

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

ROSECLER SCACCHETTI KLEIN

**OBTENÇÃO DE SENSORES PLASMÔNICOS BASEADOS EM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

APUCARANA

2017

ROSECLER SCACCHETTI KLEIN

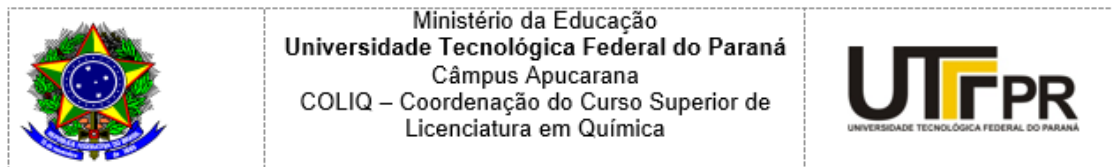
OBTENÇÃO DE SENSORES PLASMÔNICOS BASEADOS EM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Campus Apucarana, como requisito para a obtenção do título de Licenciada em Química.

Orientador: Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro

APUCARANA

2017



TERMO DE APROVAÇÃO

Título do Trabalho de Conclusão de Curso

Obtenção de Sensores Plasmônicos Baseados em Nanopartículas de Prata

por

Rosecler Scacchetti Klein

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado aos 22 de novembro de 2017, às 16 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciatura em Química, linha de pesquisa Biossensores Plasmônicos, do Curso Superior em Licenciatura em Química da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela banca examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro – ORIENTADOR

Prof. Dr Alessandro Bail – EXAMINADOR

Prof. Dr. Sandro Aurélio de Souza Venter – EXAMINADOR

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus porque sem ele nada seria possível.

Aos meus pais Cleuza e Bento por todos aprendizados de vida e por todas as condições possíveis para que eu me dedicasse aos meus estudos. E especialmente pelo amor e carinho.

Ao meu irmão Rodrigo, pela sua amizade e por estar sempre presente nos momentos mais difíceis e alegres da minha vida.

Agradeço ao professor Dr. Johny Paulo Monteiro pela paciência, e ajuda e atenção que sempre teve em relação a mim, o que permitiu a finalização desse projeto. E aos professores Dr. Alesandro Bail e Sandro Aurelio de Souza Venter por se disponibilizarem a ler e avaliar esse trabalho.

Aos meus queridos colegas Daphne, Douglas e Mateus pela ajuda oferecida e pelos momentos de descontração e em especial à minha amiga Katlyn, pela alegria, pelo abraço, pela confidencialidade e pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

E à todas as pessoas, que mesmo não mencionadas aqui, fizeram parte desta caminhada me apoiando sempre e torcendo por mim.

“Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter. O Espírito encarnado sofre constantes transformações por fora, a fim de acrisolar-se e engrandecer-se por dentro.”

Chico Xavier

RESUMO

KLEIN, ROSECLER. S. Estudo da otimização de síntese e estabilidade temporal de nanopartículas de prata para aplicação em substratos plasmônicos. 2017. p 42. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2017.

Com o desenvolvimento da tecnologia e da nanociência, tem sido observado um grande aumento no estudo e emprego de nanopartículas de prata (AgNPs) na construção de biossensores. AgNPs exibem algumas características interessantes para emprego em dispositivos, tais como: fácil manipulação, baixo custo de obtenção, absorção de luz característica na região do ultravioleta-visível, relativa alta sensibilidade óptica aos estímulos, entre outras. Os biossensores baseados em AgNPs mais comuns exploram o fenômeno de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR). O comprimento de onda que excita plasmons de superfície é altamente dependente do índice de refração do meio no entorno das nanopartículas e isso as tornam particularmente úteis na construção de biossensores para monitorar reações de superfície. Por essa razão, neste trabalho foi proposto o estudo da otimização da síntese de AgNPs, para produção de plataformas contendo deposições sucessivas de AgNPs. As AgNPs foram produzidas por meio da redução do precursor de íons prata (AgNO_3) em solução empregando borohidreto de sódio (NaBH_4). Para a síntese foi empregado diferentes quantidades de AgNO_3 . Além disso, estudou-se a estabilidade temporal das suspensões produzidas e as suas estabilidades em diferentes condições de estocagem. A solução sintetizada na condição ótima (mais estável) foi utilizada para preparar substratos plasmônicos a partir de vidros ativados com 3-aminopropiltrietóxisilano. A melhor condição de síntese foi aquela que empregou 14 mL de solução de AgNO_3 para 50 mL de solução de NaBH_4 , ambas 1×10^{-03} mol/L. O armazenamento ao abrigo da luz e refrigerado, propiciou maior manutenção das propriedades da suspensão coloidal ao longo dos dias. Estudos de sensibilidade óptica dos substratos obtidos com AgNPs na melhor condição foram obtidos a partir de espectros de absorção de luz de substratos contendo cinco subseqüentes deposições de AgNPs imersos em soluções com diferentes índices de refração, na qual a sensibilidade obtida foi de 160,3 nm/UIR. Esse valor é considerado alto, se comparado com outros substratos relatados na literatura. Portanto, o substrato plasmônico pode ser utilizado para detecção de biomoléculas como sensor plasmônico.

Palavras-chave: Nanopartículas de Prata. Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada. Biossensor.

ABSTRACT

KLEIN, ROSECLER. S. Study of the optimization of synthesis and temporal stability of silver nanoparticles for application in plasmid substrates. 2017. p 42 Course Conclusion Work – Federal Technological University of Paraná. Apucarana, 2017.

With the development of technology and nanoscience it has been observed a considerable rise in studies and usage of silver nanoparticles (AgNPs) in the construction of biosensors. AgNPs show interesting improvements related to its use in sensorial devices, such as: easy manipulation, low cost of acquisition, characteristic light absorption in the ultraviolet-visible region, relative high optical sensitivity to stimuli, among others aspects. The most common biosensors based in AgNPs, exploiting the Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) phenomenon. The maximum wavelength of absorption depends highly on the refractive index in nanoparticles' surroundings, which makes them particularly useful in biosensors' construction to monitor reactions that occur on its surface. Therefore, the objective of this research is to study the optimization of AgNPs' synthesis, for the production of multilayer content platforms of AgNPs. The AgNPs will be produced through the reduction by the silver ion precursor (AgNO_3) in solution using sodium borohydride (NaBH_4). For the synthesis was employed different quantities of AgNO_3 . In addition, the temporal stability of the suspensions produced and their stabilities under different storage conditions were studied. The solution was synthesized in the optimum (more stable) condition to prepare plasmid substrates from activated glass with 3-aminopropyltriethoxysilane. The best synthesis condition was the one that used 14 mL of AgNO_3 solution to 50 mL of NaBH_4 solution, both 1×10^{-3} mol/L. The storage under light and refrigerating, provided greater maintenance of the properties of the colloidal suspension throughout the days. Optical sensitivity studies of substrates obtained with AgNPs in the best condition were obtained by obtaining light absorption spectra of substrates containing five layers of AgNPs immersed in solutions with different refractive, in which the sensitivity obtained was 160.3 nm / UIR. This value is considered high when compared to other substrates in the literature. Therefore, the plasmid substrate can be used to detect biomolecules as a plasmid sensor.

Keywords: Silver Nanoparticles. Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR). Biosensor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comprimentos de onda do máximo de absorção ($\lambda_{MÁX}$) e largura das bandas à meia altura (nm) obtidas para AgNPs (14 mL de AgNO_3 e 50 mL de NaBH_4 , ambas 1×10^{-03} mol/L) nas diferentes condições de armazenamento considerando período de sete dia.....31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática de um biossensor.....17
- Figura 2: Diagrama esquemático ilustrando a formação dos plasmons de superfície localizados em partículas esféricas.....21
- Figura 3: Imagem das soluções com uma concentração de borohidreto de sódio constante e variando o volume da solução de nitrato de prata com uma concentração de 1×10^{-3} mol/L. A imagem das amostras representando as soluções cujos valores de volumes da direita para esquerda são: 14, 11, 8, 5 e 2 mL, respectivamente.....25
- Figura 4: Espectros de absorção de suspensões coloidais de AgNPs sintetizadas em 5 diferentes condições, sendo empregado sempre 50 mL de solução de borohidreto de sódio 1×10^{-3} mol/L e diferentes volumes de solução de AgNO_3 1×10^{-3} mol/L. E o comprimento de onda máximo em cada curva apresenta tamanhos diferentes de AgNPs.
.....26
- Figura 5: Espectro das suspensões de AgNPs obtidas com a) 2; b) 5 c) 8; d) 11 e e)14 mL de solução de AgNO_3 e 50 mL de solução de NaBH_4 , ambas com concentração 1×10^{-3} mol/L. Condição de estocagem: abrigo de luz e refrigerado..... 28
- Figura 6: Espectros de absorção para a suspensão de AgNPs obtidas na condição de 14 mL AgNO_3 (1×10^{-3} mol/L) e 50 mL de NaBH_4 (1×10^{-3} mol/L) com respectivas condições de armazenagem: a) abrigo de luz e à temperatura ambiente; b) abrigo da luz e refrigerado; c) exposto à luz e à temperatura ambiente.....30

Figura 7: Representação dos estágios de ativação da superfície do vidro para obtenção do substrato plasmônico.....33

Figura 8: Espectros das 5 subseqüentes deposições de AgNPs.....33

Figura 9: Espectros avaliativos para estabilidade temporal do substrato plasmônico.....36

Figura 10: a) Espectros de absorção do substrato plasmônico obtidos com 5 deposições sucessivas de AgNPs imersos em meios com diferentes índices de refração e em b) é mostrada curva de sensibilidade. O detalhe em “b” apresenta a ampliação dos máximos das bandas plasmônicas de “a”.
.....36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REFERENCIAIS TEÓRICOS	15
3.1 SENSORES	15
3.2 BIOSSENSORES	16
3.2.1 BIOSSENSORES ÓPTICOS	18
3.3 RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE	18
3.3.1 PRINCIPAIS VANTAGENS DA TÉCNICA SPR	19
3.4 RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE LOCALIZADO	20
3.4.1 SENSORES DE LSPR BASEADOS EM AgNPs	21
3.5 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	23
4.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE TEMPORAL	23
4.3 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO PLASMÔNICO	23
4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	25
5.2 PRODUÇÃO DE SUBSTRATOS PLASMÔNICOS CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA	32
5.2.1 ESTUDO DA ESTABILIDADE TEMPORAL DO SUBSTRATO	34
5.2.2 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DO SUBSTRATO	35
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a comunidade científica e tecnológica tem mostrado interesse por produtos de escala nanométrica. O conceito sobre o controle e a manipulação da matéria à escala atômica foi introduzido ao meio científico pelo físico Richard Feynman, em sua palestra proferida em 1959, ao comparar uma célula que armazena dados sobre as características específicas de cada ser vivo, com o desenvolvimento de produtos em nanoescala. Além disso, apresentou um procedimento para evaporação de substâncias, agora chamada de síntese química, que serviu como base para a nanotecnologia atual (PETERSON, 2004).

Nanotecnologia é habilidade de se manipular a forma e o tamanho da matéria com pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica (1 nm é igual 10^{-9} m) e, desta forma, oportuniza a produção de sistemas com características e aplicações inovadoras, além de oferecer benefícios para diferentes campos da pesquisa. Alguns campos que tem explorado o uso da nanotecnologia são: a tecnologia de comunicação e informação, biotecnologia, eletrônica, medicina, entre outras. Há algum tempo, são desenvolvidos sensores eletrônicos nanotecnológicos que identificam substâncias químicas em ambientes, revelam drogas no corpo humano, ou outros que são capazes de gerar imagens moleculares (ROYAL SOCIETY, 2004).

Em conjunto com o desenvolvimento de nanossensores, uma enorme variedade de sistemas ópticos tem sido empregado na construção de sensores e biossensores, incluindo, entre outros, ressonância de plasmon de superfície (SPR), interferometria, espectrofotometria e elipsometria (HOMOLA,1999).

Entre os dispositivos ópticos, destacam-se aqueles que operam explorando o efeito ressonância de plasmon de superfície (SPR), que pode ser utilizado para estudos de fenômenos de superfície, controlando mudanças do índice de refração sobre ela. O efeito SPR é definido como uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal e o outro, um dielétrico (GREEN et al., 2000). Esse efeito é altamente influenciado pelo índice de refração na interface metal dielétrico e essa característica é

empregada no desenvolvimento de dispositivos sensoriais que monitoram eventos de ligação na superfície do transdutor.

No que diz respeito à ressonância plasmônica localizada de superfície (LSPR), a qual pode ser vista como uma variação do efeito SPR, ocorre uma interação ressonante da luz eletromagnética incidida com os elétrons de uma nanopartícula metálica (prata e ouro são mais comuns). Uma das suas principais vantagens é a capacidade de trabalhar individualmente, para a identificação de diferentes analitos, com menor preço e fazendo análise em tempo real (LIANG; WEI; XU, 2016).

O presente trabalho tem como um dos seus principais objetivos sintetizar e caracterizar diferentes tamanhos de nanopartículas de prata (AgNPs) para o desenvolvimento de um dispositivo plasmônico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a síntese de AgNPs para a produção de um substrato plasmônico sensível e estável.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar AgNPs com tamanhos diferentes;
- Estudar a estabilidade temporal de AgNPs produzidas;
- Imobilizar AgNPs de diferentes tamanhos sobre substratos de vidro;
- Obter sucessivas deposições de AgNPs sobre vidro;
- Estudar a estabilidade temporal de substratos contendo AgNPs;
- Avaliar a sensibilidade óptica do substrato baseado em AgNPs frente a variações de índice de refração;
- Caracterizar os materiais produzidos por meio de Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-Visível (UV-Vis).

3. REFERENCIAIS TEÓRICOS

3.1 SENSORES

O aumento da procura por técnicas mais efetivas de análise biomolecular tem chamado atenção dos pesquisadores nos últimos tempos. Os sensores são dispositivos que medem ou detectam eventos ou mudanças físico-químicas de um modo eficaz provendo uma resposta normalmente baseada em um sinal elétrico ou óptico (WANG et al., 2013). Os estudos direcionados para o preparo de sensores cresceram significativamente devido à procura pelo aprimoramento desses materiais com tecnologia mais sofisticada, tendo em vista uma maior eficiência e melhor preço de manufatura. O aumento da atenção dada a estes dispositivos é devido as aplicações em diversas áreas, tais como, industrial, ambiental e médica (SINGH; THAPA e KUMAR, 2015).

Dentre os diferentes setores da indústria, como a química, farmacêutica, automobilística e biomédica, considerando também os outros âmbitos nas pesquisas relacionadas ao controle ambiental ou alimentar, têm-se em diversas etapas a necessidade do emprego de sensores que possuam um alto desempenho analítico. Assim, seria interessante a busca por novos materiais que possam ser aplicados no desenvolvimento de novos dispositivos dando-lhes maior rapidez de produção, preço mais acessível e, preferencialmente, incrementando o desempenho analítico. Se correlacionado com os métodos clássicos de análise quantitativa, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) ou Análise de Enzima Imuno Adsorvida (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), os sensores possuem uma série de vantagens, tais como: tempo de análise menor, possibilidade de miniaturização, manuseio relativamente fácil, portabilidade, além de baixo custo (COOPER, et al., 1998). Existem diversos tipos específicos de sensores, tendo em vista que os mais comuns, são os biossensores (SKOTADIS, E. et al., 2013), imunossensores (SINGH, M. et al. 2015) e os sensores químicos (GONG, Y. et al., 2015).

3.2 BIOSENSORES

O primeiro a falar de conceitos sobre biossensores foi Leyland C. Clark em 1962, que explicou os eletrodos baseados em enzimas. Fundamentado no eletrodo de oxigênio, sua antiga criação, Clark apresentou que a identificação eletroquímica do oxigênio ou peróxido de hidrogênio poderia servir como o começo para instrumentos bioanalíticos, utilizando imobilização das enzimas adequadas. Um exemplo tradicional é o biossensor para a detecção de glicose em amostras humanas de pessoas com diabetes, que usa a imobilização de enzima glicose oxidase, sobre um eletrodo de platina (TURNER, 2013). Desta maneira, os biossensores são pequenos dispositivos que utilizam reações biológicas para detecção de analitos-alvo biológicos (WANG, 2000).

A fiscalização ambiental e as indústrias de análise alimentícia e clínica necessitam de aparelhos seletivos para a identificação de biomoléculas. A maioria dos biossensores podem ser considerados equipamentos alternativos aos métodos analíticos tradicionais, uma vez que apresentam características exclusivas, como manuseamento e preparo relativamente fácil, respostas rápidas e propensão para tamanhos miniaturizados e ainda a produção pode ser de baixo custo (SASSOLAS; BLUM e LECA-BOUVIER. 2012).

Um biossensor (Figura 1) é basicamente um dispositivo composto de dois elementos: biorreceptor e o transdutor. O biorreceptor é constituído por uma biomolécula sensível imobilizada, podendo ser enzimas, anticorpos, entre outros, possuindo a função de detectar o analito de interesse. E o transdutor tem a função de converter o sinal bioquímico resultante da interação do analito com o biorreceptor em um parâmetro físico ou químico quantitativo, geralmente um sinal eletrônico é proporcional à concentração da amostra estudada. Sendo assim, a intensidade do sinal produzido é diretamente ou inversamente proporcional à concentração do analito (SPICHIGER-KELLER, 2007).

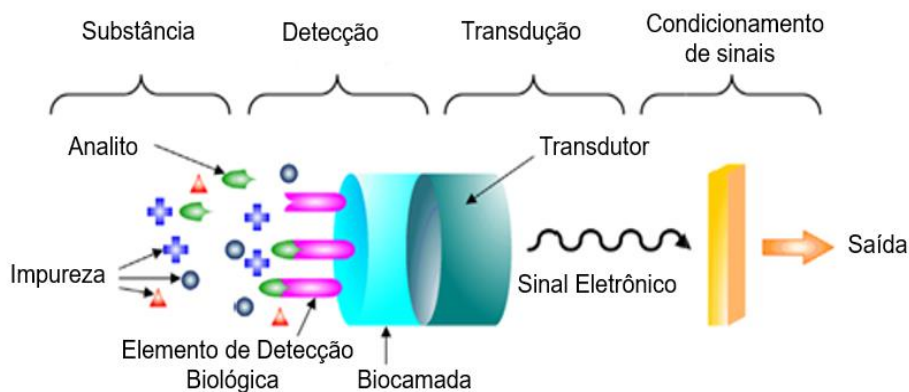


Figura 1: Representação esquemática de um biossensor.

Fonte: LEE e YOOK (2014)

Para o biossensor ser considerado um dispositivo confiável nas análises, ele deve conter algumas propriedades fundamentais como: elevadas seletividade e sensibilidade, assim como baixo limite de detecção (LD) e curto tempo de resposta (SPICHIGER-KELLER, 2007)

Alta seletividade diz respeito à capacidade de discriminar analitos diferentes, mesmo que forem semelhantes estruturalmente e funcionalmente. Desta forma, possuir uma alta seletividade significa dizer que, embora possam estar presentes em solução substâncias interferentes, suas contribuições para o sinal global serão irrelevantes (SPICHIGER-KELLER, 1998).

A medida da sensibilidade é a medida da variação no sinal da resposta considerando uma dada variação na concentração do analito. A sensibilidade pode ser encontrada a partir do coeficiente angular da curva analítica (concentração do analito *versus* a resposta do sistema). Se a curva analítica for linear, a sensibilidade será constante e independente da concentração. Logo, se a curva analítica não for linear, a sensibilidade variará com a concentração e não terá um valor exato (SKOOG, 2006). É esperado que os sensores apresentem elevadas respostas frente a baixas concentrações de analito e que exibam resposta linear.

É fundamental ainda que um sensor tenha um tempo de resposta relativamente curto para que análise se torne conveniente (SPICHIGER-KELLER, 1998). Além disso, espera-se que os biossensores sejam capazes de detectar concentrações muito baixas do analito (SPICHIGER-KELLER, 1998), isto é, que exiba pequeno LD.

Os biossensores podem ser classificados com base nos diferentes mecanismos de transdução de saída, tais como térmico, piezoelétrico, eletroquímico e óptico. O conhecimento relacionado à transdução óptica surgiu há pouco tempo no mercado como um instrumento eficiente, preço acessível e confiável, proporcionando o desenvolvimento de novos processos para identificação biológica utilizando biossensores (MCPOLIN, 2009).

3.2.1 BIOSSENSORES ÓPTICOS

A tecnologia dos biossensores ópticos apresenta diversas vantagens quando comparada com sensores clássicos, como a sensibilidade em longa distância, imunidade eletromagnética, medidas em tempo real, seletividade (ou até especificidade), entre outras (WANDERMUR, et al., 2014). Os fundamentais constituintes que compõe um sensor óptico são os seguintes: sistema óptico de detecção, fonte de luz, elemento de reconhecimento biológico e meio de transmissão óptica. Existem certas técnicas de biossensoriamento óptico que vem sendo largamente empregadas, dentre elas destacam-se a absorção, luminescência e SPR (ou LSPR) (HO, M. et al., 2014).

Os sensores fundamentados em SPR (ou LSPR) são um dos mais versáteis métodos de análise de interações bioquímicas em estruturas ligadas próximas à superfície do metal. O seu desempenho tem mostrado que os dispositivos são bastante sensíveis às mudanças no índice de refração devido à adsorção subsequentes de deposições moleculares na superfície de um metal transdutor (SHIN, Y. et al., 2010). Dessa maneira, pode-se evidenciar as reações em tempo real com alta seletividade e sensibilidade, imobilizando-se moléculas na superfície metálica (HONG et al., 2012). À frente dessas peculiaridades, diversos estudos referem a aplicação de sensores baseados em SPR na identificação de inúmeras substâncias biológicas, tais como as proteínas (MCGRATH, 2013), e o DNA (LUAN et al, 2011).

3.3 RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE

O fenômeno de Plasmons de Superfície (SPs) foi amplamente reconhecido no ramo da ciência através do trabalho de Ritchie na década de

1950 (RITCHIE, 1957). Mas, a primeira observação registrada sobre os Plasmons de Superfície (SPs) foi em 1902, quando o professor R. W. Wood notou que ao se incidir luz em uma grade de difração metálicas, algumas faixas escuras eram detectadas e a magnitude da refletância correspondente era reduzida. Esse evento ficou conhecido como “Anomalias de Wood” (MAYSTRE, 2012). O trabalho de Ritchie justificou as anomalias devidas à excitação de SPs.

Os SPs são ondas que se propagam em toda extensão da superfície de metal. Essas são particularmente ondas de luz confinadas na superfície devido a sua interação com elétrons da banda de condução do metal. Nesta interação, os elétrons livres respondem coletivamente por oscilações em ressonância com a onda luminosa. A interação ressonante entre a superfície carregada oscilante e o campo eletromagnético da luz constitui o SP, originando suas propriedades únicas como por exemplo, sua alta sensibilidade a mudanças de índice de refração na superfície do metal (BARNES; DEREUX e EBBESEN, 2003).

A decisão da escolha do metal a ser utilizado é crítica, uma vez que o metal deve apresentar propriedades que possibilitam a propagação da onda plasmônica na superfície. Para isso, usam-se os metais que têm constante dielétrica imaginária positiva e pequena, e parte real negativa. Os metais mais apropriados são alumínio, cobre, prata e ouro, dentre os quais a prata e ouro são mais utilizados (RICH; MYSZKA, 2000).

3.3.1 PRINCIPAIS VANTAGENS DA TÉCNICA SPR

A técnica SPR apresenta diversas vantagens frente a outros métodos de detecção convencionais: as respostas são obtidas em tempo real na medida em que as reações estão acontecendo, viabilizando assim uma análise imediata por meio do sistema analítico; emprega reconhecimento por meio de reações biológicas as quais geram análises específicas; pode ser produzidos por sensores imunológicos SPR, os quais podem detectar analitos com medições sem erros, evitando complicações em diagnósticos; e monitoramento de pequenas moléculas com grande sensibilidade, sendo essa sua aplicação mais significativa, a qual aumentou muito a utilidade dos biossensores para a

detecção de drogas (SHANKARAN; GOBI e MIURA, 2007). Há vários designs de biossensores SPR, sendo que aqueles baseados no uso de nanopartículas metálicas são bastante comuns. Biossensores plasmônicos desse tipo exploram o efeito LSPR.

3.4 RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE LOCALIZADO

As nanopartículas metálicas apresentam propriedades ópticas próprias o que as distinguem dos metais em tamanho comum. Por essa razão, as nanopartículas tornaram-se atraentes para os pesquisadores, devido às numerosas aplicações em diferentes ramos do conhecimento. Uma dessas propriedades é conhecida como Ressonância de Plasmons de Superfície Localizado (LIANG, WEI e XU, 2016).

O LSPR é um fenômeno óptico originado por uma onda eletromagnética que fica aprisionada em nanopartículas condutoras menores que o comprimento de onda da luz incidente. Este fenômeno é percebido quando a frequência de oscilação dos fótons incididos coincide com a oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução nas nanopartículas (Figura 2) (PETRYAYEVA; KRULL, 2011). Seria uma espécie de SPR confinado em três dimensões.

Esta interação gera oscilações de plasmon localizados que são adequadas à frequência de ressonância, sendo que essas dependem intimamente da morfologia, da composição, da separação entre as nanopartículas que constituem o plasmon e além disso, do meio dielétrico que envolve essas nanopartículas. O campo eletromagnético localizado provocado pela LSPR faz com que as nanopartículas metálicas sejam transdutores extremamente sensíveis a pequenas mudanças no índice de refração do meio. Essas alterações podem ser observadas por meio do deslocamento espectral do espectro de extinção e espalhamento (PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

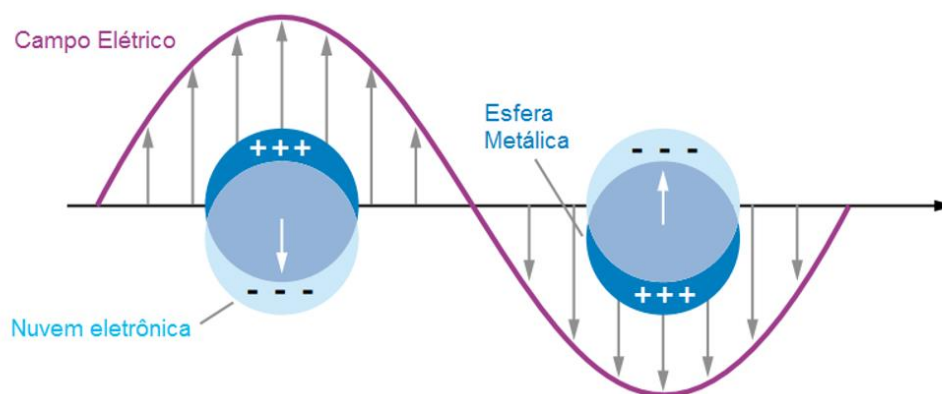


Figura 2: Diagrama esquemático ilustrando a formação dos plasmons de superfície localizado em partículas esféricas.

Fonte: WILLETS e VAN DUYNE (2007).

As nanopartículas apresentam uma forte banda de absorção no espectro UV-Visível (devido ao LSPR) que não é visualizada para o mesmo material em escalas macroscópicas. Portanto, a espectroscopia UV-Visível é a técnica mais eficiente para avaliar qualitativamente a ocorrência, o tamanho médio e a distribuição de tamanhos das nanopartículas metálicas por meio dos valores de máximo e de largura à meia altura da banda plasmônica (HAO; SCHATZ; HUPP, 2004; PODLIPENSKY, A. et al, 2004).

3.4.1 SENSORES DE LSPR BASEADOS EM AgNPs

A propriedade óptica LSPR para AgNPs é muito sensível à mudança no índice de refração perto da superfície das nanopartículas. A resposta das nanopartículas a essas mudanças pode ser analisada e medida como um deslocamento da banda LSPR em um espectro de absorção na região do UV-Visível. Assim, o deslocamento é a resposta monitorada durante a imobilização de analito sobre as superfícies das AgNPs, sendo proporcional à concentração do mesmo. Com isso é possível a criação de sensores por índice de refração as quais vislumbram determinações quantitativas. O ouro nanoparticulado, a qual é normalmente empregado em sensores LSPR, possibilita produção de dispositivos de alta sensibilidade às mudanças no índice de refração. Contudo, a banda plasmônica exibida pelas nanopartículas de prata é mais estreita e ainda mais sensível, acarretando em medições mais precisas do deslocamento

da banda (LEE; EL-SAYED, 2006). Nanopartículas de ouro são normalmente a principal escolha por conta da sua inércia e principalmente devido a estabilidade da sua suspensão coloidal. Esse último aspecto deve ser principalmente melhorado para que seja possível uma maior aplicação de AgNPs em plataformas LSPR.

3.5 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Inúmeros métodos têm sido empregados para a síntese e estabilização de nanopartículas de prata, tais como físicos, químicos, eletroquímicos, fotoquímicos, radiação gama e ablação a laser. A redução química é o método mais frequentemente aplicado para a preparação de AgNPs como dispersões coloidais estáveis em água e solventes orgânicos (TAO et al., 2006). Redutores geralmente usados são borohidretos, citratos, ascorbatos e hidrogênio elementar (AHMADI et al., 1996).

A estabilidade do sistema resulta do fato que as nanopartículas geradas ficam em suspensão e não se agregam para a formação de partículas maiores. Os agentes redutores então são colocados em excesso em relação a solução do nitrato de prata (precursor de íons prata) durante a síntese, dado que eles atuam simultaneamente como agente redutor de Ag^+ e são responsáveis pela estabilização das partículas que se formam. Isso acontece porque os íons do agente redutor se adsorvem na superfície das nanopartículas, envolvendo-as e produzindo cargas. Estas cargas originam uma repulsão eletrostática entre as nanopartículas vizinhas, evitando a agregação das mesmas (VAN HYNING; KLEMPERER e ZUKOSKI, 2001)

Além da importância do agente redutor para obtenção das nanopartículas metálicas, sugerindo maior cuidado nas condições de reação, incluindo o tempo de agitação e quantidades relativas de reagentes devem ser rigorosamente controlados para a obtenção de prata coloidal estável e com o diâmetro médio das nanopartículas bem definido no sistema final (VAN HYNING; KLEMPERER; ZUKOSKI, 2001).

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata foram preparadas segundo a adaptação da metodologia descrita por Mulfinger et al. (2007), na qual Ag^+ é reduzido e estabilizado na forma de nanopartículas utilizando borohidreto de sódio. Foram feitas cinco diferentes condições de síntese, onde a quantidade de borohidreto de sódio foi mantida constante e foi empregado diferentes quantidades de nitrato de prata (precursor de Ag^+). Para a síntese foi adicionado, em erlenmeyer de 100 mL, 50 mL de solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L de borohidreto de sódio resfriada à 10°C . Sob constante agitação, foi então adicionado, gota a gota, volumes variados (2, 5, 8, 11 e 14 mL) de solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L de nitrato de prata. Seguidamente, caracterizou-se os materiais utilizando espectrofotometria UV-Vis.

4.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE TEMPORAL

Após inicialmente caracterizadas por espectros UV-Vis, estocou-se as amostras em frasco ependorf sob três diferentes condições: abrigo da luz e à temperatura ambiente; exposto à luz e à temperatura ambiente; e abrigo da luz e refrigerado. A amostra guardada ao abrigo da luz foi revestida com papel alumínio e a amostra exposta a luz foi colocada na bancada do laboratório sem nenhum revestimento. As mesmas foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis diariamente durante um período de sete dias. Tamanho médio e a distribuição de tamanhos das nanopartículas foram avaliados através dos valores do máximo de absorção e de largura à meia altura da banda plasmônica.

4.3 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO PLASMÔNICO

Para obtenção do substrato plasmônico utilizou-se adaptação do procedimento de Fan e Brolo (2009). Então utilizou-se lâminas de vidro que foram limpas usando solução “piranha” ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1[v/v]), e depois

enxaguadas com água. Após isso, foram colocadas em uma solução etanólica de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) 25 mM durante 4 h. Na sequência, As lâminas modificadas foram então enxaguadas com quantidades abundantes de etanol e lavadas novamente com água e colocadas na estufa à 100°C por 1 hora. Então elas foram imediatamente imersas em solução de AgNPs durante 24 horas para formação de um filme de AgNPs sobre a superfície do vidro. Para as deposições sucessivas de AgNPs, as lâminas foram removidas da solução de nanopartículas e cuidadosamente lavadas com água. Então, os substratos foram mergulhados em um sistema sol-gel de APTES durante 30 min e depois imersas novamente na solução de AgNPs durante 4 h. Este procedimento foi repetido até se obter o número desejado de deposições de AgNPs. Após cada passo foi realizada tripla lavagem. Analisou-se o material por espectrofotometria UV-Vis durante 7 dias para avaliar a estabilidade temporal das AgNPs imobilizadas sobre o substrato. Para o preparo do sol-gel empregou-se 600 µL de APTES e 500 µL de HCl 0,1 M em 50 mL de água. Para a completa polimerização, a solução foi agitada vigorosamente durante 1 hora.

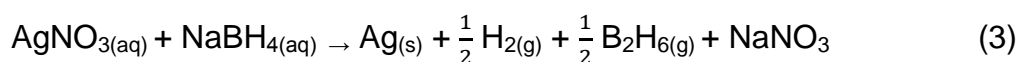
4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE

Para se medir a sensibilidade do substrato modificado com AgNPs frente à mudança de índice de refração, foram preparadas soluções aquosas de sacarose de diferentes concentrações. As soluções correspondentes são as seguintes: 10, 15, 20 e 25 g do açúcar para 100 mL de solução e mais o branco (água + substrato). Obteve-se espectros de absorção UV-Vis, de cada substrato imerso nas diferentes soluções de sacarose.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Diversos agentes redutores podem ser empregados para reduzir a prata, como borohidretos, citratos, ascorbatos e hidrogênio elementar, entre outros. Todavia, o borohidreto foi selecionado devido à rapidez e controle com que as nanopartículas são formadas após sua adição. Deve-se destacar a importância do controle adequado da quantidade de borohidreto de sódio, já que este tem grande influência nas características finais do sistema nanoparticulado, principalmente no que diz respeito ao diâmetro médio das partículas. A reação de redução responsável pela obtenção de AgNPs está descrita de acordo com a Equação 3.



Ao adicionar nitrato de prata na solução contendo borohidreto de sódio a solução passou de incolor para uma coloração amarelada, o que indica a produção de uma suspensão coloidal de AgNPs (MOGHIMI-RAD et al., 2011).

Para analisar os fatores de crescimento das nanopartículas, foram realizadas cinco condições de síntese onde foi mantida constante a quantidade da solução de borohidreto de sódio e variou-se o volume da solução de nitrato de prata. Foram obtidas soluções com diferentes tonalidades de amarelo, conforme apresentado na Figura 3.

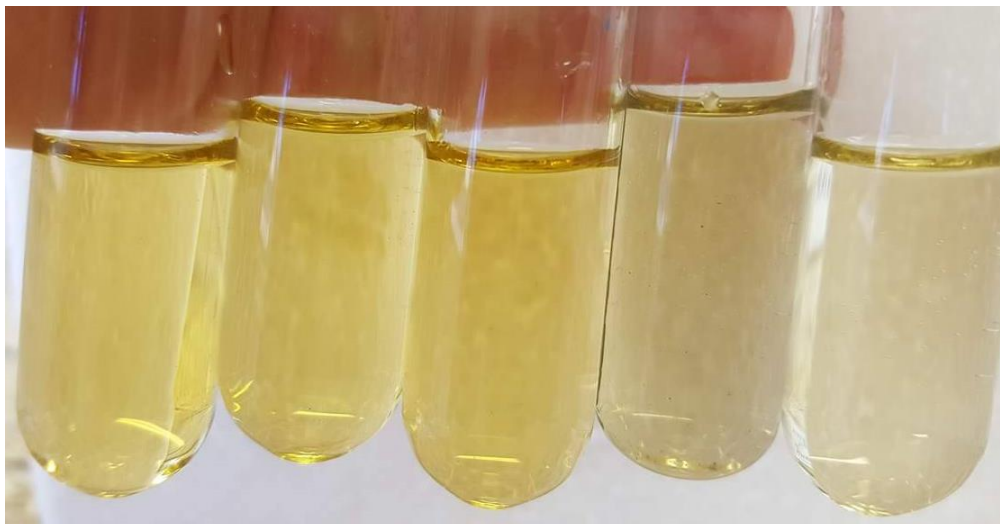


Figura 3: Imagem das soluções com uma quantidade de borohidreto de sódio constante e variando o volume da solução de nitrato de prata com uma concentração de 1×10^{-3} mol/L. A imagem das amostras representando as soluções cujos valores de volumes da esquerda para direita são: 14, 11, 8, 5 e 2 mL, respectivamente.

Para as diferentes condições de síntese foram obtidos espectros de cada amostra, os quais podem ser observados na Figura 4.

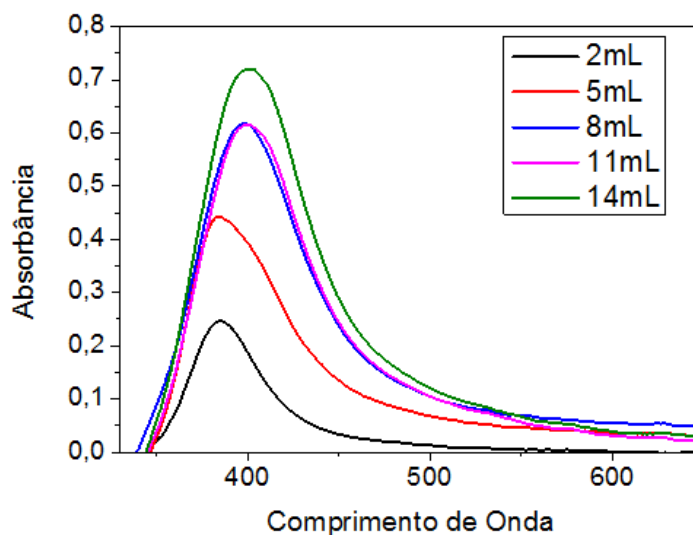


Figura 4: Espectros de absorção de suspensões coloidais de AgNPs sintetizadas em 5 diferentes condições, sendo empregado sempre 50 mL de solução de borohidreto de sódio 1×10^{-3} mol/L e diferentes volumes de solução de AgNO₃ 1×10^{-3} mol/L. E o comprimento de onda máximo em cada curva apresenta tamanhos diferentes de AgNPs.

A presença da banda plasmônica na região aproximadamente 400 nm indica a formação de nanopartículas de prata com tamanhos de escala nanométrica (MOGHIMI-RAD et al., 2011). Visto que, segundo SOLOMON, et al (2007) as nanopartículas apresentam um tamanho entre 10 e 14 nm.

O borohidreto de sódio utilizado na síntese tem duas funções fundamentais sendo que a primeira é de reduzir os íons prata ($\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$) e a segunda é estabilizar a elevada energia superficial de nanopartículas, prevenindo sua aglomeração e precipitação. O material em escala nanométrica tem uma tendência natural de sofrer aglomeração para redução da sua energia superficial. Desta maneira, as nanopartículas só conseguem permanecer nesse estado se houver um agente estabilizante adequado. O íon borohidreto em solução adsorve-se na superfície das nanopartículas promovendo a criação de cargas negativas no seu entorno, as quais evitam a sua agregação por meio de forças repulsivas. Uma proporção maior de borohidreto de sódio em relação à íons Ag^+ deve permitir a obtenção de nanopartículas menores (maior área superficial). Isso é esperado porque, nessas condições, o sistema apresenta uma maior capacidade de estabilizar superfície. Corroborando isso, foi perceptível que, para a síntese realizada com a adição de apenas 2 mL de solução de AgNO_3 , houve a obtenção de uma suspensão de AgNPs apresentando banda de absorção com máximo deslocado para menores comprimentos de onda. Partículas menores apresentam bandas LSPR mais energéticas (MOGHIMI-RAD et al., 2011).

As AgNPs produzidas exibem uma morfologia esférica a qual pode ser inferida com base nos espectros obtidos em todas as condições de síntese, nas quais apenas uma banda plasmônica foi visualizada na região do visível (PACIONI et al., 2015).

Para que possa ser eficientemente utilizado na construção de dispositivos plasmônicos, AgNPs devem apresentar-se suficientemente estáveis. Por ser um material menos nobre que o ouro, AgNPs tem uma tendência maior em sofrer com processos oxidativos e de aglomeração. Por isso foi realizado uma análise temporal para avaliar as mudanças físico-químicas

que as AgNPs possivelmente podem apresentar ao longo dos dias de estocagem. A estabilidade foi acompanhada por meio da aquisição de

espectros de absorção diários ao longo de uma semana para todas as suspensões obtidas como pode ser visto a Figura 5.

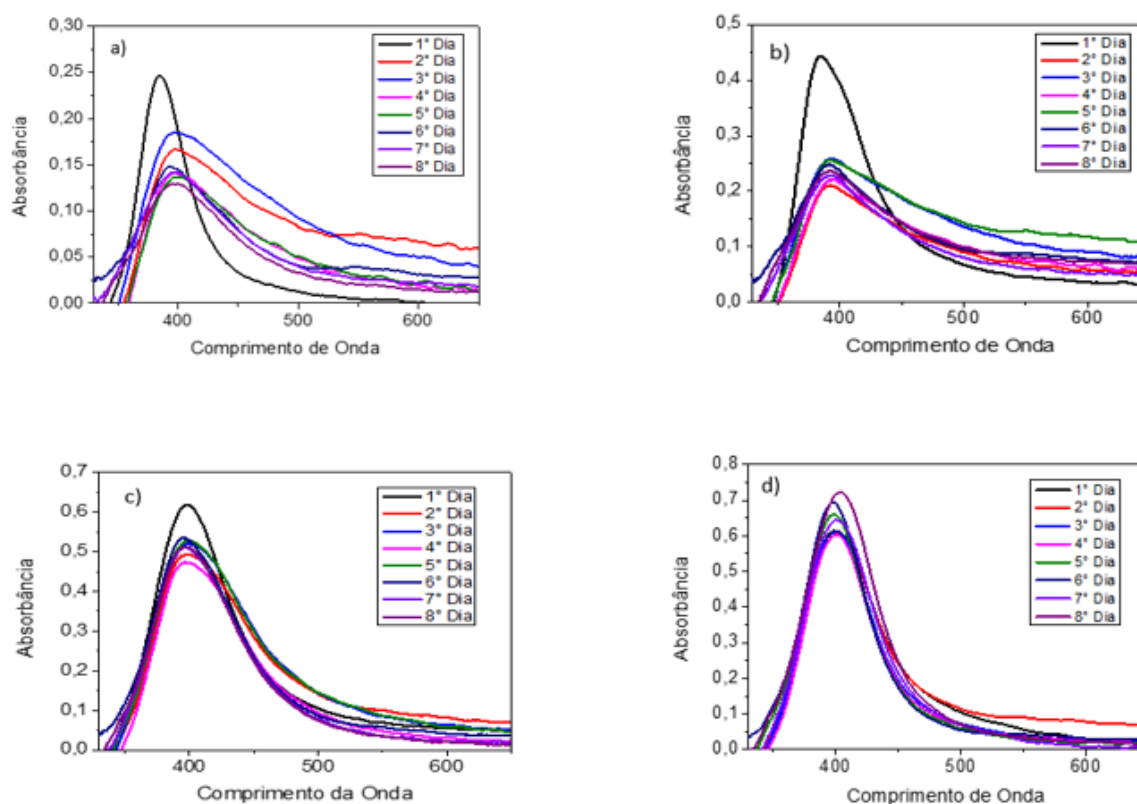
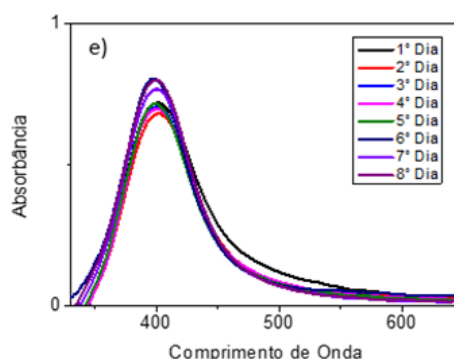


Figura 5: Espectro das suspensões de AgNPs obtidas com a) 2; b) 5 c) 8; d) 11 e e)14 mL de solução de AgNO_3 e 50 mL de solução de NaBH_4 , ambas com concentração 1×10^{-3} mol/L. Condição de estocagem: abrigo de luz refrigerado.

Conforme os espectros apresentados na Figura 5, AgNPs na condição de síntese com maior quantidade de precursor de prata (14 mL) permaneceram mais estáveis após sete dias. Não houve grandes variações com relação à posição do máximo, largura e intensidade da banda plasmônica nesse período. Sendo assim, este estudo foi essencial para mostrar que a suspensão produzida nessa condição de síntese é a melhor para aplicação na produção



de sensores LSPR. Com ela garante-se menores perdas de propriedades devido às modificações morfológicas ou processos oxidativos durante a produção ou estocagem até a obtenção dos substratos plasmônico. Outra característica que ainda favorece essa condição como sendo a melhor escolha é a sua mais alta intensidade de banda se comparada às outras condições. Isso garante uma menor influência de ruídos de equipamento as quais podem gerar flutuação da posição do máximo de absorção que é a ferramenta principalmente avaliada durante a operação de um sensor plasmônico dessa natureza. Vale ressaltar ainda que as suspensões coloidais obtidas com volumes maiores do que 14 mL se mostraram bastante escurecidas, indicando fenômenos de aglomeração. Isso possivelmente ocorreu pois, nessas condições, a quantidade de estabilizante fica bastante reduzida em relação à de íons Ag^+ .

Um outro aspecto avaliado com o intuito de propiciar melhor estabilidade temporal da suspensão coloidal de AgNPs produzidas foram empregadas em diferentes condições de armazenagem, sendo estas: abrigo da luz e à temperatura ambiente; exposto à luz e à temperatura ambiente; e abrigo da luz e refrigerado. Novamente, espectros de absorção foram obtidos durante uma semana, nas diferentes condições de armazenagem, para a melhor condição de síntese (14 mL de solução de AgNO_3). Os espectros UV-Vis das amostras nas diferentes condições de armazenagem são apresentados na

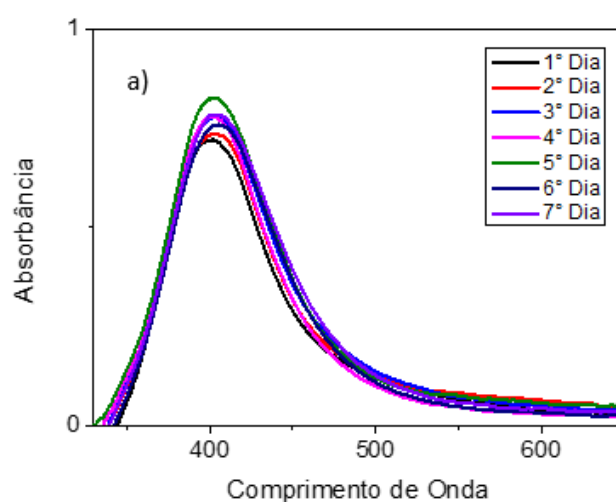


Figura 6.

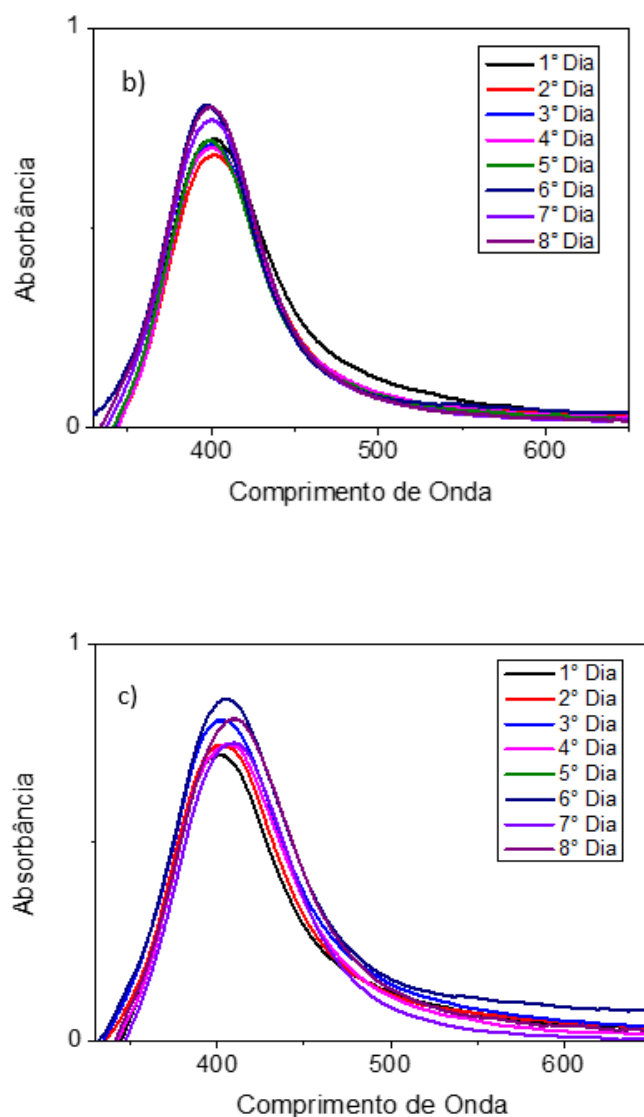


Figura 6: Espectros de absorção para a suspensão de AgNPs obtidas na condição de 14 mL AgNO_3 (1×10^{-3} mol/L) e 50 mL de NaBH_4 (1×10^{-3} mol/L) com respectivas condições de armazenagem: a) abrigo de luz e à temperatura ambiente; b) abrigo da luz e refrigerado; c) exposto à luz e à temperatura ambiente.

A Tabela 1 apresenta os deslocamentos obtidos dos comprimentos de onda máximos de absorção assim como das larguras de banda a meia altura ao longo dos dias, a partir dos espectros apresentados na Figura 6.

Tabela 1: Comprimentos de onda do máximo de absorção ($\lambda_{MÁX}$) e largura das bandas a meia altura (nm) obtidas para AgNPs (14 mL de AgNO_3 e 50 mL de NaBH_4 , ambas 1×10^{-3} mol/L) nas diferentes condições de armazenamento considerando período de sete dia.

Condição de armazenamento	$\Delta\lambda_{MÁX}$ (nm)	Δ Largura de banda (nm)
Geladeira Escuro	+2,0	-12,22
Ambiente Escuro	+3,5	+5,92
Ambiente Luz	+12,0	+4,65

Fonte: Autoria própria

Pode ser verificado que a condição de armazenagem influencia na estabilidade de AgNPs. Os deslocamentos da banda para maiores valores sugerem presença de partículas maiores as quais devem ter sido formadas durante processo de aglomeração que ocorre ao longo dos dias. Isso indica falta de estabilidade a qual deve ser sempre minimizada.

Avaliando o deslocamento da posição do máximo de absorção ($\lambda_{MÁX}$), é notório que o fator temperatura tem pouca influência na estabilidade (variação de 2,0 nm no ambiente refrigerado contra 3,5 nm para estocagem em temperatura ambiente). Temperaturas maiores podem favorecer uma dessorção térmica de moléculas de BH_4^- responsáveis pela estabilização das nanopartículas. Isso pode justificar o pequeno acréscimo de tamanho por aglomeração. Por outro lado, o fator luminosidade tem grande influência na posição final do máximo de absorção. Ao abrigo da luz, uma variação de 3,5 nm na posição do comprimento de onda máximo da banda foi observado para a amostra, enquanto que exposta à luz houve um deslocamento 12,0 nm. AgNPs expostas à luz podem sofrer ciclos de oxidação/redução mais facilmente as quais justificam produção de partículas maiores.

A largura de banda na metade da intensidade máxima de absorção está relacionada com a distribuição de diâmetro das AgNPs sintetizadas. Em um sistema polidisperso a banda apresenta-se alargada. Pensando em uma aplicação em sensores plasmônicos são requeridas bandas mais estreitas

possíveis, pois isso torna o monitoramento do deslocamento da banda mais preciso. A partir dos dados da Tabela 1, foi possível notar variação na largura da banda das AgNPs para as diferentes armazenagens ao longo dos dias. É interessante observar que para estocagem ao abrigo da luz e refrigerado da solução 14 mL de AgNO_3 , mostra que o material final apresenta partículas com menor distribuição de tamanho (redução de aprox. 12 nm na largura da banda) em comparação com o dia da síntese. Esse comportamento é diferente para as outras condições de estocagem onde houve um aumento na polidispersividade das partículas do sistema a qual deve ocorrer por conta da ocorrência de processo de aglomeração não regular desencadeada termicamente ou por luz.

Com base na avaliação do deslocamento da posição do λ_{MAX} e larguras de banda obtidas dos espectros adquiridos ao longo de sete dias para as diferentes condições de armazenamento pode-se sugerir que a melhor condição de estocagem é em ambiente refrigerado e ao abrigo da luz onde foi verificado menor variável aceitável ou até uma melhora das propriedades do material ao longo do período de 7 dias.

5.2 PRODUÇÃO DE SUBSTRATOS PLASMÔNICOS CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para o preparo dos substratos plasmônicos foi utilizado placas de vidro (2,5 x 2,5 cm e 1,0 mm de espessura), as quais são de fácil acesso e manipulação. A limpeza das placas de vidro usando uma solução “piranha” é necessária a fim de remover eventuais impurezas orgânicas residuais que dificultam a adsorção de AgNPs. Além disso, a limpeza cria uma camada de grupos de OH^- na superfície vítrea. A presença de grupos hidroxila são importantes para ativar a superfície de forma a possibilitar a sua funcionalização com APTES a qual deve ser catalisada por aquecimento.

A funcionalização inicial do vidro com APTES é importante já que ele serve como *link* para a posterior imobilização de AgNPs sobre a superfície. AgNPs tem uma camada externa carregada negativamente devido a presença de espécies BH_4^- . Essa densidade de cargas negativas interage com as aminas protonadas do APTES imobilizado. Com isso é possível a obtenção de uma camada de AgNPs sobre vidro. Haverá imersão subsequente em suspensões

coloidais de AgNPs após serem colocadas em um sistema sol-gel de APTES. O polímero de APTES produzido em meio ácido conta com a presença de inúmeros grupos amins protonadas disponíveis. Parte deles liga-se às nanopartículas já presentes na superfície do vidro (portanto são imobilizados sobre elas), mas muitos outros livres para próximas subsequentes deposições de AgNPs. Sendo assim foi possível repetir várias vezes essas últimas etapas a fim de obter uma alta concentração de AgNPs. Todo o processo de imobilização e deposições sucessivas de AgNPs está esquematicamente apresentado na Figura 7.

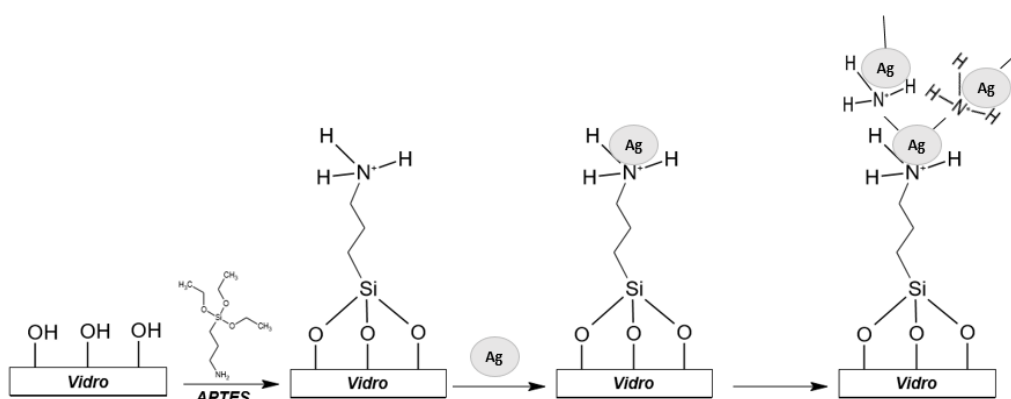


Figura 7: Representação dos estágios de ativação da superfície do vidro para obtenção do substrato plasmônico.

Espectros de absorção dos substratos foram obtidos após cada deposição e eles estão apresentados na Figura 8.

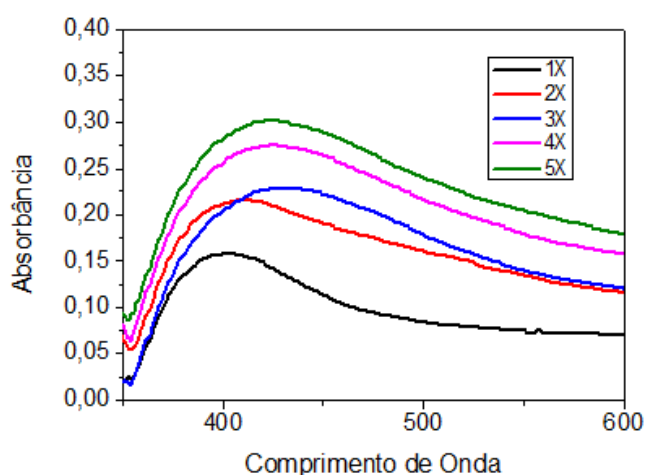


Figura 8: Espectros das 5 subsequentes deposições de AgNPs.

Várias deposições de nanopartículas foram produzidas por meio da repetição das etapas de aplicação do sistema sol-gel e subsequente imersão em suspensão de AgNPs. A produção de várias deposições sucessivas de AgNPs foi realizada com intuito de obter uma superfície com uma maior densidade de partículas. Uma superfície com maior densidade de AgNPs criará uma banda plasmônica mais intensa, mais estreita e conseqüentemente mais interessante para aplicação como substratos plasmônico na qual se deseja monitorar deslocamento do máximo de absorção.

Observando a Figura 8, nota-se que a densidade de AgNPs aumentou à medida que as deposições foram se sucedendo. Isso pode ser inferido pois houve aumento na absorção máxima no decorrer das etapas. Além disso, foi observado um alargamento da banda plasmônica. Isso indica a ocorrência de aglomeração conforme houve o aumento do número de deposições sucessivas de AgNPs. Isso é reflexo do aumento do número de nanopartículas sobre um mesmo espaço. Esse comportamento não é algo desejável já que bandas mais largas dificultam o monitoramento do deslocamento das bandas. Por esse motivo limitamos o máximo de deposição em cinco.

5.2.1 ESTUDO DA ESTABILIDADE TEMPORAL DO SUBSTRATO

Após ter realizado a formação de cinco deposições sucessivas de AgNPs, foi realizado um estudo sobre a estabilidade temporal do substrato produzido. Foram obtidos espectros de absorção das AgNPs imobilizadas sobre vidro diariamente durante oito dias e esses estão apresentados na Figura 9.

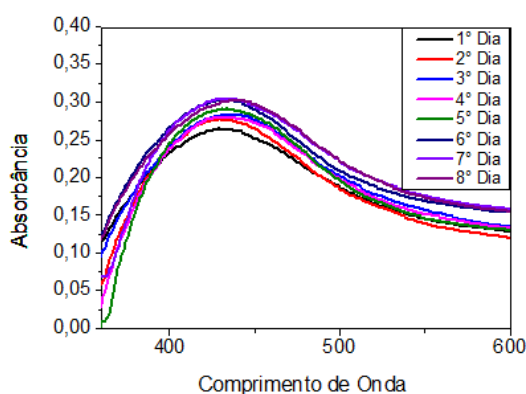
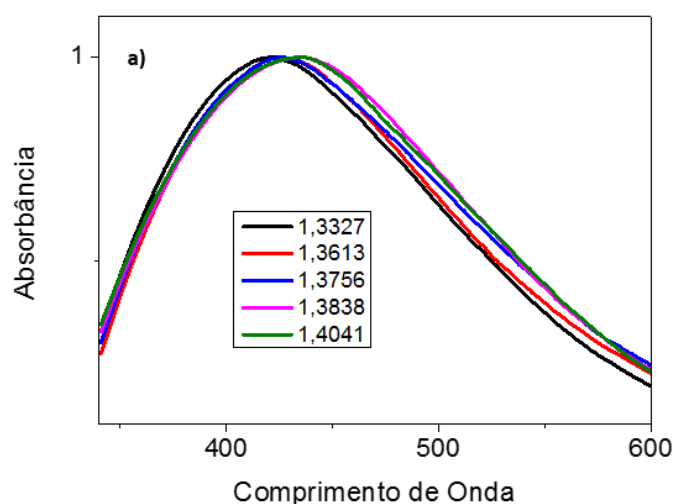


Figura 9: Espectros avaliativos para estabilidade temporal do substrato plasmônico.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 9, percebe-se que absorbância máxima das AgNPs sobre os substratos aumenta levemente ao longo dos dias. Contudo, de maneira geral, o sistema permaneceu com as mesmas características após oito dias de estocagem em água. A posição do máximo de absorção, assim como a largura da banda permaneceram estáveis durante o período avaliado. Isso normalmente não é um comportamento observado para substratos contendo filmes de AgNPs, as quais se mostram instáveis e apresentam alto grau de aglomeração dentro de uma semana. A maior estabilidade do substrato proposto aqui pode estar associada com a presença do polímero de APTES a qual conta com grande número de sítios – NH_3^+ que estabiliza o sistema nanoparticulado.

5.2.2 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DO SUBSTRATO

O substrato plasmônico obtido foi submetido ao teste de sensibilidade. Para tanto variou-se o índice de refração sobre a superfície do mesmo através da imersão dele em soluções com distintos de índices de refração. Isso é feito com o propósito de perturbar o plasmon para que ela possa ser detectada por meio do monitoramento do deslocamento do máximo dos espectros de absorção. As bandas obtidas para os substratos imersos nas diferentes soluções de sacarose estão apresentadas na Figura 10a.



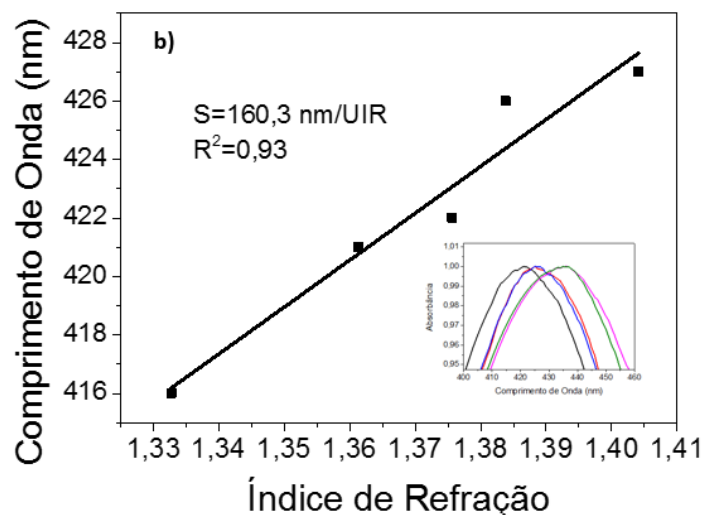


Figura 10: a) Espectros de absorção do substrato plasmônico obtidos com 5 deposições sucessivas de AgNPs imersos em meios com diferentes índices de refração e em b) é mostrada curva de sensibilidade. O detalhe em “b” apresenta a ampliação dos máximos das bandas plasmônicas de “a”.

Observa-se que, à medida que o índice de refração do meio aumenta, à um deslocamento batocrômico na banda plasmônica. Esse é um comportamento esperado, dado que em valores maiores de índice de refração, o plasmon é perturbado de forma que a banda de absorção seja levada para regiões menos energéticas (MONTEIRO, J. P. et al, 2015).

Os comprimentos de onda no máximo dos espectros da Figura 12a (as quais são mostrados ampliados na inserção da Figura 12b) foram plotados contra os índices de refração de cada solução de sacarose. A inclinação da curva da Figura 12b representa o valor obtido de sensibilidade a qual foi 160,3 nm/UIR (nanômetro por unidade de índice de refração) e com um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,93.

Esse valor de sensibilidade é considerado bom quando comparado com outros substratos, da mesma natureza reportados na literatura, onde são encontrados valores de sensibilidade na faixa de 85 -100 nm/UIR (HALL, W. P.; NGATIA, S. N.; VAN DUYNE, R. P, 2011; SUN, Y.; XIA, Y, 2013). Desta forma, o substrato apresenta um desempenho significativo, podendo possivelmente ser empregado como biossensor plasmônico para detecção de biomoléculas.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados que foram obtidos, conclui-se que a partir de estudos de armazenagem da solução de AgNPs, a que apresentou-se a melhor condição de estocagem foi abrigo da luz e refrigerado. E a condição ótima de síntese de AgNPs foi aquela obtida com volume de 14 mL de solução de nitrato prata com uma concentração de 1×10^{-3} mol/L para 50 mL de solução de NaBH_4 na mesma concentração. A análise de estabilidade temporal mostrou que esta condição foi a que permaneceu mais estável durante avaliação temporal ao longo de sete dias.

Obteve-se o substrato plasmônico por meio da imobilização de AgNPs sobre vidro ativado com APTES a partir de suspensão de nanopartículas obtidas na otimização de síntese. Através de aplicação do sistema sol-gel foi possível obter um substrato com maior densidade de AgNPs e a condição ideal foi estabelecida como sendo a de cinco subseqüentes deposições de nanopartículas. O substrato obtido nessa condição mostrou-se estável, sem indícios de aglomeração, ao longo de 8 dias. Isso foi um resultado bastante satisfatório já que substratos baseados em AgNPs costumam sofrer com processos de aglomeração.

O substrato ainda apresentou uma sensibilidade de 160,3 nm/UIR a qual é considerada alta, quando comparada com outros substratos da literatura. Portanto, o substrato pode ser utilizado para detecção de biomoléculas.

7. REFERÊNCIAS

A. SASSOLAS, L.J. BLUM, B.D. Leca-Bouvier, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 489.

BARNES, WILLIAM L.; DEREUX, ALAIN; EBBESEN, THOMAS W. Surface plasmon subwavelength optics. **Nature**, [s.l.], v. 424, n. 6950, p.824-830, 14 ago. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01937>.

CHEN, W. et al. Silanization of solid surfaces via mercaptopropylsilatrane: a new approach of constructing gold colloid monolayers. **Rsc Adv.**, [s.l.], v. 4, n. 87, p.46527-46535, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC).

COOPER, M. A. et al. Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer. **Elsevier**, U.s, p.101-111, 1998.

FAN, MEIKUN; BROLO, ALEXANDRE G. Silver nanoparticles self-assembly as SERS substrates with near single molecule detection limit. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 11, n. 34, p.7381-7389, 2009. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b904744a>.

GONG, Y. et al. Self-assembled dipeptide–gold nanoparticle hybrid spheres for highly sensitive amperometric hydrogen peroxide biosensors. **Biosensors And Bioelectronics**, [s.l.], v. 66, p.392-398, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.11.029>.

GREEN, R. J. et al. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. **Biomaterials**, Us, p.1823-1835, 2000.

HALL, W. P.; NGATIA, S. N.; VAN DUYN, R. P. LSPR Biosensor Signal Enhancement Using Nanoparticle-Antibody Conjugates. *J. Phys. Chem. C*, v. 115, p. 1410–1414, 2011.

HAO, ENCAI; SCHATZ, GEORGE C.; HUPP, JOSEPH T.. Synthesis and Optical Properties of Anisotropic Metal Nanoparticles. **Journal Of Fluorescence**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.331-341, jul. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/b:jofl.0000031815.71450.74>.

HO, M. et al. The construction of glucose biosensor based on crystalline iridium(III)-containing coordination polymers with fiber-optic detection. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 190, p.479-485, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.08.100>.

HOMOLA, J. et al. Surface plasmon resonance sensors: review. **Elsevier: ELSEVIER**, U.s, p.3-15, 1999.

HONG, Y. et al. Nanobiosensors Based on Localized Surface Plasmon Resonance for Biomarker Detection. **Journal Of Nanomaterials**, [s.l.], v. 2012, p.1-13, 2012. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/759830>.

LI, X. et al. Self-Assembled Metal Colloid Films: Two Approaches for Preparing New SERS Active Substrates. **Langmuir**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.1298-1304, fev. 2004. American Chemical Society (ACS).

MAYSTRE, DANIEL. Theory of Wood's Anomalies. **Plasmonics**, [s.l.], p.39-83, 2012. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-28079-5_2.

MOGHIMI-RAD, J. et al. Shape-controlled synthesis of silver particles by surfactant self-assembly under ultrasound radiation. **Applied Nanoscience**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.27-35, 20 abr. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13204-011-0004-5>.

MONTEIRO, J. P. et al. Plasmonic device based on a PAAm hydrogel/gold nanoparticles composite. **APPL. POLYM. SCI.**, In press, p. 42-49, 2015.

MONTEIRO, J. P. et al. Plasmonic device based on a PAAm hydrogel/gold nanoparticles composite. **APPL. POLYM. SCI.**, In press, p. 42-49, 2015.

MULFINGER, L. et al. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal Of Chemical Education**, [s.l.], v. 84, n. 2, p.322-325, fev. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ed084p322>.

PACIONI, N. L. et al. Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. **Silver Nanoparticle Applications**, [s.l.], p.13-46, 2015. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-11262-6_2.

PETERSON, C. L. Nanotechnology: from Feynmam to the Grand Challenge of molecular manufacturing. **IEE Technology And Society Magazine**, Us, p.9-15, 2004.

PETRYAYEVA, ELEONORA; KRULL, ULRICH J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 706, n. 1, p.8-24, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.020>.

PODLIPENSKY, A. et al. Femtosecond laser assisted production of dichroitic 3D structures in composite glass containing Ag nanoparticles. **Applied Physics A**, [s.l.], v. 80, n. 8, p.1647-1652, 25 nov. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00339-004-3090-3>.

Q. LUAN, K. ZHOU, H. TAN, D. YANG, X. YAO, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2473.

RICH, R.L, D.G.MYSZKA. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 54-61. 2000.

RITCHIE, R. H.. Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. **Physical Review**, [s.l.], v. 106, n. 5, p.874-881, 1 jun. 1957. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrev.106.874>.

SHANKARAN, D; GOBI, K; MIURA, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 121, n. 1, p.158-177, 30 jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2006.09.014>.

SHIN, Y. et al. A new palm-sized surface plasmon resonance (SPR) biosensor based on modulation of a light source by a rotating mirror. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 150, n. 1, p.1-6, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2010.08.006>.

SINGH, ANKIT; THAPA, KHEM B.; KUMAR, NARENDRA. Analysis and design of optical biosensors using one-dimensional photonic crystals. **Optik - International Journal For Light And Electron Optics**, [s.l.], v. 126, n. 2, p.244-250, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijleo.2014.08.172>.

SINGH, M. et al. Layer-by-layer scaffold formation using magnetic attraction between HiPCO® single-walled carbon nanotubes and magnetic nanoparticles: Application for high performance immunosensors. **Carbon**, [s.l.], v. 81, p.731-738, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2014.10.015>.

Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. Fundamentos de Química Analítica. 8ª ed., Pioneira Thomson Learning: São Paulo, **2006**, pp. 199-200.

SKOTADIS, E. et al. Flexible polyimide chemical sensors using platinum nanoparticles. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 189, p.106-112, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.01.046>.

SOLOMON, et al. Synthesis and study of silver nanoparticles. **EUA: Journal of Chemical Education**- Vol. 84 February 2007 No. 2 . p. 322

SPICHIGER-KELLER, Ursula E. **Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological**. U.s: Wiley-vch, 1998.

SUN, Y.; XIA, Y. Gold and Silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 450 to 750 nm. *The Analyst*, v. 128, p. 686-691, 2003.

SUN, Y.; XIA, Y. Gold and Silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 450 to 750 nm. *The Analyst*, v. 128, p. 686-691, 2003.

T.F. MCGRATH, J. BUIJS, A. C. HUET, P. DELAHAUT, C.T. ELLIOTT, M.H. Mooney, *Sensors Actuators, B Chem.* 186 (2013) 423.

TAO, A.; SINSERMSUKSAKU, P.; YANG, P. Polyhedral silver nanocrystals with distinct scattering signatures. *Angewandte Chemie*, 45, 2006, 4597-4601.

U.E. SPICHIGER-KELLER, in: **Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological**. Germany: Wiley-vch, 2007, p. 1-31.

VAN HYNING, DIRK L.; KLEMPERER, WALTER G.; ZUKOSKI, CHARLES F. Silver Nanoparticle Formation: Predictions and Verification of the Aggregative Growth Model. *Langmuir*, [s.l.], v. 17, n. 11, p.3128-3135, maio 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la000856h>.

WANDERMUR, G. et al. Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection. **Biosensors And Bioelectronics**, [s.l.], v. 54, p.661-666, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.030>.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.16, p.3011-3016, 2000.

WANG, S. et al. Organic/inorganic hybrid sensors: A review. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 182, p.467-481, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.042>.

WILLETS, Katherine A.; VAN DUYNE, Richard P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review Of Physical Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 1, p.267-297, maio 2007. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>.