esse método foi escolhido por associar rendimento alto da fase de hidrólise do precursor (TEOS), que gera espécies Si(OH)_4 para a etapa seguinte, que é a condensação-polimerização dos grupos Si-OH (silanóis), - catalisada por base para acelerar a reação dentro de um intervalo de 30 a 60 s - e possibilitar a conformação rápida do gel no formato de monólitos.

Em um recipiente de polietileno de 20 mL, adicionou-se sob agitação magnética 5,2 mL de água destilada, 7,0 mL de etanol (Synth, P.A.), 7,5 mL de tetraetil ortossilicato (TEOS) (Synth, 98%) e 200 μL de solução de ácido clorídrico (Synth, P.A.) a 1,2 mol/L, e manteve-se a mistura sob agitação por 15 min. Em seguida, sob agitação mais vigorosa (suficiente para gerar vórtice na suspensão), adicionou-se aos poucos 420 μL de solução de hidróxido de amônio (Synth, P.A.) a 0,6 mol/L. A suspensão foi prontamente transferida para moldes de polietileno com dimensões de 10x10x10 mm, tampado com filme plástico de PVC (para controle da velocidade de evaporação) e, mantido nessas condições por 72 h, para envelhecimento, *i.e.*, evolução da condensação dos grupos silanóis (-Si-OH). Durante essa etapa, observou-se a sinérese do gel (exsudação e evaporação da fase líquida, com diminuição do volume da fase sólida, ou seja, encolhimento do gel). Após a estabilização do encolhimento do gel, procedeu-se com a secagem em forno elétrico (BrasiMET K150)[Fig. 3-1], com taxa de aquecimento de 1 °C/min, até 600 °C, mantida a 600 °C por 30 min, e resfriado à temperatura ambiente. Esse tratamento térmico, teve como objetivos eliminar a fase líquida residual, assim como as impurezas de origem orgânica, derivadas dos grupos alcóxidos e do álcool formado durante os processos de hidrólise do TEOS.

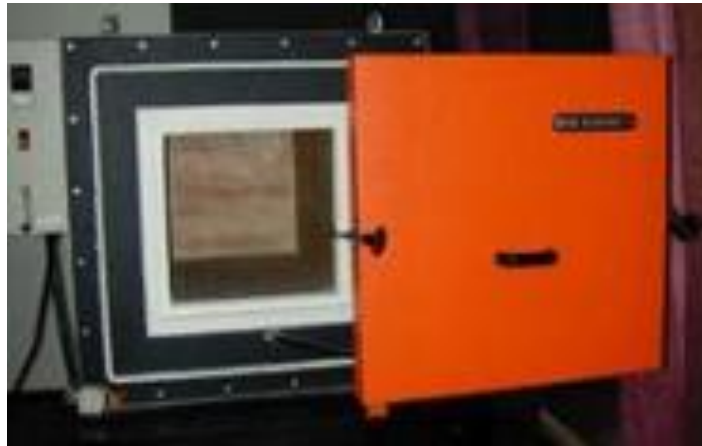


Figura 3-1 Tratamento térmico - Forno BrasiMET K150

Durante o tratamento, as amostras foram mantidas em cadinhos cerâmicos, com o objetivo de controlar a taxa de evaporação da fase líquida, evitando flutuações de temperatura sobre as amostras, que poderiam levar ao aumento do fluxo de fase gasosa expansiva a ser removida das amostras, ocasionando a ruptura da microestrutura e a propagação de trincas. A partir de inspeção visual, as amostras que apresentaram irregularidades em sua superfície, como bordas muito altas em relação ao centro da amostra, foram polidas com uma sequência de lixas de carvão de silício (granulação variando de 400 a 1000). As amostras apresentaram aspecto de coloração branca, levemente azulada, como observado na imagem da Figura 3-2. Esse aspecto é descrito como sendo *pré-sputtering*, ou seja, amostras sem a camada de Au.

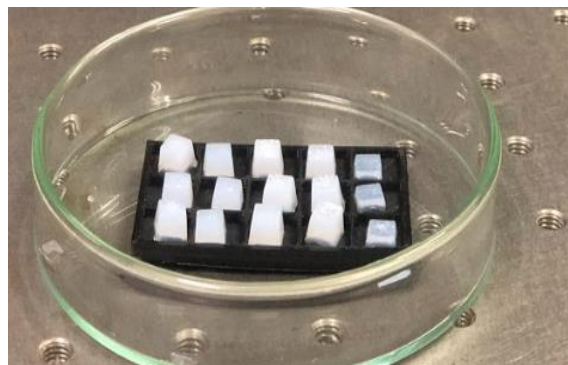


Figura 3-2 Amostras após o tratamento: xerogéis com coloração branca azulada

3.2 Síntese de Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

Na síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs) produz-se partículas nanométricas de ouro, e nesse caso foi realizada no substrato do xerogel de sílica. O processo de formação de AuNPs consiste de uma etapa inicial na qual ocorre a deposição de um filme fino de Au sobre o xerogel pelo método de *sputtering*. Em uma câmara de vácuo, a corrente elétrica faz com que um gás ionizado se choque com a superfície de um alvo de Au, removendo Au da superfície do alvo e, conseqüentemente, depositando-o sobre o xerogel.

O *sputtering* é realizado num equipamento chamado *Desk V*, que está disponível no Laboratório de Análises Técnicas da PUC-Rio [Fig. 4-3]. Os filmes depositados possuem 6 *nm* para o primeiro conjunto de amostras e 20 *nm* de espessura para o segundo conjunto de amostras (Anexo I).



Figura 3-3 DentonVacuum Desk V – Equipamento para *sputtering* do filme de Au.

O DentonVacuum Desk V é um equipamento de deposição por vácuo que produz camadas finas de materiais em superfícies. Com um ambiente de vácuo a baixa pressão, o ouro é evaporado e depositado sobre o xerogel.

O equipamento possui uma câmara de deposição, uma fonte de material e o sistema de vácuo. O sistema de vácuo faz com que, com pouco ar dentro da câmara, seja possível realizar a evaporação do material e depositar na superfície.

O equipamento utilizado permite que filmes finos sejam depositados em 15 xerogeis de dimensões típicas de 5 mm cada simultaneamente, tornando esta etapa do trabalho mais eficiente.

Esse processo de deposição foi realizado duas vezes por 1 minuto a cada vez, de forma que obtivéssemos um filme de aproximadamente 20 nm [Fig. 4-4].



Figura 3-4 Xerogeis após a deposição de Au feita através do processo de *sputtering*.

Após o processo de deposição de filme de Au por *sputtering*, é necessário colocar as amostras no forno novamente para a criação das NPs de Au por coalescência.

Na figura abaixo [Fig. 3-5] são apresentados os dois fornos utilizados.

No primeiro tratamento térmico [Fig. 3-5(a)], os xerogeis são aquecidos até 250 °C por 30 minutos e no segundo tratamento térmico [Fig. 3-5(b)] as amostras com filme de ouro sobre substrato de xerogel de sílica são aquecidas até 600 °C entre 4 e 6 minutos. O posicionamento dos cadinhos dentro dos fornos (como mostrado na Figura 3-5), deve ser de modo a mantê-los os mais centralizados possíveis em relação às paredes do forno, onde estão localizadas as resistências - que geram o gradiente de temperatura. Isso garante que todas as amostras estejam sobre os mesmos gradientes de temperatura, o que nos dá aproximadamente as mesmas condições para o crescimento das AuNPs.

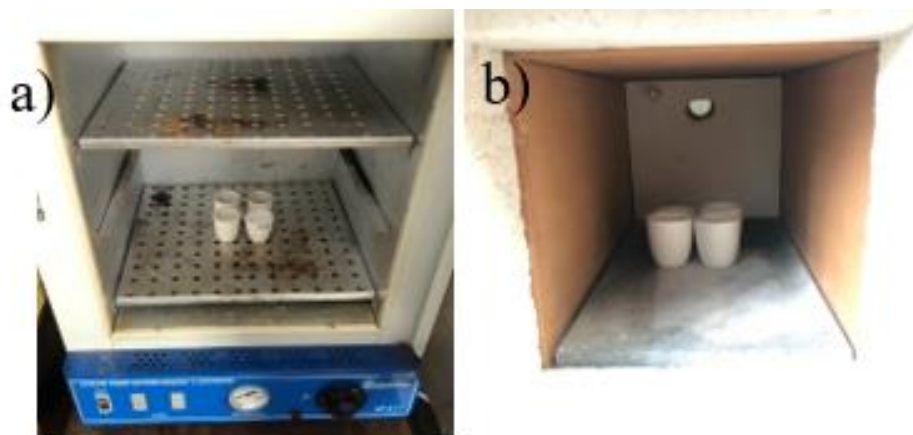


Figura 3-5 Amostras no forno a) primeiro forno - tratamento até 250°C b) segundo forno - tratamento térmico a 600°C – BrasiMET K150

Após esse processo, a coloração dos xerogéis fica rosada, indicando a criação das AuNPs [Fig. 3-6]. A síntese das nanopartículas na superfície do xerogel faz com que as propriedades ópticas se alterem, mudando a posição e a largura de banda da ressonância de plasmon localizada no espectro visível.

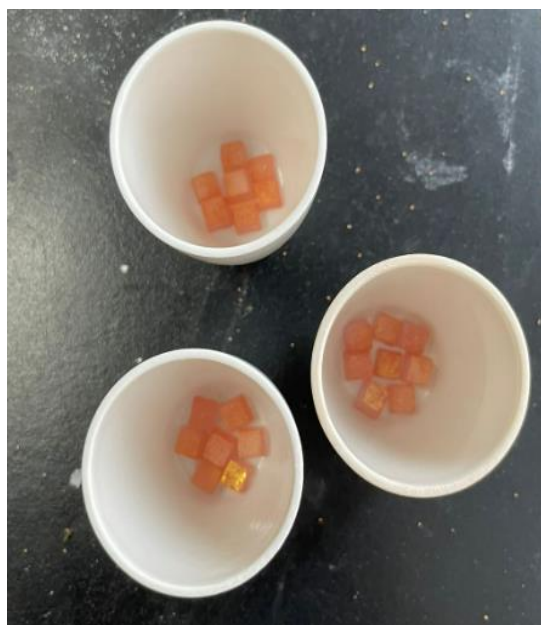


Figura 3-6 Xerogéis após o tratamento térmico para a criação das AuNPs

A classificação das amostras e o aspecto delas após a síntese das AuNPs se encontra na Tabela 1, no Anexo.

3.3 MEV

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é amplamente empregada em pesquisas para obter imagens de alta resolução da superfície de materiais. Para realizar a análise utilizando o MEV, são necessárias diversas etapas de preparação. Inicialmente, o substrato é fixado [Fig. 3-7] e, posteriormente, uma camada fina de metal condutor é depositada na sua superfície, utilizando-se uma fonte de material e o sistema de vácuo do dispositivo. Em seguida, o substrato é transferido para o microscópio eletrônico, para a obtenção de imagens da superfície do substrato através da varredura com um feixe de elétrons.



Figura 3-7 Xerogéis no equipamento Desk V fixados com fita de carbono

3.3.1 Caracterização morfológica das amostras por MEV

A Microscopia Eletrônica de Varredura teve como objetivo analisar o formato e o tamanho das nanopartículas de ouro (AuNPs) formadas nos xerogéis de sílica. As medidas com o MEV foram realizadas no Laboratório de Análises Térmicas da PUC-Rio pelo Prof. Antônio Mário.

A interpretação das imagens obtidas pela MEV nos mostrou que as AuNPs na superfície dos xerogéis de sílica têm formatos de nanoilhas [Fig. 3-8]. Esses resultados serão apresentados a seguir.

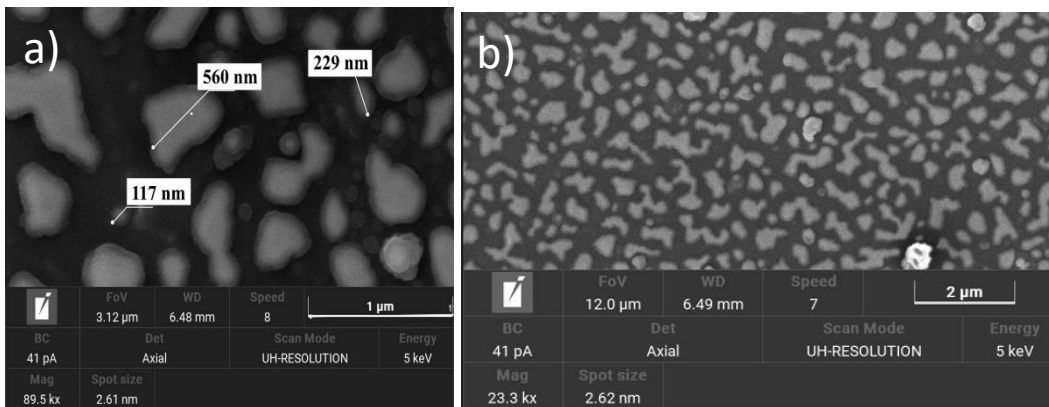


Figura 3-8 Imagens da superfície do sistema AuNPs@SiO₂. Nanoilhas de Au podem ser visualizadas através de imagens do MEV em uma escala de (a) 1 μm e (b) 2 μm.

Observamos através das imagens obtidas pelo MEV da superfície de AuNPs@SiO₂ realizada na amostra 30 que, após o procedimento de deposição de filme de Au e subsequente tratamento térmico, foram geradas nanoilhas de ouro na superfície dos xerogéis.

A composição química do sistema AuNPs@SiO₂ foi obtida através de medida de Espectroscopia por Dispersão de Elétrons (EDS), e o resultado é apresentado nas Figuras 3-9 e 3-10. A presença de carbono na amostra está relacionada à fita de carbono utilizada para fixar o xerogel durante a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Já a presença de sílica (SiO₂) do substrato é identificada através dos picos de Si e O, e o Au está relacionado com as nanoilhas de ouro na amostra. O enxofre (S) está relacionado com uma possível contaminação devida a manipulação da amostra.

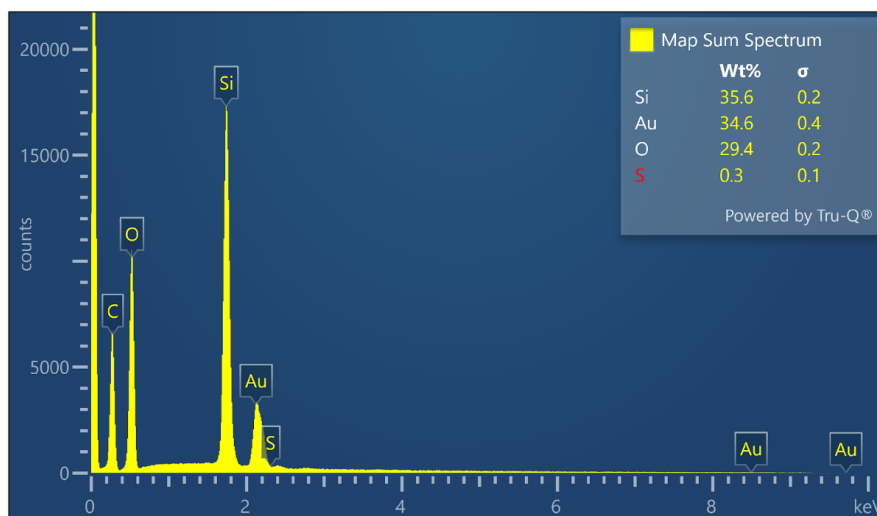


Figura 3-9 EDS - Composição do sistema AuNPs@SiO₂

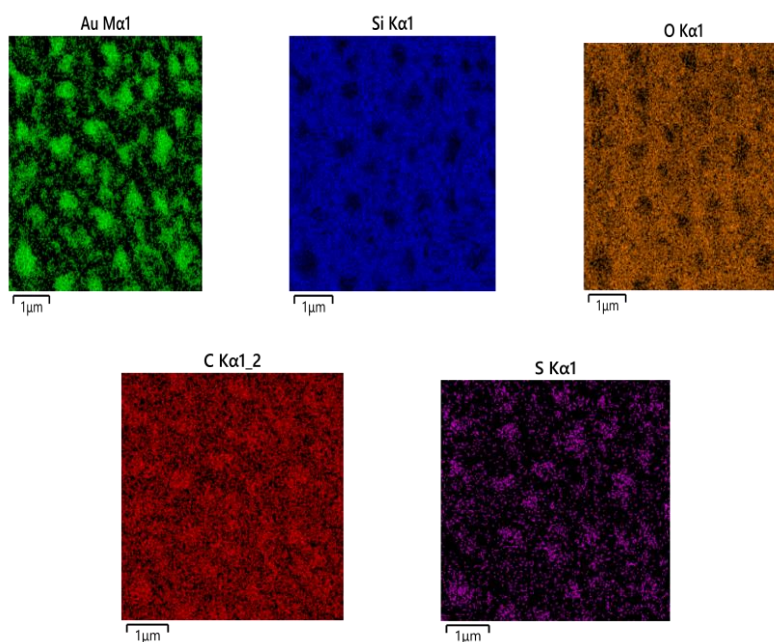


Figura 3-10 Composição do sistema AuNPs@SiO₂. A parte colorida indica a presença do elemento e a parte preta indica a ausência do elemento.

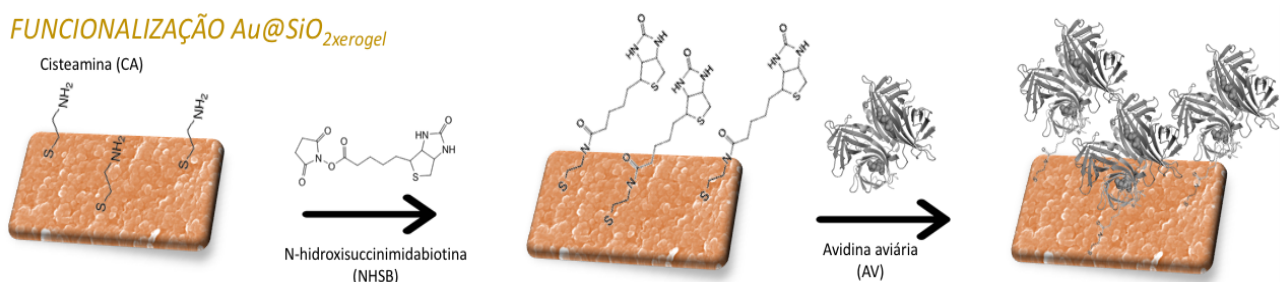
3.4 Funcionalização

Funcionalização é um processo que é realizado adicionando grupos funcionais a uma superfície para que se aumente a capacidade de interação dessa superfície com outras moléculas. Os grupos funcionais são átomos ou moléculas com determinadas especificidades, sendo elas: tendência de ligação entre moléculas, capacidade de reação química, entre outras. A adição desses grupos funcionais pode ser feita por diversas técnicas [30]. O objetivo desse trabalho foi, com a funcionalização da superfície AuNP@SiO₂, tornar este sistema biossensível.

Funcionalizar uma nanopartícula é colocar alguns grupos funcionais em sua superfície. No caso, foram realizadas duas funcionalizações: a primeira funcionalização é uma combinação de cisteamina, N-hidroxissuccinimidabiotina e avidina aviária [31-34] com concentração de 10^{-6} M. A segunda foi uma funcionalização com diferentes concentrações de avidina (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M e 10^{-10} M).

Na primeira fase das funcionalizações, uma quintuplicata foi realizada de modo a validar o processo e caracterizar com uma maior eficiência essas amostras

funcionalizadas. Estas funcionalizações foram realizadas pelo Professor Dr. Edison Pecoraro, na UNESP-Araraquara [Fig. 3-11].



Identificação da Amostra no Experimento	Identificação Original da Amostra (no saquinho)	Funcionalização	Identificação da Amostra no Experimento	Identificação Original da Amostra (no saquinho)	Funcionalização	Identificação da Amostra no Experimento	Identificação Original da Amostra (no saquinho)	Funcionalização
1	24/09/21 Amostra 1	CA	6	24/09/21 Amostra 6	CA + NHSB	11	17/09/21 Amostra 1	CA + NHSB + AV
2	24/09/21 Amostra 2	CA	7	24/09/21 Amostra 7	CA + NHSB	12	17/09/21 Amostra 2	CA + NHSB + AV
3	24/09/21 Amostra 3	CA	8	24/09/21 Amostra 8	CA + NHSB	13	17/09/21 Amostra 3	CA + NHSB + AV
4	24/09/21 Amostra 4	CA	9	24/09/21 Amostra 9	CA + NHSB	*14	17/09/21 Amostra 4	CA + NHSB + AV
5	24/09/21 Amostra 5	CA	10	24/09/21 Amostra 10	CA + NHSB	15	17/09/21 Amostra 5	CA + NHSB + AV
						16	17/09/21 Amostra 6	CA + NHSB + AV

* amostra descartada devido à contaminação

Figura 3-11 Tabela de composição das amostras de 1 a 16. Amostras de 1 a 5 contendo cisteamina (CA), amostras de 6 a 10 contendo cisteamina e biotina (NHSB) e amostras de 11 a 16 contendo cisteamina, biotina e avidina (AV). Cortesia: Dr. Edison Pecoraro.

Na segunda fase de funcionalizações, as amostras foram funcionalizadas com diferentes concentrações de avidina (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M e 10^{-10} M). Os espectros de absorção de oito amostras com AuNPs na superfície de xerogel de sílica foram medidos como referência e obteve-se o comprimento de onda do pico de LSPR de referência. As outras doze amostras foram divididas em triplicatas de acordo com as concentrações de avidina (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M e 10^{-10} M). Foram realizadas quatro medidas de absorbância com intervalos de 0, 7, 15 e 30 dias.

A classificação das amostras e o status dela após as etapas de funcionalização se encontra na Tabela 2, no Anexo.

3.5 Espectroscopia

3.5.1 Espectrofotômetro USB 4000 (Ocean Optics, EUA)

Foram realizadas medidas de caracterização de absorbância e a determinação do pico de absorção referente ao LSPR em NPs de Au em substrato de xerogel de sílica, utilizando a montagem experimental mostrada na figura 4-8.

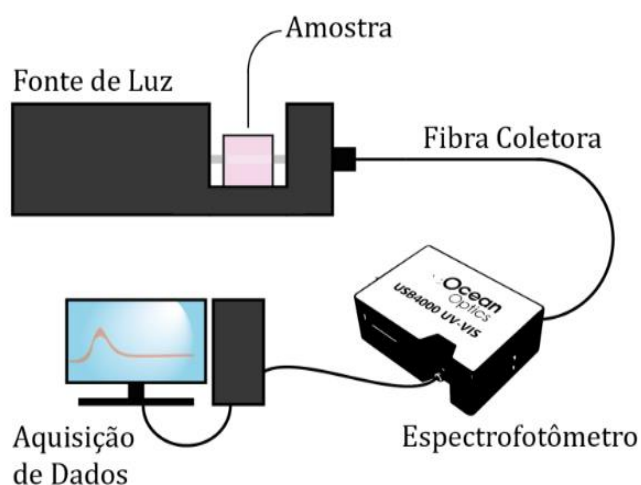


Figura 3-12 Montagem para medida da absorbância. Cortesia: Yan Machado

O USB 4000 (*Ocean Optics*, EUA) é um espectrofotômetro que funciona medindo a intensidade de luz em diferentes comprimentos de onda. O aparelho é conectado a um computador via USB e usa uma fonte de luz branca para iluminar a amostra.

A luz da fonte passa por uma fenda estreita e é direcionada para a amostra. A luz então passa pela amostra, é captada pelo detector que envia o sinal para o computador, onde é processado pelo *Spectra Suite*. É possível ajustar vários parâmetros, como selecionar os comprimentos de onda e integração do tempo, gerando um espectro de absorção.

3.5.2 Espectrofotômetro Lambda 950 (Perkin Elmer, EUA)

O Lambda 950 (Perkin Elmer, EUA) [Fig. 3-13] é um espectrofotômetro UV-VIS-NIR que trabalha entre 175 *nm* e 3300 *nm* e possui duas lâmpadas: uma de deutério (UV) e outra de tungstênio-halogênio (VIS-NIR). Com o interesse de medir a absorbância, foi usado em sua configuração padrão, sem acrescentar o módulo de esfera integradora.



Figura 3-13 Perkin Elmer Lambda 950

Foram realizadas medidas tanto no USB4000 quanto no Lambda 950, localizado no Laboratório Multiusuário do Departamento de Física da PUC-Rio.

A seguir, são apresentados e discutidos os resultados referentes às medidas de absorbância realizadas nas amostras estudadas.

4 Resultados e Discussões

4.1 Caracterização das AuNPs sobre xerogel de sílica

4.1.1 Espectroscopia de Absorção

As amostras estudadas nesta seção foram catalogadas como mostrado no Anexo 1, sendo o primeiro conjunto de amostras composto pelos xerogéis numerados de 1 a 16 e o segundo conjunto constituído pelos xerogéis numerados de 17 a 42. Nesta seção são apresentados os resultados da medida de absorbância obtidos para cada um desses grupos.

Inicialmente realizou-se a espectroscopia de absorção em uma amostra de xerogel com o espectrofotômetro USB4000 [Fig. 4-1]. Verificou-se a presença de um ruído na região do comprimento de onda de 400 *nm*. Por conta disso, novas medidas de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro Lambda 950, com o objetivo de otimizar a identificação do deslocamento de banda esperado e reduzir o sinal-ruído.

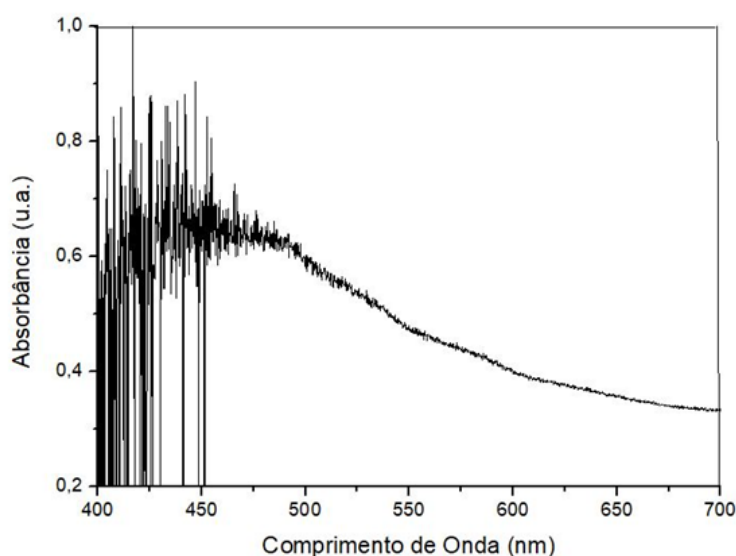


Figura 4-1 Espectro de absorbância do xerogel após o tratamento térmico, sem deposição de Au

4.1.1.1 Caracterização da síntese das AuNPs do primeiro conjunto de amostras – 1 a 16

As amostras com nanopartículas de Au (AuNPs) apresentaram diversas tonalidades de rosa, conforme evidenciado na Figura 4-2, o que indica a criação de AuNPs menores (COUTO, 2020) que as dos outros xerogéis com filme de 20 nm. Nesse primeiro conjunto de amostras (1 a 16), o filme de Au depositado para a síntese de AuNPs tinha uma espessura de aproximadamente 6 nm. Para o segundo grupo de amostras (17 a 42), aumentamos a espessura do filme para 20 nm com o intuito de facilitar a ligação da funcionalização.



Figura 4-2 Amostras de 1 a 7 - AuNPs@SiO₂

O subconjunto de amostras entre 1 e 7 [Fig. 4-3], nas quais foram formadas nanoilhas na superfície do xerogel, apresentou espectros de absorção típicos para AuNPs com um comprimento de onda médio do pico de LSPR igual a $\lambda_{pico} = 486,89 \text{ nm}$. Somente a amostra de número 7 apresentou um $\lambda_{pico} = 517,70 \text{ nm}$, maior que o das outras amostras – o que pode ter sido causado pela morfologia e pelo tamanho das AuNPs. Observou-se, também, diferentes tonalidades de rosa nas amostras, o que indica diferentes tamanhos das AuNPs.

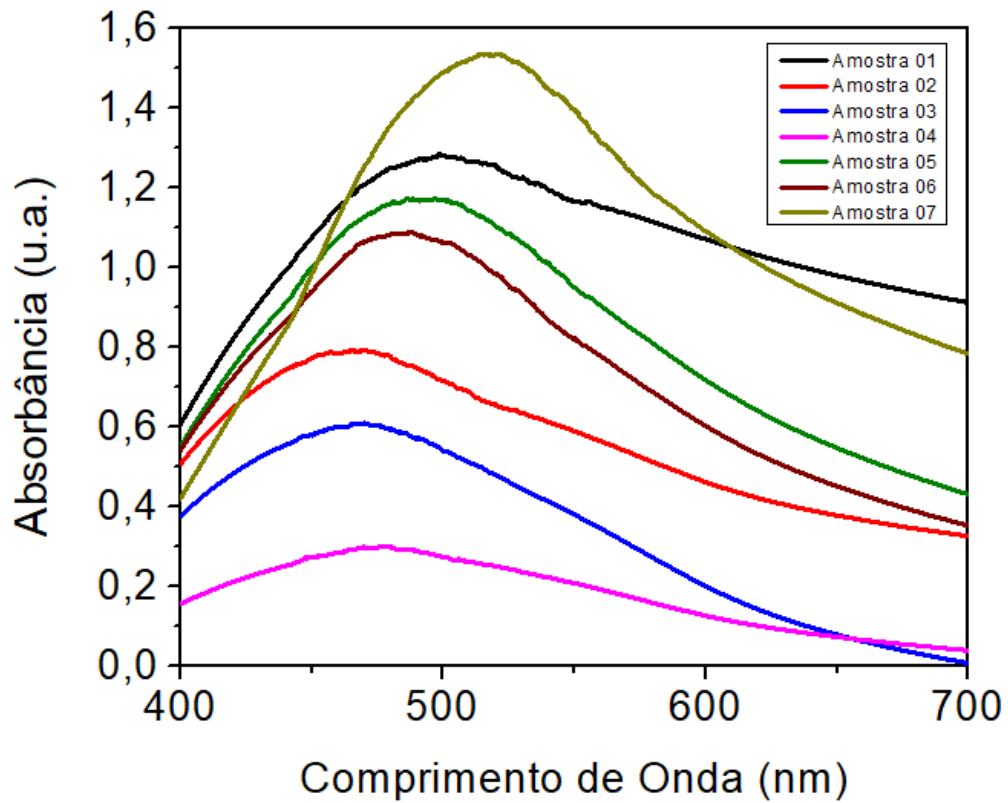


Figura 4-3 Espectro de absorção das amostras de 1 a 7

O subconjunto de amostras entre 8 e 16 apresentou rachaduras. A absorbância referente a essas amostras está descrita na seção 5.2, junto com o espectro de absorção pós funcionalização.

O primeiro conjunto de amostras funcionalizado foi utilizado para detectar avidina com uma concentração de 10^{-6} M.

O pico de absorbância da Figura 4-4 em $486,10 \text{ nm}$ indica a ressonância LSPR das nanoilhas de ouro que foram sintetizadas de acordo com a seção 3.2 do presente trabalho.

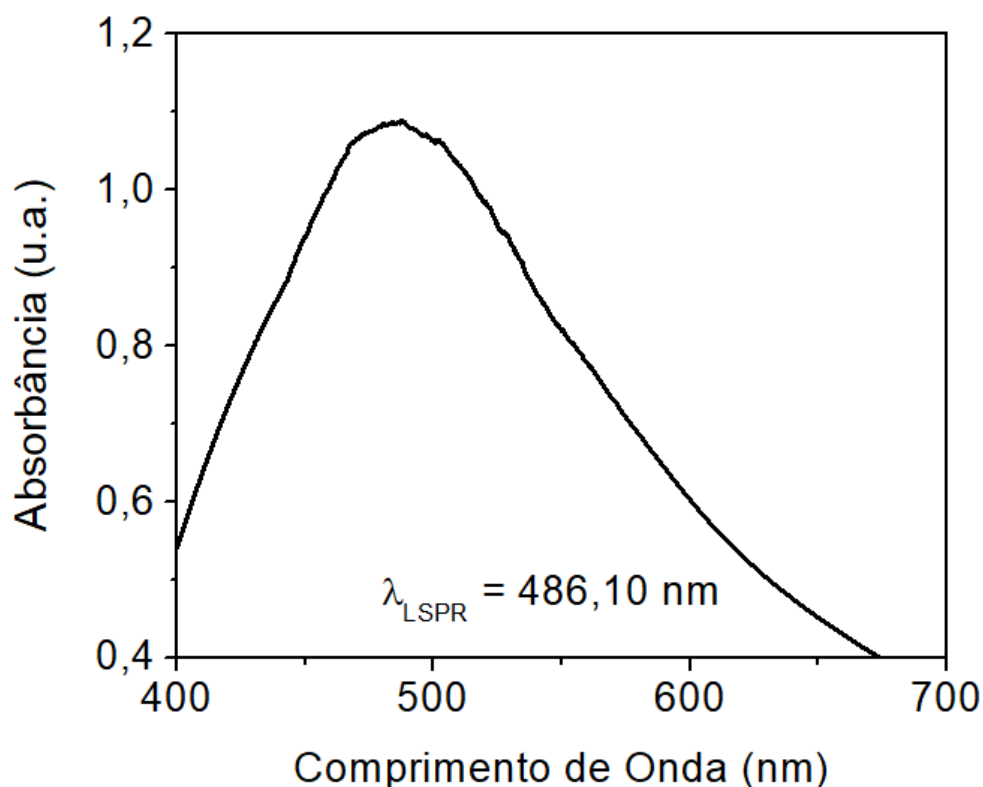


Figura 4-4 Espectro de absorção da amostra 6 com AuNPs

4.1.1.2 Caracterização da síntese das AuNPs do segundo conjunto de amostras – 17 a 42

O segundo conjunto de amostras apresentou espectros de absorção esperados para AuNPs após a síntese das nanopartículas no xerogel com uma média de comprimento de absorção de LSPR igual a $\lambda_{pico} = 489 \text{ nm}$. Para esse grupo de amostras, aumentamos a espessura do filme para 20 nm com o objetivo de otimizar o sinal de detecção posterior. A melhora da sensibilidade foi perceptível, já que facilitou a identificação das bandas LSPR. As medidas de absorbância desse conjunto estão na seção 5.2.

A média do espectro de absorção obtida pelo Lambda 950 possui um $\lambda_{LSPR} = 489 \pm 0,05 \text{ nm}$ [Fig. 4-5] para 8 amostras de referência com AuNPs, o que também indica a presença de nanoilhas de ouro.

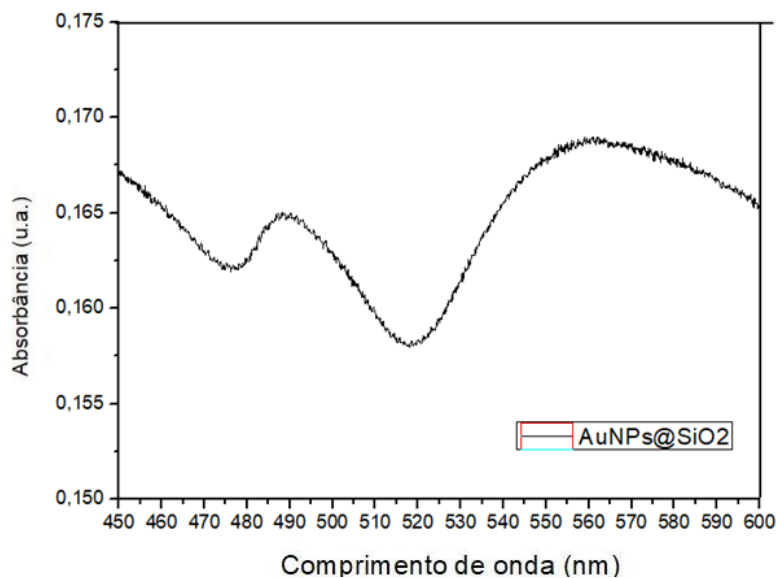


Figura 4-5 Média da absorvância de 8 amostras com AuNPs

Além das medidas das amostras, foi realizada uma calibração através da medida de uma solução de AuNPs esféricas (cortesia: Mariana Gisbert) no Lambda 950 a nível de comparação no que tange à presença de AuNPs [Fig. 4-6]. O pico de absorção dessa solução se encontra em 522 nm , conforme mostrado na figura 4-12. O deslocamento entre os picos se deve ao fato de estarmos comparando morfologias, tamanhos diferentes de nanopartículas e meios diferentes.

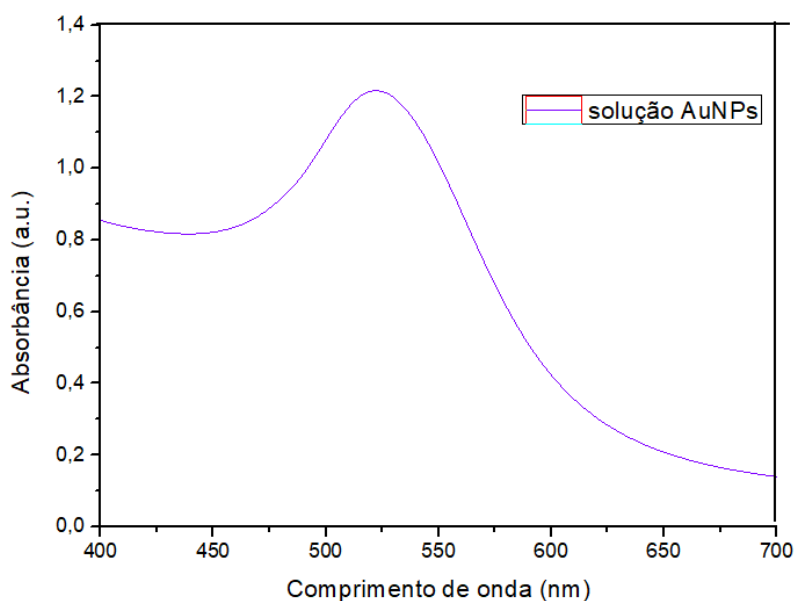


Figura 4-6 Espectro de absorção da solução com AuNPs esféricas

4.2 Caracterização da funcionalização

A caracterização da funcionalização foi realizada através de espectroscopia, utilizando-se o espectrofotômetro USB4000 (para o primeiro conjunto de amostras – 1 a 16) e o Lambda 950 (para o primeiro e segundo conjunto de amostras – 17 a 42). Como os resultados de absorvância obtidos no USB4000 possuíam muito ruído na região dos 400 *nm*, foram realizadas novas medidas de absorvância para o primeiro grupo no Lambda 950, com o intuito de reduzir o sinal-ruído e melhor identificação do deslocamento de banda esperado.

4.2.1 Caracterização da funcionalização do primeiro conjunto de amostras – 1 a 16

A concepção de três conjuntos de cinco amostras, como mostrado na figura 4-6, teve como objetivo realizar quintuplicatas, visando obter uma média das medidas e também validar a metodologia de funcionalização empregada. Foi utilizado o USB4000 em toda a sua região de alcance (entre 300 *nm* e 1100 *nm*), com o objetivo de identificar as bandas e o deslocamento de pico LSPR.

Como ilustrado na Tabela 2 (Anexo I), as amostras de 1 a 5 foram tratadas apenas com cisteamina (CA). As amostras de 6 a 10 foram tratadas com cisteamina e biotina (CA + NHSB) e as amostras entre 11 e 16 foram tratadas com cisteamina, biotina e avidina (CA + NHSB+ AV). Na etapa final do experimento, a concentração de avidina (AV) empregada para ligação das amostras foi de $7,6 \times 10^{-6} M$. A concentração de biotina (NHSB) empregada foi cerca de 10.000 vezes menor do que a de avidina. Conforme relatado na literatura [35], a faixa de sensibilidade esperada estende-se até $10^{-9} M$ para AuNPs. Por conseguinte, o último conjunto de amostras (11, 12, 13, 15 e 16) foi utilizado para verificar se o sistema apresentava sensibilidade dentro da faixa esperada e para validação da metodologia.

4.2.1.1 Absorção das amostras 1 a 5 – Cisteamina (CA)

A Figura 4-7 mostra a absorbância em função do comprimento de onda para as amostras de 1 a 5, respectivamente. Essas medidas foram realizadas com o USB4000. Considerando somente a ligação entre AuNPs e a cisteamina., a curva de absorção referente à pré funcionalização (curva vermelha) quando comparada à curva pós funcionalização (curva preta) apresenta um alargamento de banda. Conforme tabela 1 (anexo), as amostras de 1 a 5 apresentaram rachaduras após a síntese das AuNPs, o que pode ser responsável pela diferença na resposta espectral.

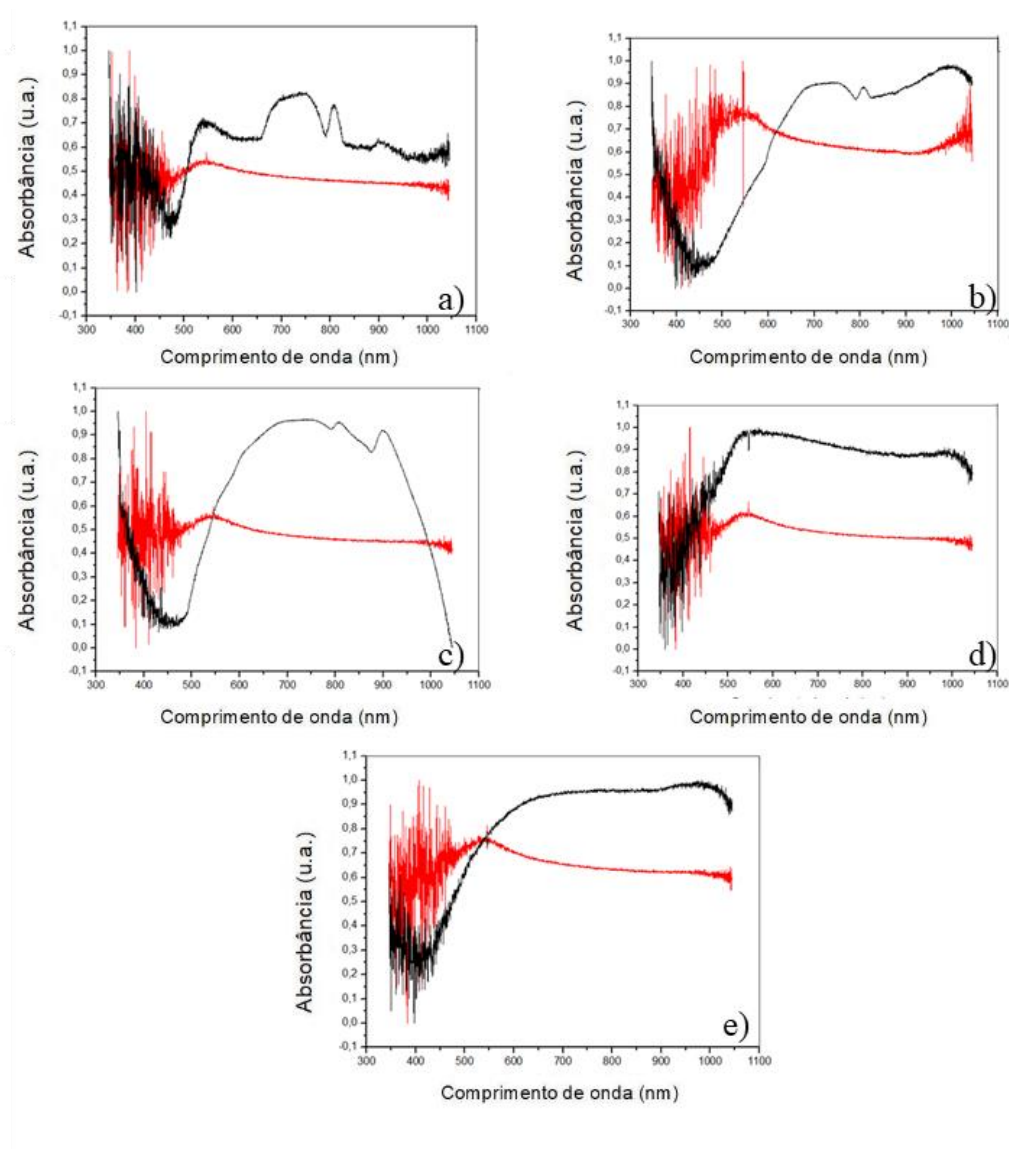


Figura 4-7 Espectro de absorção pré funcionalização (vermelho) e pós funcionalização (preto) para a) amostra 1, b) amostra 2, c) amostra 3, d) amostra 4 e e) amostra 5

Como observado, ocorre um alargamento da banda de absorção da amostra funcionalizada em relação à amostra sem funcionalização. Apesar das curvas não se repetirem e não haver reprodutibilidade, pode-se observar o mesmo comportamento na região do azul.

4.2.1.2 Absorção das amostras 6 a 10 – Cisteamina e Biotina (CA+NHSB)

Os espectros a seguir [Fig. 4-8] mostram a absorbância em função do comprimento de onda para as amostras de 6 a 10, respectivamente. Essas medidas foram realizadas com o USB4000. As amostras foram funcionalizadas com cisteamina e biotina. A curva de absorção referente à pré funcionalização (curva vermelha) quando comparada à curva pós funcionalização (curva preta) apresenta também um alargamento de banda. Conforme tabela 1 (anexo), as amostras de 6 a 10 também apresentaram rachaduras após a síntese das AuNPs. Apesar disso, existe uma consistência da resposta espectral de cada amostra nessa etapa de funcionalização.

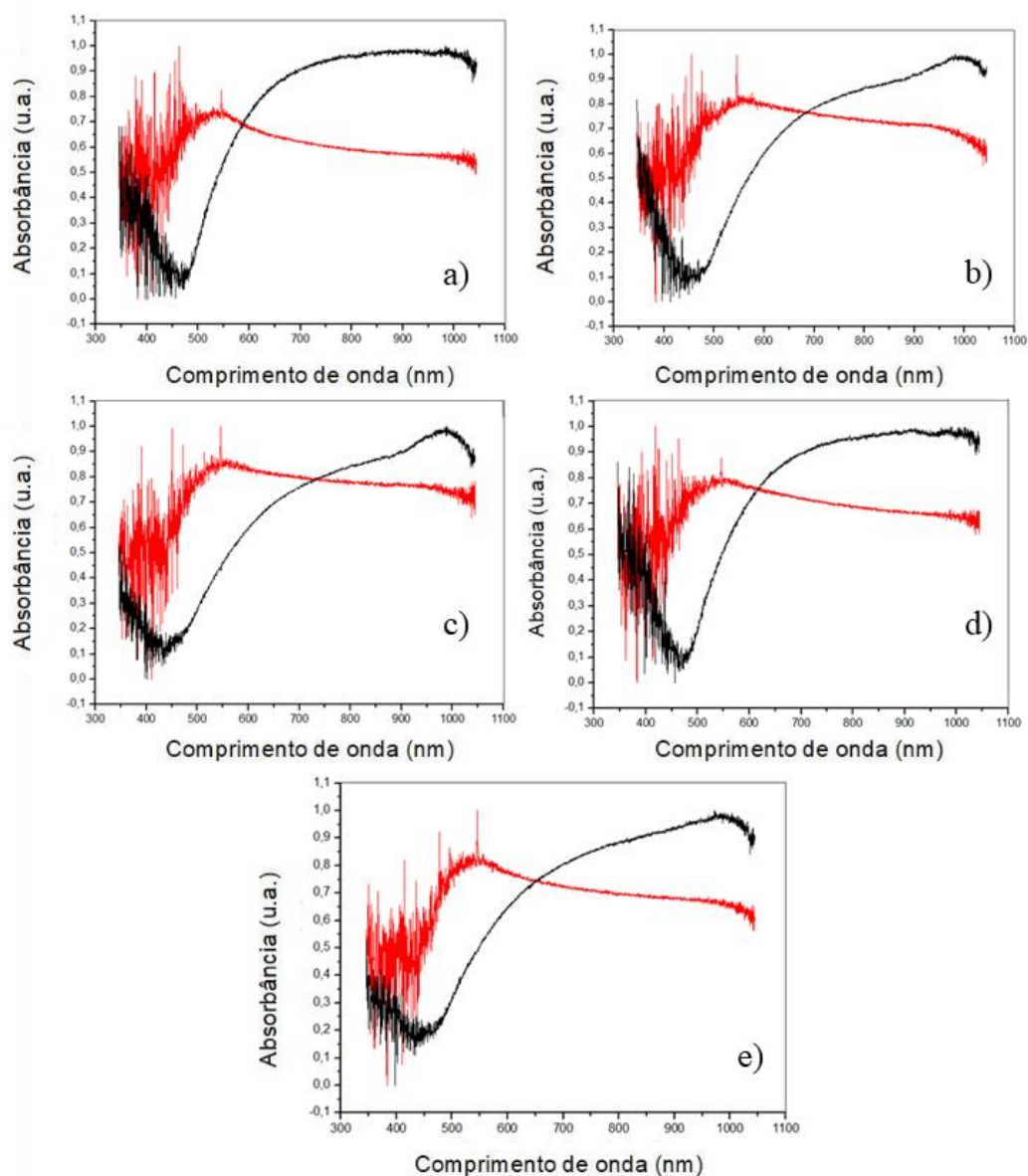


Figura 4-8 Espectro de absorção pré funcionalização (vermelho) e pós funcionalização (preto) para a) amostra 6, b) amostra 7, c) amostra 8, d) amostra 9 e e) amostra 10

No sistema CA+NHSB, o espectro pós funcionalização é mais definido e reprodutível. Observa-se um alargamento de banda nos espectros, evidenciando uma resposta do sistema à funcionalização.

4.2.1.3 Absorção das amostras 11 a 16 – Cisteamina, Biotina e Avidina (CA+NHSB+AV)

A absorbância em função do comprimento de onda para as amostras 11 a 16 [Fig. 4-9] estão apresentadas abaixo. Essas medidas foram realizadas com o USB4000. As amostras foram tratadas com cisteamina e biotina para identificação de avidina. A curva de absorção referente à pré funcionalização (curva vermelha) quando comparada à curva pós funcionalização (curva preta) apresenta também um alargamento de banda. Na tabela 1 (anexo), foi apresentado que as amostras de 11 a 16 apresentaram rachaduras após a síntese das AuNPs.

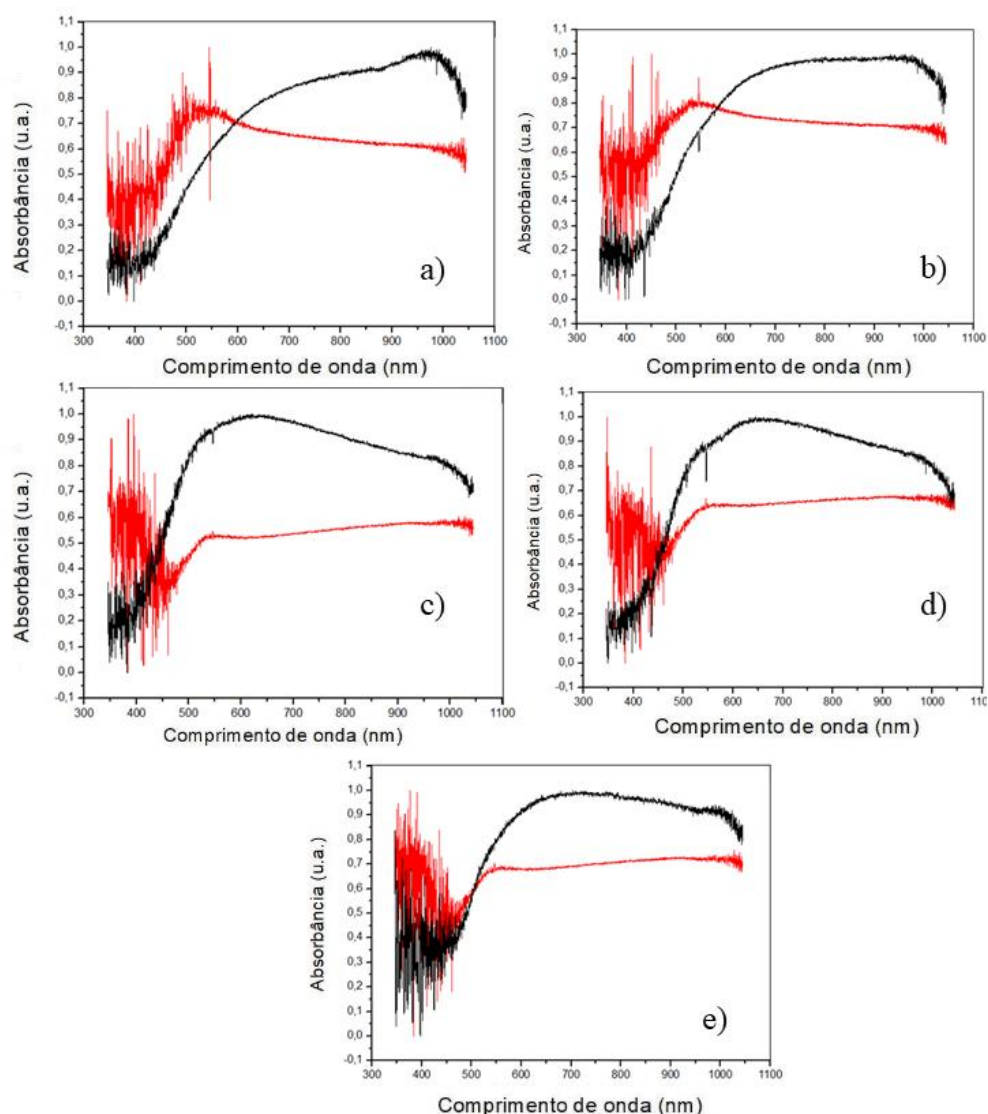


Figura 4-9 Espectro de absorção pré funcionalização (vermelho) e pós funcionalização (preto) para a) amostra 11, b) amostra 12, c) amostra 13, d) amostra 15 e e) amostra 16

No sistema CA+NHSB+AV, o espectro pós funcionalização se torna característico. Observa-se um alargamento de banda nos espectros que indica a resposta à funcionalização. Os espectros apresentam picos na banda de absorção mais pronunciados que nas etapas anteriores. O alargamento de banda validou a metodologia, mas de forma a ter espectros com menos ruído optou-se então pela análise da absorbância através do espectrofotômetro Lambda 950.

4.2.2 Caracterização da funcionalização do segundo conjunto de amostras – 17 a 42

Primeiramente, foram medidas as absorbâncias utilizando o USB4000, mas a região onde a relação sinal-ruído é menor em relação aos outros comprimentos de onda (em torno dos 400 nm) nos fez optar, posteriormente, pelo uso do Lambda 950.

Ao posicionar as amostras no espectrofotômetro, estas foram colocadas em cubetas de quartzo da Thorlabs e posicionadas de forma a ter a maior incidência de luz possível nelas. O equipamento Lambda 950 possui espaço para duas cubetas, sendo uma de referência (amostras 17 e 18) e a outra com a amostra que está sendo analisada. As medidas realizadas foram na faixa de comprimento de onda de 400 nm a 700 nm, com o passo de 0,1 nm, com o objetivo de detectar bem a região do deslocamento das AuNPs.

A referência utilizada foi um xerogel tratado termicamente até 600 °C com taxa de aquecimento de 2,5 °C/min, sem deposição de filme de Au.

Na Figura 4-10 podemos observar os deslocamentos de pico entre o sistema AuNPs@SiO₂ e o sistema das amostras com funcionalização CA+NHSB+AV com concentração de avidina da ordem de 10⁻⁷ M para as amostras 19, 20 e 21. Os picos foram definidos através do método de integração do software Origin. Observa-se um deslocamento médio de pico $\Delta\lambda_{pico} = 24,57 \text{ nm}$ em relação ao comprimento de onda do pico de LSPR (489 nm) e a ocorrência de um *redshift*.

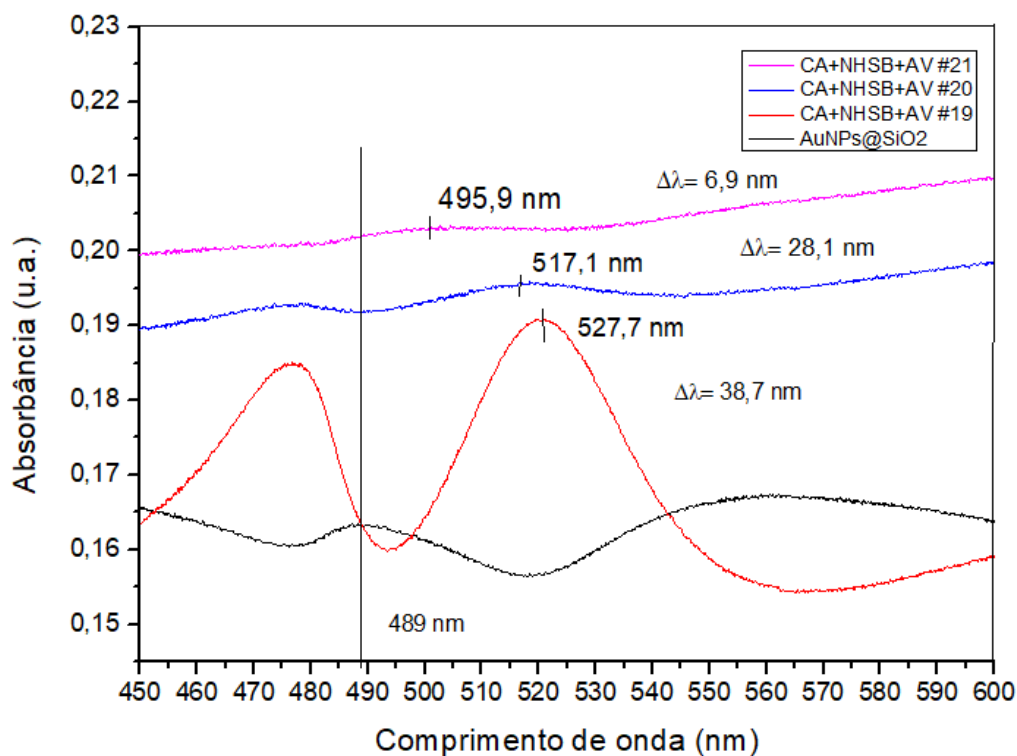


Figura 4-10 Espectro de absorção em função do comprimento de onda das amostras 19, 20 e 21, funcionalizadas com concentração de avidina de 10^{-7} M.

Analisando a figura 4-10 para a curva da amostra 19, observa-se a presença de dois picos (479 nm e $527,7 \text{ nm}$). De forma a compreender a origem do pico em 479 nm , foi realizada uma medida de refletância da luz na amostra 19. O espectro de refletância mostrado na Figura 4-11 exibe um pico de refletância exatamente em 479 nm , e, portanto, é possível associar na Figura 4-10 que a banda centrada em 479 nm está relacionada a um espalhamento da amostra e não à Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR). Ou seja, a banda observada em 479 nm aparece tanto no espectro de refletância quanto no de absorção, o que nos mostra a associação dessa banda ao espalhamento da luz, o que não ocorre na banda centrada em $527,7 \text{ nm}$.

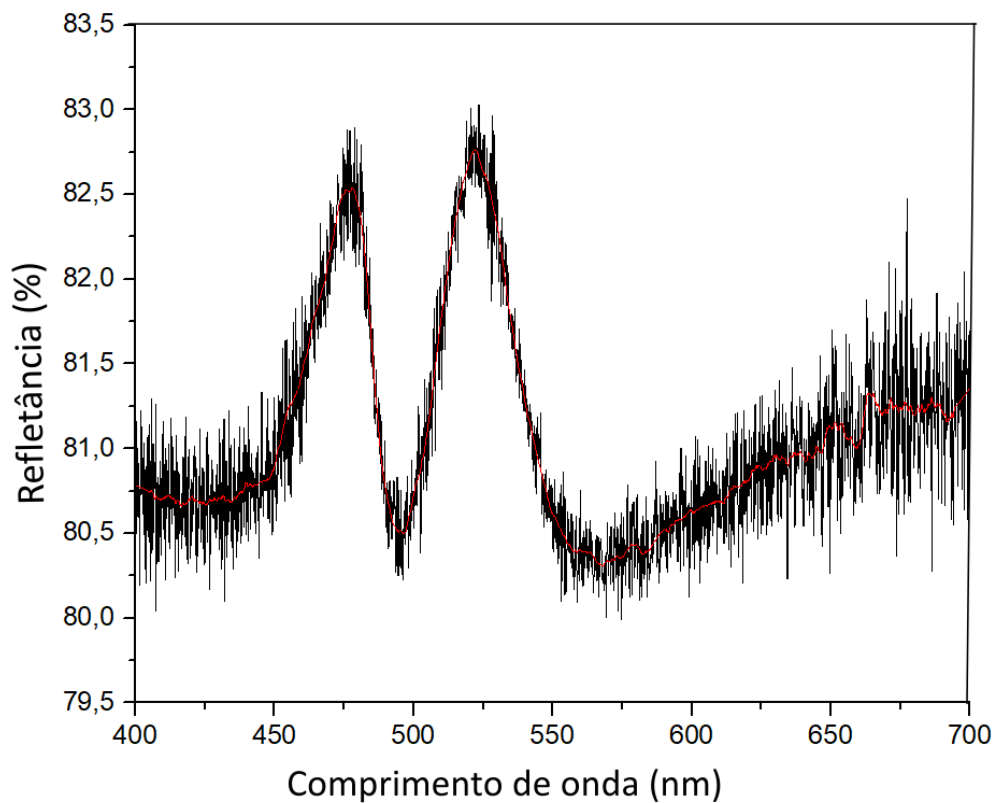


Figura 4-11 Espectro de refletância difusa em função do comprimento de onda da amostra 19 (curva preta). A curva vermelha é relacionada ao smooth do software Origin.

Na figura 4-12 podemos observar os deslocamentos de pico entre o sistema AuNPs@SiO₂ e o sistema das amostras com funcionalização CA+NHSB+AV com concentração de avidina da ordem de 10⁻⁸ M para as amostras 24, 25 e 26. Todas as amostras apresentaram deslocamento LSPR para o vermelho (*redshift*).

A média do deslocamento de comprimento de onda ($\Delta\lambda_{pico}$) das amostras com concentração de avidina de 10⁻⁸ M foi de $\Delta\lambda_{pico} = 79,72 \text{ nm}$.

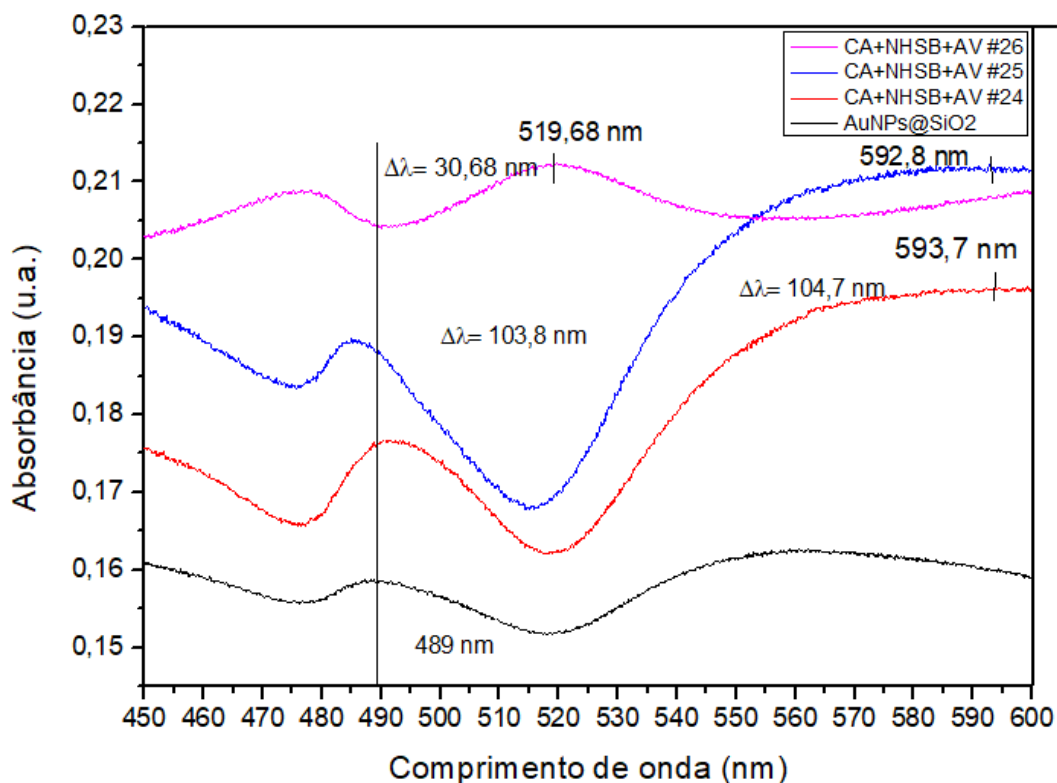


Figura 4-12 Espectro de absorção em função do comprimento de onda das amostras 24, 25 e 26, funcionalizadas com concentração de avidina de 10^{-8} M.

Na figura 4-13 podemos observar os deslocamentos de pico entre o sistema AuNPs@SiO₂ e o sistema das amostras com funcionalização CA+NHSB+AV com concentração de avidina da ordem de 10^{-9} M para as amostras 32, 33 e 36. Todas as amostras apresentaram deslocamento LSPR.

A média do deslocamento de comprimento de onda ($\Delta\lambda_{pico}$) das amostras com concentração de avidina de 10^{-9} M foi de $\Delta\lambda_{pico} = 80,56$ nm. Todas as amostras apresentaram um *redshift*, o que era esperado de acordo com a literatura.

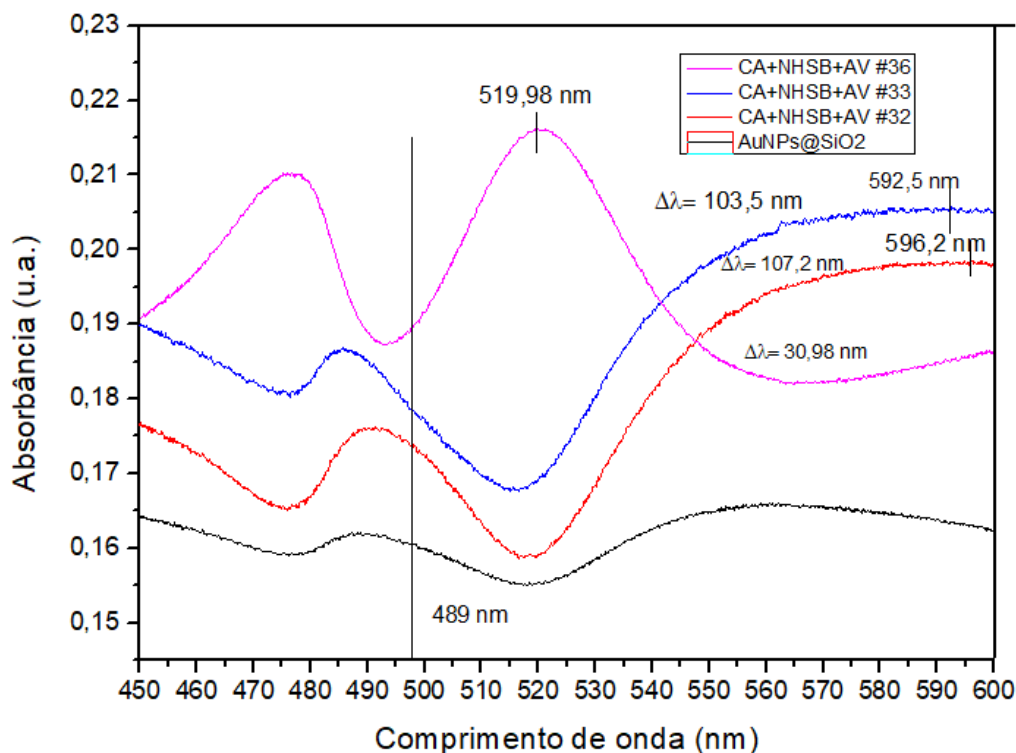


Figura 4-13 Espectro de absorção em função do comprimento de onda das amostras 32, 33 e 36, funcionalizadas com concentração de avidina de 10^{-9} M.

Na figura 4-14 podemos observar os deslocamentos de pico entre o sistema AuNPs@SiO₂ e o sistema das amostras com funcionalização CA+NHSB+AV com concentração de avidina da ordem de 10^{-10} M para as amostras 40, 41 e 42. Todas as amostras apresentaram deslocamento LSPR para o vermelho (*redshift*).

A média do deslocamento de comprimento de onda ($\Delta\lambda_{pico}$) das amostras contendo uma concentração de avidina de 10^{-10} M [Fig. 5-12] foi determinada como $\Delta\lambda_{pico} = 49,4 \text{ nm}$. Todas as amostras apresentaram *redshift*. Entretanto, constatou-se que a amostra 42 apresentou um deslocamento menor do pico de comprimento de onda, o que pode ser atribuído à sua espessura. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a espessura dos xerogeis utilizados na produção das amostras não foi uniforme, resultando em uma variação no deslocamento da ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR).

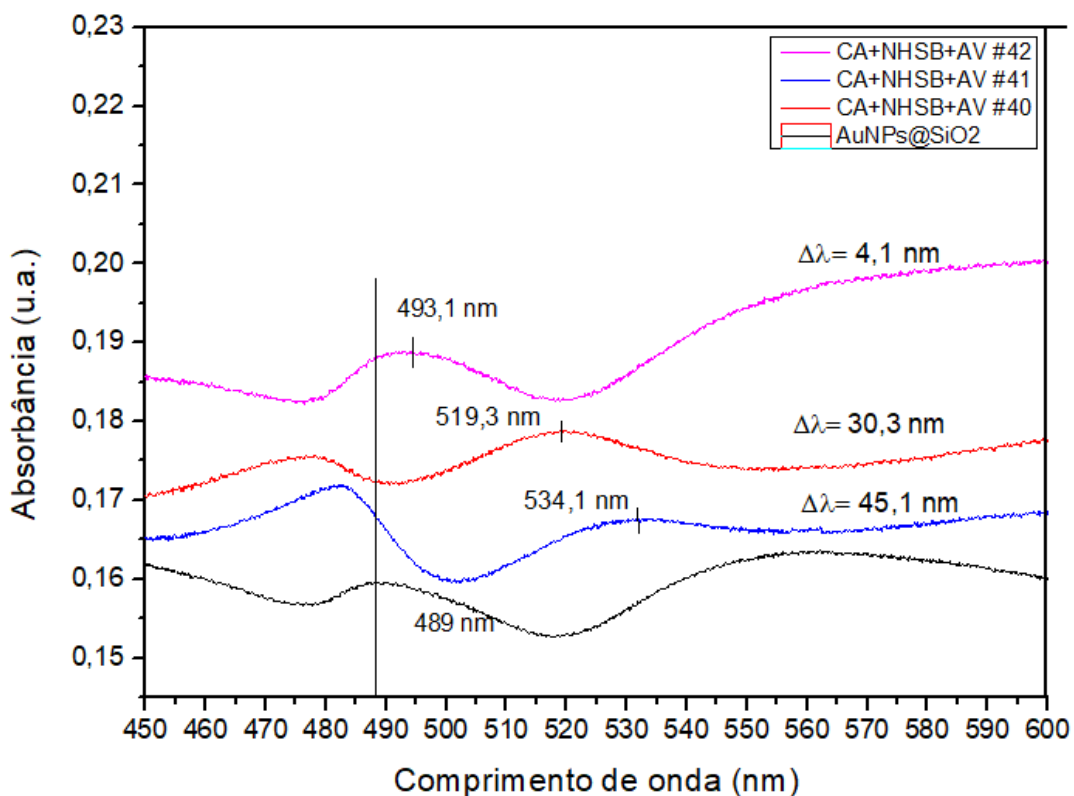


Figura 4-14 Espectro de absorção em função do comprimento de onda das amostras 40, 41 e 42, funcionalizadas com concentração de avidina de 10^{-10} M.

A média geral de deslocamento das amostras é $\Delta\lambda_{pico} = 52,83 \text{ nm}$.

As concentrações de avidina de 10^{-8} M e 10^{-9} M obtiveram uma média do deslocamento de pico aproximada (79,72 nm e 80,56 nm, respectivamente). A média das concentrações 10^{-7} M e 10^{-10} M obtiveram uma média de deslocamento 24,57 nm e 49,4 nm, respectivamente.

O espectro de absorbância apresentado na figura 4-15 tem como objetivo comparar duas amostras com funcionalização CA+NHSB+AV, sendo a curva azul proveniente da amostra 15, a qual passou pelo processo de funcionalização em outubro de 2021, e a curva vermelha correspondente a amostra 19, funcionalizada em novembro de 2022, e que apresenta um menor sinal-ruído. Apesar do sinal apresentar um nível de ruído, é possível observar que houve deslocamento de banda LSPR (6,6 nm para a amostra 15 e 5,16 nm para a amostra 19) na presença de avidina em relação ao sistema AuNPs@SiO₂, indicando que a funcionalização ocorreu de forma efetiva. Esse deslocamento permaneceu mesmo após um ano de

armazenamento, o que evidencia uma boa estabilidade da amostra mesmo em condições de degradação do biossensor (armazenamento em temperatura ambiente e fora da dissecadora).

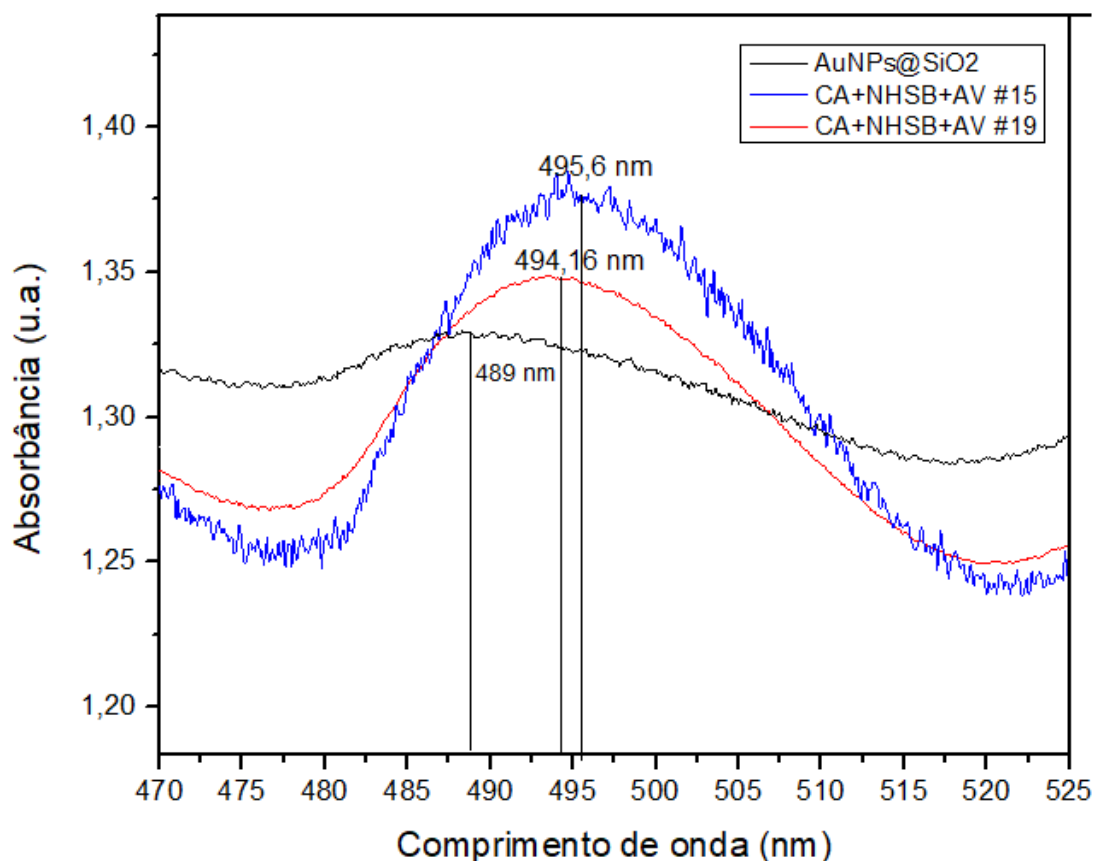


Figura 4-15 Espectro de absorção em função do comprimento de onda das amostras 15 (curva azul) e 19 (curva vermelha) com funcionalização CA+NHSB+AV e do sistema AuNPs@SiO₂(curva preta)

A figura 4-16 mostra os espectros de absorbância entre três amostras distintas, a saber: o xerogel contendo AuNPs, a amostra 9 (10^{-6} M) contendo cisteamina e biotina, e a amostra 24 (10^{-8} M) contendo cisteamina, biotina e avidina. Observa-se, por meio do gráfico obtido, que houve um deslocamento para a região de maiores comprimentos de onda (*redshift*) de 2,7 nm quando se comparou o sistema AuNPs@SiO₂ com a amostra contendo CA+NHSB, enquanto que se verificou um deslocamento para a região de menores comprimentos de onda (*blueshift*) de 0,7 nm ao se comparar as amostras contendo CA+NHSB e CA+NHSB+AV.

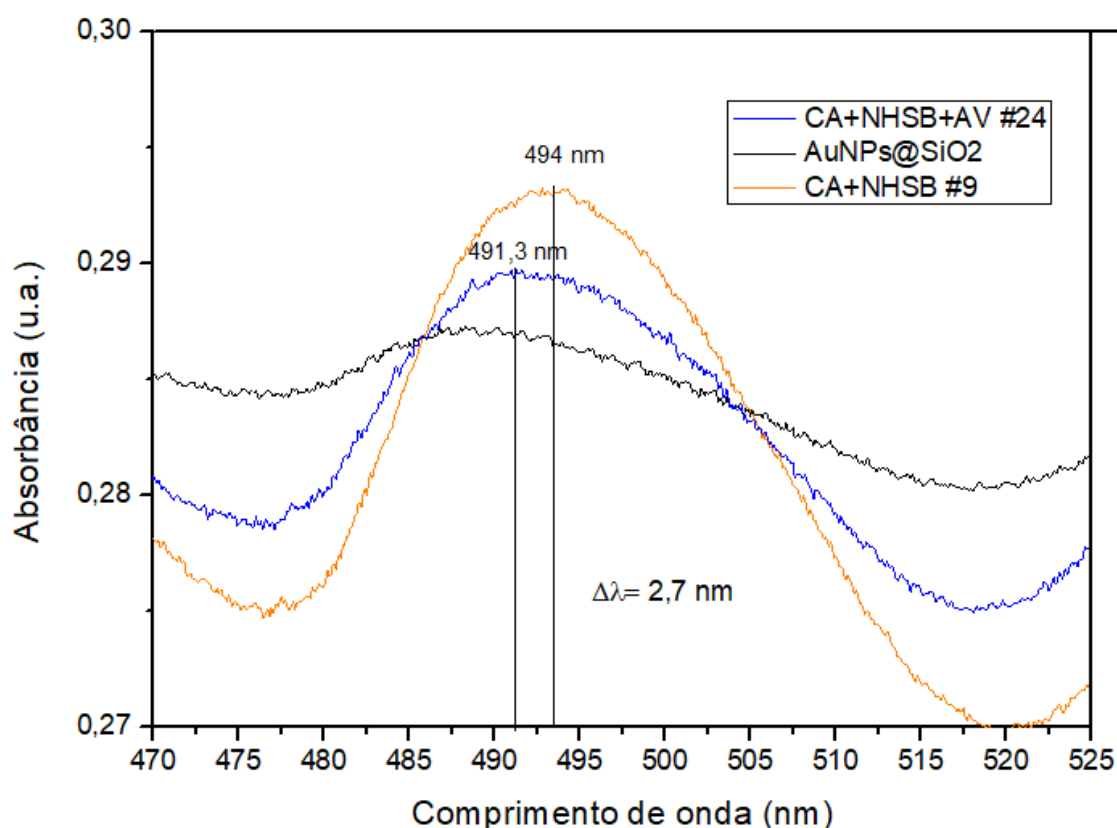


Figura 4-16 Espectro de absorção em função do comprimento de onda das amostras 9 (curva laranja) e 24 (curva azul) e do sistema AuNPs@SiO₂ (curva preta)

A seguir, comparamos as absorbâncias normalizadas entre sistemas CA+NHSB e CA+NHSB+AV. Todos os sistemas, quando comparados com o sistema AuNPs@SiO₂, apresentaram *redshift*.

Na Figura 4-17, é apresentado o espectro de absorbância de duas amostras distintas: uma contendo CA+NHSB (número 7 com 10^{-6} M) e outra contendo CA+NHSB+AV (número 24) com concentração de avidina de 10^{-8} M. Através da comparação dos dois espectros, observou-se um deslocamento de pico $\Delta\lambda_{pico} = 8,9 \text{ nm}$. Esse espectro indica um *redshift* da amostra só com cisteamina e biotina para a amostra que contém também avidina.

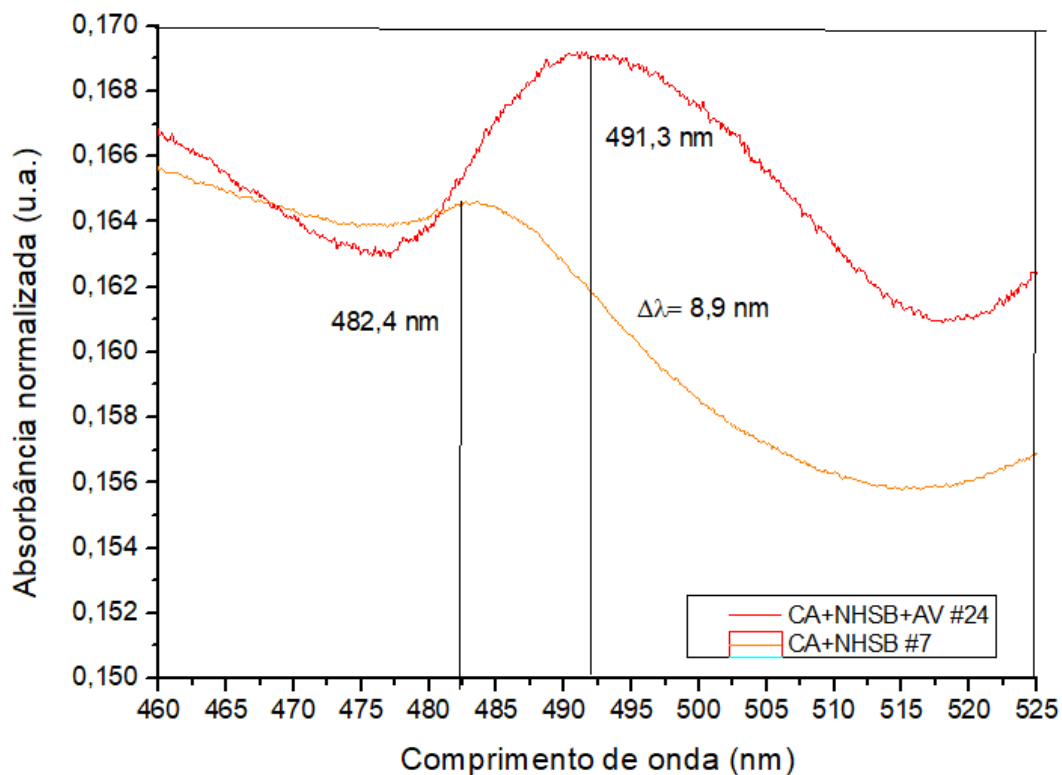


Figura 4-17 Espectro de absorção normalizada em função do comprimento de onda das amostras 7 (curva laranja) e 24 (curva vermelha)

Na Figura 4-18 pode-se observar também o espectro de absorbância de duas amostras distintas: uma contendo CA+NHSB (número 8) e outra contendo CA+NHSB+AV (número 24) com concentração de avidina de 10^{-8} M. Através da comparação, observou-se um deslocamento de pico $\Delta\lambda_{pico} = 1,5 \text{ nm}$. Esse espectro indica um pequeno *blueshift* da amostra só com cisteamina e biotina quando comparada com a amostra que contém também avidina. O blueshift pode ter sido causado pela inhomogeneidade da amostra 8, pois ela apresentou rachaduras pós síntese das AuNPs. Apesar disso, comparadas ao sistema AuNPs@SiO₂, ambas as amostras apresentaram redshift, como esperado.

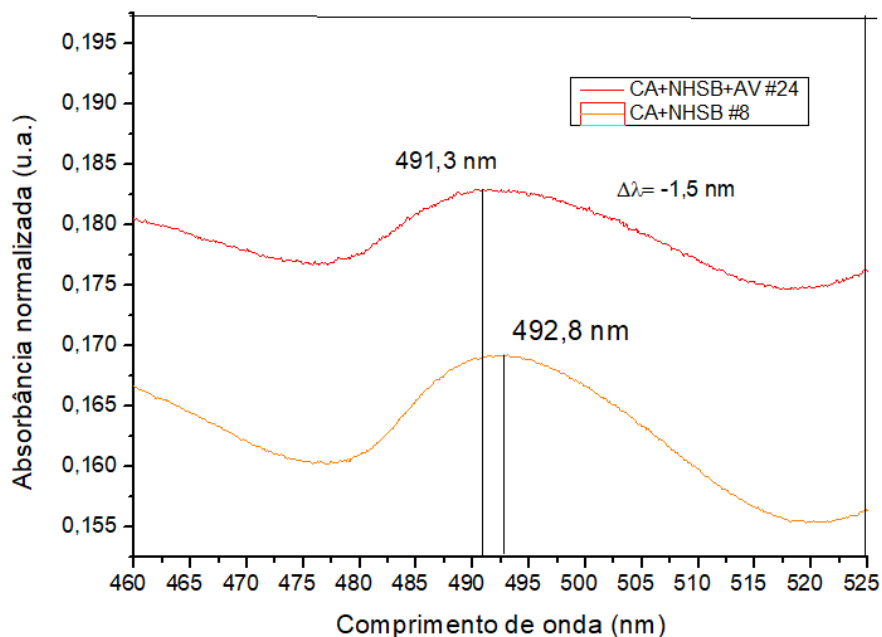


Figura 4-18 Espectro de absorção em função do comprimento de onda das amostras 8 (curva laranja) e 24 (curva vermelha)

Já na figura 4-19, observou-se novamente um *redshift*, com um deslocamento de pico $\Delta\lambda_{pico} = 11,5 \text{ nm}$. O espectro de absorbância compara a amostra de número 9 (CA+NHSB – 10^{-6} M) com a amostra de número 24 (CA+NHSB+AV), com concentração de avidina de 10^{-8} M .

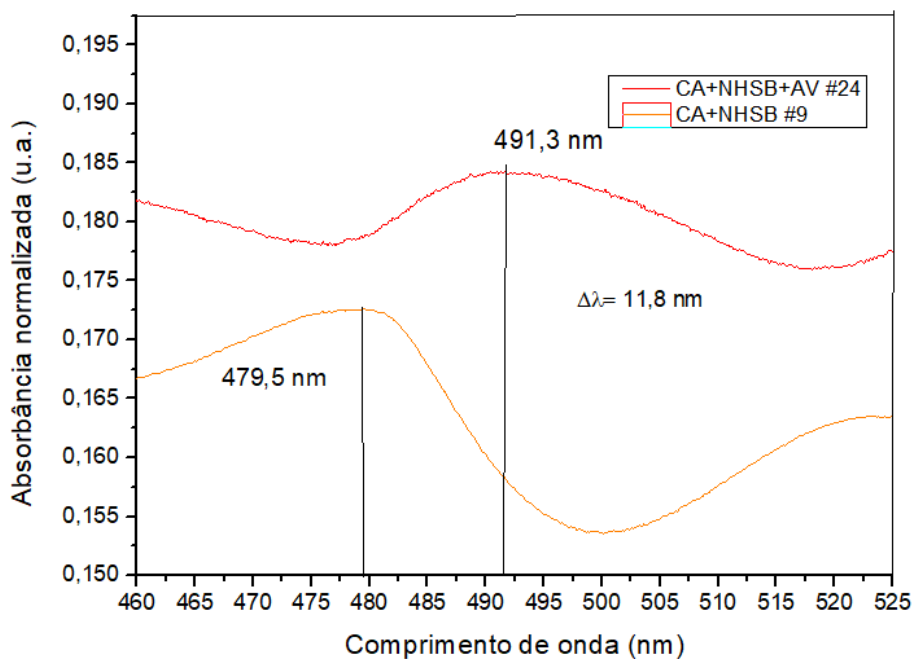


Figura 4-19 Espectro de absorção em função do comprimento de onda das amostras 9 (curva laranja) e 24 (curva vermelha)

No biossensor AuNPs@SiO₂, observou-se que as amostras 7 e 9 apresentaram um deslocamento da banda de ressonância LSPR para valores maiores de comprimento de onda (*redshift*). Esse deslocamento pode ser explicado pelo aumento na massa ou na concentração das moléculas presentes na superfície do sensor. Já a amostra 8 apresentou um deslocamento da banda de ressonância LSPR para valores menores de comprimento de onda, (*blueshift*), podendo ser explicado por conta da rachadura na amostra. Para confirmar a funcionalização das amostras, é necessário observar um deslocamento de pico significativo, o que foi observado nas amostras analisadas, utilizando-se para a análise de absorbância uma resolução de 0,1 nm no espectrofotômetro Lambda 950.

No capítulo seguinte, apresentam-se as conclusões do proposto trabalho.

5 Conclusões e Perspectivas Futuras

Nesta dissertação investigou-se as propriedades ópticas de sistemas compostos por nanoilhas de ouro funcionalizadas com avidina, na superfície de monolitos de xerogéis de sílica (SiO_2), visando o desenvolvimento de uma plataforma sólida inorgânica e inerte para biossensores baseados na Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR), devido à sua elevada sensibilidade a alterações no ambiente químico próximo. Para a criação das nanoilhas de ouro sobre substratos de xerogéis de SiO_2 , foi utilizado o método de deposição de filme de Au seguida de tratamento térmico (AuNP@SiO_2). Estes sistemas foram funcionalizados em dois passos consecutivos, inicialmente com cisteamina (CA) e depois com N-hidroxissuccinimidobiotina (NHSB) para a detecção de avidina em solução aquosa. O processo de funcionalização foi monitorado por absorvância óptica UV-VIS para cada passo. Soluções aquosas com diferentes concentrações (10^{-6} M para o primeiro grupo de amostras –1 a 16-; 10^{-7} M para as amostras 19, 20 e 21; 10^{-8} M para as amostras 24, 25 e 26; 10^{-9} M para as amostras 32, 33 e 36 e 10^{-10} M para as amostras 40, 41 e 42) de avidina foram utilizadas para testar a detecção e a sensibilidade.

As amostras de CA+NHSB+AV apresentaram um *redshift* (52 nm) no deslocamento de pico de absorção LSPR em relação ao comprimento de onda do pico de LSPR do sistema AuNPs@SiO_2 . A ocorrência do deslocamento do pico de absorção das amostras em cada etapa confirma a ligação da molécula com as AuNPs. As concentrações de avidina que apresentaram um maior deslocamento foram 10^{-8} M e 10^{-9} M, apresentando um deslocamento médio de 79,72 nm e 80,56 nm respectivamente.

Além disso, verificou-se a efetividade da funcionalização trabalhada ao aumentarmos a espessura do filme depositado de 6 nm no primeiro grupo de amostras para 20 nm no segundo grupo de amostras. As bandas nas curvas de absorção do segundo grupo se tornaram mais definidas, apresentando uma melhor

definição no pico de deslocamento LSPR, tendo em vista a melhor resolução do Perkin Elmer Lambda 950.

Foi observado também o tempo de prateleira do biossensor CA+NHSB+AV, que mesmo armazenado em temperatura ambiente por um longo período (mais de um ano) ainda apresenta sensibilidade e um deslocamento de $6,6 \text{ nm}$ (com relação ao sistema AuNPs@SiO₂), o que indica uma boa preservação do sistema.

Como proposta de trabalhos futuros, pretende-se otimizar a metodologia empregada para detecção de avidina aviária para detecção de doenças. A detecção de doenças já foi realizada pelo Laboratório de Optoeletrônica da PUC-Rio através de colaborações, e esse sistema se mostrou promissor para a possível aplicação na detecção de outros analitos.

6 Referências Bibliográficas

- [1] CAMARA, Alexandre R. et al. Dengue immunoassay with an LSPR fiber optic sensor. **Optics express**, v. 21, n. 22, p. 27023-27031, 2013.
- [2] SANTOS, Mariana Gisbert Jardim dos. **Protótipo de sensor a fibra óptica para a detecção de peróxido de hidrogênio em leite de vaca**. 2017. 61 f.
- [3] ROGERS, K. R. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, n. 1-2, p. 222-231, 2006.
- [4] MENDES, Adriano A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.
- [5] MCNAUGHT, Alan D. et al. **Compendium of chemical terminology**. Oxford: Blackwell Science, 1997.
- [6] DA SILVA, Larissa de Souza Vieira et al. Revisão sucinta sobre revestimento sol-gel anticorrosivo para aços. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 36283-36300, 2021.
- [7] QUADROS, Matheus Henrique. **Propriedades ópticas e elétricas de materiais híbridos de sílica/orgânico à base de GPTS: TEOS preparados pelo método sol-gel**. 2015.
- [8] DA ROCHA, SORAYA MR. Síntese e caracterização de precursores para catalisadores termicamente estáveis à base de lantanídeos pelo método sol-gel. 2005.
- [9] CERQUEIRA, Andreia et al. Characterization of magnesium doped sol-gel biomaterial for bone tissue regeneration: The effect of Mg ion in protein adsorption. **Materials Science and Engineering: C**, v. 125, p. 112114, 2021.
- [10] VENTURA, Bartolomeo Della et al. Colorimetric test for fast detection of SARS-CoV-2 in nasal and throat swabs. **ACS sensors**, v. 5, n. 10, p. 3043-3048, 2020.
- [11] RONKAINEN, Niina J.; HALSALL, H. Brian; HEINEMAN, William R.

- Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.
- [12] JOSÉ DE BRITO SILVA, Jorge. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezelétrico de DNA para diagnósticos clínicos**. 2004.
- [13] DAMBORSKÝ, Pavel; ŠVITEL, Juraj; KATRLÍK, Jaroslav. Optical biosensors. **Essays in biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 91-100, 2016.
- [14] FERNANDES, Jessica Colnaghi. **Biossensores de pH, ureia e glicose utilizando a microeletrônica de filmes finos de AZO e TIO₂**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [15] PANDOLI, Omar. **Síntese em sistemas microfluídicos de nanopartículas de CdTe e de Ag para estudo qualitativo de interação em fluxo e preparação de filmes finos desses nanomateriais**. 2017. Tese de Doutorado. PUC-Rio.
- [16] LI, Guoru et al. Graphene Oxide/Multiwalled Carbon Nanotubes Assisted Serial Quadruple Tapered Structure-Based LSPR Sensor for Glucose Detection. **IEEE Sensors Journal**, v. 22, n. 17, p. 16904-16911, 2022.
- [17] GONÇALES, Vinícius Romero. **Nanoestruturação de filmes finos para utilização em eletrodos enzimáticos**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [18] SOUZA, Tâmera Tais de Lima. **Estudo da hemoglobina em filmes nanoestruturados como mediador eletroquímico na aplicação em biossensores**. 2014.
- [19] AVELINO, Karen Yasmim Pereira dos Santos. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados em nanoestruturas para o diagnóstico ultrasensível do oncogene quimérico BCR/ABL**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- [20] ALFAYA, Antonio AS; KUBOTA, Lauro T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.
- [21] SILVA, J. A.; MACHADO, Y. e CARVALHO, I. C. S. Dispositivos Plasmônicos em Nanobio-sensor e Nanofotônica, **XXVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnologia da PUC-Rio**. 2019. Disponível em: <<https://bit.ly/3GWyZsH>>. Acesso em: 08/03/2023
- [22] PETRYAYEVA, Eleonora; KRULL, Ulrich J. Localized surface plasmon

- resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. **Analytica chimica acta**, v. 706, n. 1, p. 8-24, 2011.
- [23] WANG, Changlong; ASTRUC, Didier. Nanogold plasmonic photocatalysis for organic synthesis and clean energy conversion. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 20, p. 7188-7216, 2014.
- [24] HEO, Nam Su et al. Affinity peptide-guided plasmonic biosensor for detection of noroviral protein and human norovirus. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 24, p. 318-325, 2019.
- [25] NAVA, Giovanni et al. Label-free optical biosensors in the pandemic era. **Nanophotonics**, 2022.
- [26] KHANSILI, Nishtha; RATTU, Gurdeep; KRISHNA, Prayaga M. Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 265, p. 35-49, 2018.
- [27] XU, Tianping; GENG, Zhaoxin. Strategies to improve performances of LSPR biosensing: Structure, materials, and interface modification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 174, p. 112850, 2021.
- [28] TROLISE, Rodrigo Matias. **Desenvolvimento de metodologia para funcionalizar superfícies de ouro com biomoléculas. Construção de biosensor para detecção de citocromo c**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [29] ELDLIO, Mohamed; CHE, Franklin; CADA, Michael. Drude-Lorentz model of semiconductor optical plasmons. In: **IAENG Transactions on Engineering Technologies: Special Issue of the World Congress on Engineering and Computer Science 2012**. Springer Netherlands, 2014. p. 41-49.
- [30] SUBBIAH, R.; VEERAPANDIAN, M.; S YUN, K. Nanoparticles: functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 36, p. 4559-4577, 2010.
- [31] LYU, Yanchao et al. The biotin–avidin interaction in biotinylated gold nanoparticles and the modulation of their aggregation. **Nanomaterials**, v. 11, n. 6, p. 1559, 2021.
- [32] DIAMANDIS, Eleftherios P.; CHRISTOPOULOS, Theodore K. The biotin-(strept) avidin system: principles and applications in biotechnology. **Clinical chemistry**, v. 37, n. 5, p. 625-636, 1991.

- [33] WOOD, GARY S.; WARNKE, R. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, n. 10, p. 1196-1204, 1981.
- [34] FOCSAN, Monica et al. A simple and efficient design to improve the detection of biotin-streptavidin interaction with plasmonic nanobiosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 728-735, 2016.
- [35] MAIER, Stefan A. et al. **Plasmonics: fundamentals and applications**. New York: springer, 2007.
- [36] LIZ-MARZAN, L. M. et al. LSPR-based nanobiosensors. **Nano today**, v. 4, n. 3, p. 244-251, 2009.
- [37] COUTO, R. T. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro para aplicação em sensoriamento**. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Dezembro 2020.
- [38] RAO, A. Venkateswara; BHAGAT, Sharad D. Synthesis and physical properties of TEOS-based silica aerogels prepared by two step (acid–base) sol–gel process. **Solid State Sciences**, v. 6, n. 9, p. 945-952, 2004.
- [39] BRINKER, C. Jeffrey; SCHERER, George W. **Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing**. Academic press, 2013.
- [40] BARBER, David J.; FREESTONE, Ian C. An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy. **Archaeometry**, v. 32, n. 1, p. 33-45, 1990.
- [41] LANDAU, Miron V. Sol–gel process. **Handbook of Heterogeneous Catalysis: Online**, p. 119-160, 2008.

8 Anexo I

Amostras (n°)	Data de síntese das AuNPs	Aspecto
Primeiro conjunto de amostras - Caracterização óptica utilizada: USB 4000 (Ocean Optics)		
1 - 7	17/09/2021	Apresentou rachadura após síntese
8 - 10	17/09/2021	Apresentou rachadura após síntese. Amostra quebrada.
11 - 16	17/09/2021	Apresentou rachadura após síntese
Segundo conjunto de amostras - Caracterização óptica utilizada: Lambda 950 (Perkin Elmer)		
17 - 28	29/07/2022	Não apresentou rachaduras
29 - 31	29/07/2022	Amostras com deposição na metade de sua superfície. Candidatas para MEV
32 - 38	29/07/2022	Não apresentaram rachaduras
39 - 42	12/09/2022	Não apresentaram rachaduras

Tabela 1 – Classificação dos xerogéis e aspecto posterior à síntese das AuNPs

Amostra (nº)	CA	NHSB	AV	Data de funcionalização	Aspecto
Primeiro conjunto de amostras - Caracterização óptica utilizada: USB 4000 (Ocean Optics)					
1 - 5	Sim	Não	Não	10/03/2022	Preparadas para receber AV - 10^{-6} M
6 - 10	Sim	Sim	Não	10/03/2022	Preparadas para receber AV - 10^{-6} M
11 - 12	Sim	Sim	Sim	10/03/2022	Concentração de AV - 10^{-6} M
13	Sim	Sim	Sim	10/03/2022	Concentração de AV - 10^{-6} M. Amostra imersa em MiliQ e seca com N ²
14	Sim	Sim	Sim	10/03/2022	Amostra descartada por contaminação.
15 - 16	Sim	Sim	Sim	10/03/2022	Concentração de AV - 10^{-6} M. Amostra imersa em MiliQ e seca com N ²
Segundo conjunto de amostras - Caracterização óptica utilizada: Lambda 950 (Perkin Elmer)					
17 - 18	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Amostra utilizada como referência.
19 - 21	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Concentração de AV - 10^{-7} M
22 - 23	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Amostra utilizada como referência.
24 - 26	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Concentração de AV - 10^{-8} M
27 - 28	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Amostra utilizada como referência.
29	Não	Não	Não	10/11/2022	Amostra não funcionalizada.
30	Não	Não	Não	10/11/2022	Amostra utilizada para MEV
31	Não	Não	Não	10/11/2022	Amostra não funcionalizada.
32-33	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Concentração de AV - 10^{-9} M
34 - 35	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Amostra perdida.

36	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Concentração de AV - 10^{-9} M
37 - 38	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Amostra utilizada como referência.
39	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Apresentou rachadura pós funcionalização.
40	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Concentração de AV - 10^{-10} M
41	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Concentração de AV - 10^{-10} M
42	Sim	Sim	Sim	10/11/2022	Concentração de AV - 10^{-10} M

Tabela 2 – Classificação dos xerogéis e aspecto posterior à funcionalização das amostras.