

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

EDUARDA DE CASTRO FLACH

**SÍNTESE VERDE VIA MICRO-ONDAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
USANDO EXTRATO AQUOSO DE RABANETE (*Raphanus Sativus*): APLICAÇÃO  
EM BIOSENSOR NANOPLASMÔNICO**

Porto Alegre  
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

EDUARDA DE CASTRO FLACH

**SÍNTESE VERDE VIA MICRO-ONDAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
USANDO EXTRATO AQUOSO DE RABANETE (*Raphanus Sativus*): APLICAÇÃO  
EM BIOSSENSOR NANOPLASMÔNICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof. Dr. Daniel Eduardo Weibel

Orientador

Profa. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos

Co-orientadora

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Flach, Eduarda de Castro  
Síntese verde via micro-ondas de nanopartículas de prata usando extrato aquoso de rabanete (*raphanus sativus*): aplicação em biossensor nanoplasmonico / Eduarda de Castro Flach. -- 2021.  
56 f.

Orientador: Daniel Eduardo Weibel.

Coorientadora: Jacqueline Ferreira Leite Santos.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Bacharelado em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Síntese Verde. 2. Nanopartículas de Prata. 3. Micro-ondas. 4. Biossensores Nanoplasmonicos. I. Weibel, Daniel Eduardo, orient. II. Santos, Jacqueline Ferreira Leite, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado força e ter me mantido firme durante todos esses anos;

Aos meus pais Nilce e Jaime Flach e irmãos Jardel e Sara Flach que serviram de base para tudo o que eu aprendi em vida;

Ao meu orientador Prof Daniel Eduardo Weibel por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, estando presente e respondendo minhas dúvidas. Também me incentivando a pensar como pesquisadora por meio de seminários, conversas e gráficos ilustrativos;

Ao grupo do Laboratório de Fotoquímica e Superfícies (LAFOS) pela parceria, pelas conversas descontraídas e pelos cafés, isso foi muito importante para mim ainda mais no período de pandemia. Em especial ao Guilherme Strapasson, um amigo que me ajudou quando entrei para o grupo e se tornou a minha dupla de trabalho. Saudades. À Silma Alberton, por ter sido sempre disposta a me ajudar e me tranquilizar e à Bibiana Melo por ter me auxiliado quando precisei no lab;

À minha co-orientadora, Prof Jacqueline Ferreira Leite Santos, que me acompanhou desde o início da graduação e em vários momentos via mais potencial em mim do que eu mesma. Ao Laboratório de Materiais Aplicados e Interfaces (LAMAI) em especial ao laboratório K123, no qual iniciei como pesquisadora na companhia de colegas incríveis como o Rodrigo Morawski, Michele Niewierowski, Aline Ribeiro, Renata Neves, Lara Loguercio, Monique Loi e Anderson Thesing. Vivi momentos muito bons na companhia de vocês;

Às amigadas que fiz durante o período de formação. Um agradecimento especial a minha amiga Mikaela Meirelles por me abrigar em sua casa duas vezes na semana enquanto eu desenvolvia este trabalho, eu não teria conseguido sem ti. Também à Tatiane D'Oca e Laura Zeni por terem sido minhas parceiras de estudo durante o ensino remoto, foi ótimo ter vocês ao meu lado virtualmente. À Marcelle Marichal, Roberta Zucatti e Matheus Marafiga pelas saídas, conversas e conselhos sobre o TCC, nós conseguimos!

À Giovanna Machado, Diretora do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE pelas medidas de Microscopia eletrônica de transmissão;

Aos professores Vitor Paulo Pereira e Marcelo Barbalho pela ajuda, pelos conselhos e disposição em me auxiliar;

Às agências de fomento (CNPq, FAPERGS, CAPES) e a UFRGS pelo apoio à pesquisa científica

## RESUMO

O presente trabalho descreve a síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) por uma metodologia simples a partir da química assistida por irradiação micro-ondas (MWAC), bem como a aplicação dessas AgNPs como biossensores nanoplasmonicos. As AgNPs foram sintetizadas utilizando extrato de rabanete rosa como agentes redutor/estabilizante e soluções aquosas com diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$ . O extrato de rabanete foi analisado por espectroscopia no infravermelho com reflexão total atenuada (FTIR-ATR). As AgNPs foram caracterizadas por espectroscopia UV-Visível (UV-VIS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Houve a formação de estruturas com pequeno diâmetro, sendo que o pH alcalino favoreceu as propriedades ópticas e morfológicas das AgNPs, obtendo-se uma banda plasmônica com máximo de intensidade em 406 nm, largura a meia altura (FWHM) igual a 126 nm e tamanho médio de  $7 \pm 3$  nm. As AgNPs mostraram alta estabilidade ao decorrer de 5 meses, sem praticamente nenhuma mudança nas suas propriedades ópticas. O sensor construído pela adsorção destas AgNPs em lâminas de vidro apresentou sensibilidade de  $201 \text{ nm RIU}^{-1}$  (unidades de índice de refração) e figura de mérito (FOM) igual a  $1,33 \text{ RIU}^{-1}$ . Posteriormente, o biossensor, formado com a funcionalização das AgNPs impregnadas, foi aplicado na biodeteção da proteína estreptavidina, com base em sua forte ligação com a biotina. Todas as etapas de funcionalização foram acompanhadas pelo deslocamento da banda plasmônica para maiores comprimentos de onda. A metodologia verde desenvolvida no presente trabalho demonstrou a factibilidade de sintetizar AgNPs utilizando extratos de rabanete, possuindo diversas potenciais aplicações além da área de biossensores.

**Palavras-chave:** Síntese Verde. Nanopartículas de Prata. Micro-ondas.

Biossensores Nanoplasmonicos

## ABSTRACT

The present work describes the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by a simple methodology using a microwave-assisted chemistry (MWAC), as well as the application of these AgNPs as nanoplasmonic biosensors. AgNPs were chemically synthesized using rose radish extract as reducing/stabilizing agents and aqueous solutions with different concentrations of  $\text{AgNO}_3$ . The radish extract was analyzed by attenuated total reflectance infrared spectroscopy (FTIR-ATR). The AgNPs were characterized by UV-Visible spectroscopy (UV-VIS) and transmission electron microscopy (MET). Structures with small diameter were formed, and alkaline pH favored the optical and morphological properties of the AgNPs, resulting in a plasmonic band with maximum intensity at 406 nm, Full width at half maximum (FWHM) equal to 126 nm and average size of  $7\pm 3$  nm. AgNPs showed high stability over the course of 5 months, with practically no change in their optical properties. The sensor assembled with the adsorption of AgNPs onto glass slides presented sensitivity of  $201 \text{ nm RIU}^{-1}$  and figure of merit (FOM) of  $1.33 \text{ RIU}^{-1}$ . Subsequently, the biosensor assembled with the AgNPs surface functionalization was applied in the biodetection of the protein streptavidin, due to its strong binding with biotin. All functionalization steps were monitored with redshifts of the plasmonic band. The green methodology developed in this work demonstrated the feasibility of synthesizing AgNPs using radish extracts, having several potential applications beyond the area of nanobiosensors.

**Keywords:** Green Synthesis, Silver Nanoparticles, Microwave, Nanoplasmonic Biosensor

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> (a) Esquema geral do fenômeno LSPR em nanopartículas metálicas. (b) banda plasmônica resultante do LSPR com seu FWHM e $\lambda_{\max}$ destacados .....	15
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo da síntese de AgNPs pelo método químico ( <i>bottom-up</i> ).....	16
<b>Figura 3:</b> Rabanete rosa ( <i>Raphanus Sativus</i> ) .....	19
<b>Figura 4:</b> Número de publicações que contêm as palavras-chave: <i>synthesis; green; nanoparticles; plant</i> no abstract comparadas à mesma busca incluindo <i>microwave</i> . Fonte: Web of Science. ....	21
<b>Figura 5:</b> Representação do biossensoriamento por LSPR (a) MNP onde uma camada foi depositada na superfície se ligando ao analito de forma específica (b) o espectro de extinção sofrendo um deslocamento para o vermelho com a ligação específica de moléculas na superfície da MNP.....	22
<b>Figura 6:</b> Esquema do processo de detecção da estreptavidina a partir do slide de MNPs funcionalizado. (A) impregnação de MNPs no vidro utilizando o ligante MPTMS; (B) MUA sobre o filme de AgNPs; (C) a formação de espécies reativas com succimidina após o tratamento com EDC/NHS; (D) imobilização da biotina; (E) ligação da estreptavidina com a biotina imobilizada.....	23
<b>Figura 7:</b> Esquema da síntese verde de AgNPs utilizando irradiação micro-ondas .	27
<b>Figura 8:</b> Espectro UV-VIS das AgNPs sintetizadas em com diferentes solventes e condições. $[\text{AgNO}_3] = 3 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$ após 30 segundos de irradiação micro-ondas. ....	32
<b>Figura 9:</b> Espectro UV-VIS das AgNPs sintetizadas com $[\text{AgNO}_3] = 3 \text{ mmol L}^{-1}$ , concentrações crescentes do extrato de rabanete após 30 segundos de irradiação micro-ondas. <i>Inset:</i> dispersões de AgNPs com concentrações do extrato de rabanete aumentando da esquerda para a direita.....	34
<b>Figura 10:</b> Espectro UV-VIS das AgNPs sintetizadas com concentrações crescentes de $\text{AgNO}_3$ (em $\text{mmol L}^{-1}$ ) e $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$ após 30 segundos de irradiação micro-ondas. <i>Inset:</i> dispersões coloidais das AgNPs com $[\text{AgNO}_3]$ aumentando da esquerda para a direita.....	36

<b>Figura 11:</b> (a) Espectro UV-Vis das AgNPs em diferentes pHs; (b) extrato de rabanete puro, após a irradiação, bem como as AgNPs obtidas em pH 11,4. <i>Inset:</i> imagem do extrato e dispersão de AgNPs. ....	37
<b>Figura 12:</b> Espectros FTIR-ATR do extrato das raízes de rabanete e dispersão de AgNPs em pH 11,4 (a-b) e (c) sem alteração de pH antes e após a irradiação micro-ondas. ....	39
<b>Figura 13:</b> Estabilidade das AgNPs (a) expostas a luz do laboratório e (b) mantidas no escuro após 5 meses obtidas com $[AgNO_3] = 4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$ , após 30 segundos de irradiação micro-ondas.....	42
<b>Figura 14:</b> Estabilidade das AgNPs após 4 meses ( $[AgNO_3] = 4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$ ) obtidas em pH 11,4. <i>Inset:</i> Espectro UV-Vis da dispersão de AgNPs diluída previamente e recém diluída após 30 dias. ....	44
<b>Figura 15:</b> Imagem por MET e histogramas com o diâmetro médio das AgNPs sintetizadas com $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$ e (a-b) $3 \text{ mmol L}^{-1}$ , (c-d) $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de $AgNO_3$ ou $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e alteração do pH a 11,4 (e-f). Escala das figuras MET 50 nm .....	45
<b>Figura 16:</b> Esquema da proposta de reação de síntese de AgNPs.....	46
<b>Figura 17:</b> Espectro UV-VIS de uma lâmina de vidro em água após 5 deposições de AgNPs. AgNPs sintetizadas com $0,5 \text{ g mL}^{-1}$ extrato de rabanete, $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de $AgNO_3$ em pH 11,4. <i>Inset:</i> Slide antes (esquerda) e após a impregnação de AgNPs (direita). ....	47
<b>Figura 18:</b> Gráfico analítico do deslocamento do $\lambda_{max}$ da banda LSPR gerada pelo slide impregnado com multicamadas de AgNPs em função do índice de refração. <i>Inset:</i> espectro de extinção normalizado do substrato de AgNPs em diferentes índices de refração.....	49
<b>Figura 19:</b> Extinção normalizada do slide de AgNPs após a impregnação de MUA, ligação com a biotina e estreptavidina. <i>Inset:</i> variação do $\lambda_{max}$ depois da adsorção da biotina e estreptavidina a partir do $\lambda_{max}$ das AgNPs (410 nm) .....	50
<b>Figura 20:</b> Espectro UV-VIS das AgNPs sintetizadas com cascas de rabanete em uma concentração de $0,5 \text{ g mL}^{-1}$ e $[AgNO_3] = 4,5 \text{ mmol/L}$ . <i>Inset:</i> imagem do extrato da casca de rabanete (esquerda) e da dispersão de AgNPs (direita) .....	56

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AgNPs – Nanopartículas de prata

AuNPs – Nanopartículas de ouro

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

FOM – (*do inglês: Figure of merit*) Figura de mérito

FTIR – ATR – Espectroscopia no infravermelho com reflexão total atenuada

FWHM – (*do inglês Full width at half maximum*) Largura a meia altura

LSPR – (*do inglês Localized Surface Plasmon Resonance*) ressonância plasmônica de superfície localizada

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MNPs – Nanopartículas metálicas

MPTMS – 3-mercaptopropiltrimetoxisilano

MUA – ácido 11-mercaptoundecanóico

MW – Micro-ondas

MWAC – (*do inglês: Microwave Assisted Chemistry*) Química assistida por micro-ondas

NHS – N-hidroxissuccinimida

PBS – (*do inglês: Phosphate Buffer Solution*) Tampão fosfato-salino

RI – Índice de refração

RIU – Unidades de índice de refração

S – Sensibilidade

UV-VIS – UV-Visível

$\lambda_{\max}$  – Comprimento de onda do máximo de extinção

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1	NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (MNPs) .....	14
2.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs).....	16
2.3	SÍNTESE VERDE DE AgNPs .....	17
<b>2.3.1</b>	<b>Extratos vegetais</b> .....	18
2.3.1.1	Extrato de rabanete ( <i>Raphanus Sativus</i> ) .....	18
2.4	SÍNTESE VERDE DE AgNPs ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS .....	19
2.5	BIOSENSORES NANOPLASMÔNICOS (LSPR).....	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
4.1	MATERIAIS.....	26
4.2	MÉTODOS .....	27
<b>4.2.1</b>	<b>Preparação do extrato de rabanete</b> .....	27
<b>4.2.2</b>	<b>Síntese Verde de AgNPs via Micro-ondas</b> .....	27
4.2.2.1	Estabilidade ao longo do tempo .....	28
4.2.2.2	Efeito do pH reacional.....	28
<b>4.2.3</b>	<b>Montagem de lâminas de vidro impregnadas com AgNPs</b> .....	28
<b>4.2.4</b>	<b>Sensibilidade do substrato plasmônico</b> .....	29
<b>4.2.5</b>	<b>Montagem do biossensor nanoplasmonico e detecção da estreptavidina</b> .....	30
<b>4.2.6</b>	<b>Caracterização dos materiais</b> .....	30
4.2.6.1	Espectroscopia UV-Visível.....	30
4.2.6.2	Microscopia eletrônica de transmissão .....	31
4.2.6.3	Espectroscopia no Infravermelho.....	31

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>32</b>
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DAS AgNPs.....	32
5.1.1	<b>Variação das concentrações de extrato e AgNO<sub>3</sub></b> .....	<b>33</b>
5.1.2	<b>Efeito do pH reacional</b> .....	<b>37</b>
5.1.3	<b>Estudo da estabilidade</b> .....	<b>42</b>
5.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AgNPs.....	44
5.2.1	<b>Proposta de rota de síntese verde das AgNPs</b> .....	<b>46</b>
5.3	PRODUÇÃO DE SLIDES IMPREGNADOS COM AgNPs.....	47
5.3.1	<b>Análise da sensibilidade do sensor baseado em AgNPs</b> .....	<b>48</b>
5.4	FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS AgNPs IMPREGNADAS .....	49
5.4.1	<b>Aplicação como biossensor nanoplasmonico</b> .....	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>52</b>
	<b>APÊNDICE A: SÍNTESE DE AgNPs COM CASCA DO RABANETE</b> .....	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo e manipulação de estruturas na escala nanométrica é uma área conhecida como Nanociência, enquanto a tecnologia que emprega essas nanoestruturas em aplicações, em dispositivos eletrônicos por exemplo, é chamada Nanotecnologia (BAYDA *et al.*, 2020). Essas áreas lidam com estruturas de tamanho entre 1 e 100 nanômetros, sendo que 1 nanômetro é em média 60.000 vezes menor que o diâmetro de um fio de cabelo (BAYDA *et al.*, 2020).

Durante uma entrevista pelo Instituto de Física de São Carlos, o pesquisador da USP Prof. Dr. Osvaldo Novais destacou a importância da nanotecnologia em suas diferentes aplicações, como por exemplo no auxílio a tratamentos quimioterápicos menos agressivos (SINTRA, 2019) e no desenvolvimento de dispositivos sensores e biossensores portáteis para a detecção de diferentes doenças, como para o câncer pancreático, como recentemente desenvolvido no Brasil utilizando nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas (SOARES *et al.*, 2018).

É cada vez mais necessário o desenvolvimento de sensores e biossensores acessíveis e rápidos para o controle de doenças e na agricultura, principalmente nos países em ascensão (JL *et al.*, 2014). Por conta disso, dispositivos com baixo preço, portáteis e eficientes que produzam resultados de forma rápida, sensível e seletiva para esse tipo de aplicação são almejados (ZEIRI, 2020). Neste sentido, biossensores baseados em nanopartículas metálicas (MNPs) vem sendo cada vez mais explorados na construção de biossensores por permitirem portabilidade, baixo custo e seletividade para a detecção de biomoléculas (PAIGE HALL; N. NGATIA; P. VAN DUYNE, 2011).

MNPs vem sendo aplicadas em nanobiossensores a partir da modificação de suas superfícies com material biológico (DNA, vitaminas, enzimas etc.) (JL *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014). As MNPs interagem com a luz devido ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) que é altamente sensível à alterações próximas às superfícies destas MNPs, sendo por isso explorado como meio transdutor durante a detecção (SANTOS *et al.*, 2016).

Dentre as MNPs, as nanopartículas de prata (AgNPs) se destacam por terem baixo custo, possuírem propriedades bactericidas únicas e produzirem uma intensa

e sensível banda LSPR identificada por espectroscopia UV-VIS (o que as tornam uma excelente opção na construção de biossensores do tipo LSPR) (JOUYBAN; RAHIMPOUR, 2020; NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015).

Há diferentes métodos reportados na literatura para a síntese e obtenção de AgNPs, porém, geralmente as metodologias empregam reagentes tóxicos e caros ou processos demorados que podem demandar muita energia (RAJESHKUMAR; BHARATH, 2017). É, portanto, notável a necessidade da síntese e desenvolvimento desses nanomateriais por métodos mais sustentáveis, simples e de baixo custo. Com esta motivação, neste trabalho objetivou-se sintetizar AgNPs por uma metodologia verde acelerada por irradiação micro-ondas, assim como estudar os efeitos da composição reacional nas propriedades ópticas e morfológicas das AgNPs e avaliar uma provável rota de formação dessas nanoestruturas. Extratos aquosos de rabanete rosa atuaram na redução e estabilização das AgNPs substituindo reagentes tóxicos comuns. Essas nanopartículas foram então utilizadas na montagem de substratos plasmônicos em vidro e posteriormente funcionalizadas com biotina para a biodeteção da proteína estreptavidina como prova-de-conceito.

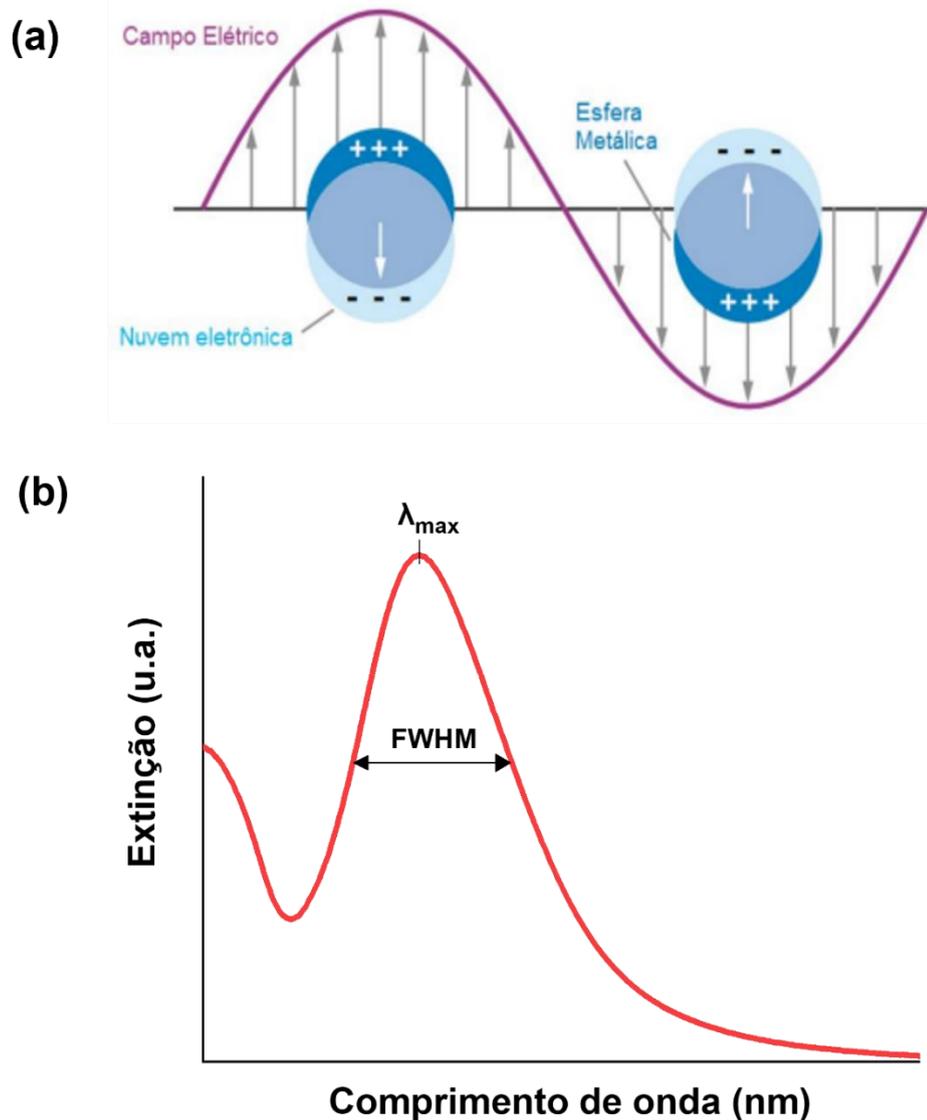
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (MNPs)

MNPs são metais diminuídos à escala de  $10^{-9}$  metros e estão sendo cada vez mais explorados em diversas aplicações. Metais de cunhagem como prata e ouro, geralmente com tamanho de 1-100 nm, apresentam características excepcionais e diferentes dos respectivos materiais em *bulk* (em escala macroscópica), por isso estão sendo empregados em diferentes áreas, como na degradação de poluentes tóxicos e em tratamentos de diferentes tipos de câncer (LIU, X.Y. et al., 2021; STRAPASSON et al., 2020). A principal vantagem na síntese e desenvolvimento das MNPs se deve às suas características intrínsecas, que podem ser facilmente otimizadas a partir de mudanças na morfologia, no tamanho, no meio e na composição desses nanomateriais (LANCE KELLY et al., 2002). Por isso há a necessidade do desenvolvimento de métodos de síntese que resultem em MNPs com tamanho e morfologia bastante controlados. MNPs têm propriedades diferentes do *bulk* devido a sua elevada razão superfície/volume, isso influencia por exemplo na reatividade de suas superfícies (SLAVIN et al., 2017).

Uma das propriedades mais marcantes das MNPs é a sua interação com a luz, que explica o comportamento óptico desses materiais. Devido a um fenômeno intrínseco chamado ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR), elétrons oscilam coletivamente em resposta à excitação promovida pela luz incidente na superfície desse nanometal, com comprimento de onda específico (Figura 1a). Essa interação produz oscilações plasmônicas com frequência ressonante que depende da composição, geometria, tamanho e meio dielétrico das MNPs (LANCE KELLY et al., 2002). Ocorre em MNPs com tamanhos bem menores que o comprimento de onda da luz incidente, causando separação momentânea de carga, grande absorção e espalhamento de luz pelas MNPs, sendo que a resultante desses dois últimos fenômenos é chamada de extinção (SANTOS et al., 2016). A extinção pode ser observada por espectros UV-VIS (Figura 1b), onde são formadas as bandas plasmônicas com o seu máximo ( $\lambda_{max}$ ), largura a meia altura (FWHM) e intensidade dependentes das propriedades das MNPs sintetizadas, da distância entre elas e do índice de refração do meio (LANCE KELLY et al., 2002).

**Figura 1:** (a) Esquema geral do fenômeno LSPR em nanopartículas metálicas. (b) banda plasmônica resultante do LSPR com seu FWHM e  $\lambda_{\max}$  destacados



Fonte: (a) adaptado com permissão de (WILLETS; VAN DUYNE, 2007); (b) autoria própria

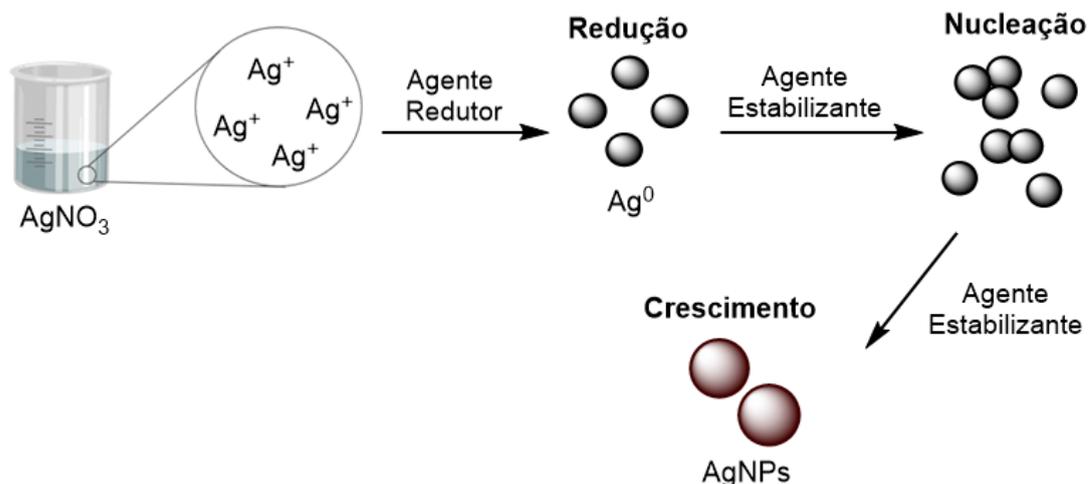
A Plasmônica ficou conhecida como o estudo dessa interação luz-matéria, que possibilitou uma vasta gama de avanços. Dentre eles a produção de fotocatalisadores com maior eficiência na produção de energia a partir da luz solar, na biomedicina com poderosos agentes bactericidas e na produção de sensores sensíveis com menor custo e fácil manuseio (BINDHU; UMADEVI, 2014; LIU, R. *et al.*, 2021).

## 2.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

As AgNPs são uma das MNPs mais empregadas. São utilizadas por terem menor custo que outros metais, como AuNPs por exemplo. Também possuem citotoxicidade superior comparadas a outras MNPs (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015), além de terem aplicações importantes na medicina (CHUNG *et al.*, 2016). Ademais, o LSPR é muito intenso e sensível às variações de morfologia e do meio adjacente às AgNPs, podendo ser utilizados em sensores baseados nesse fenômeno (JOUYBAN; RAHIMPOUR, 2020). O seu comprimento de onda de extinção geralmente ocorre próximo a 400 nm.

Há diferentes abordagens de obtenção de AgNPs (PRYSHCHEPA; POMASTOWSKI; BUSZEWSKI, 2020). Métodos que envolvem a diminuição do tamanho a partir do *bulk* até a nanoescala são conhecidos como *top-down*. Por outro lado, a síntese química (*bottom-up*) é a formação de AgNPs por reações químicas partindo-se dos precursores (Figura 2). A redução química é o método mais utilizado por ser simples e que permite a obtenção de AgNPs com tamanho controlado (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015).

**Figura 2:** Esquema representativo da síntese de AgNPs pelo método químico (*bottom-up*).



Fonte: autoria própria

Comumente são empregados quatro reagentes na síntese *bottom up*: o precursor metálico, o redutor, o estabilizante e o solvente. Conforme ilustrado na Figura 2, íons prata (geralmente vindos de um sal inorgânico dissolvido, como o

AgNO<sub>3</sub>) são reduzidos, formando átomos de prata livres. Logo após, há o processo de nucleação e crescimento devido a agregação desses átomos, enquanto são envoltos por reagentes estabilizantes evitando assim a formação de agregados maiores.

Grande parte das sínteses químicas de AgNPs empregam o borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) por ser um redutor relativamente forte, formando AgNPs praticamente monodispersas. Agnihotri e colaboradores, por exemplo, obtiveram amostras de AgNPs com diâmetros médios bastante específicos, variando entre 5 e 100 nm, a partir do controle os processos de síntese e proporção dos reagentes utilizados (AgNO<sub>3</sub>, NaBH<sub>4</sub> e citrato trissódico como redutor secundário/agente estabilizante) (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014).

### 2.3 SÍNTESE VERDE DE AgNPs

Porém, muitas vezes essas abordagens de síntese estão associadas ao uso de reagentes tóxicos/caros (RAJESHKUMAR; BHARATH, 2017). No caso da síntese química com NaBH<sub>4</sub>, ele é reativo, tóxico em contato com a pele, além de ser sensível à umidade e danoso ao meio ambiente. Ou seja, é necessário cuidado redobrado ao realizar esse método de síntese de AgNPs.

A Química Verde envolve o desenvolvimento de produtos e processos para reduzir ou eliminar o uso e geração de substâncias perigosas. Com a formulação dos seus doze preceitos, a Química Verde vem sendo aplicada em todos os setores industriais, melhorando a eficiência e a sustentabilidade dos processos (ANASTAS; EGHBALI, 2010). Dentre esses preceitos, há recomendações como (KHARISOV *et al.*, 2019):

- a) Prevenir desperdícios/resíduos;
- b) Reduzir a toxicidade de produtos utilizados;
- c) Usar solventes “saudáveis” ou não empregar solventes;
- d) Usar catalisadores

Com as recomendações dessa abordagem menos danosa se difundindo entre os pesquisadores, novas metodologias sintéticas estão sendo utilizadas e almejadas para a obtenção de AgNPs (BUDARIN *et al.*, 2015; SRINIVAS *et al.*, 2010; STRAPASSON *et al.*, 2021). Empregar restos de alimentos (como a casca/raízes de

vegetais) é uma forma de reduzir a toxicidade dos produtos empregados na síntese de AgNPs, substituindo o  $\text{NaBH}_4$  por exemplo. Já a utilização de água como solvente é uma ótima opção por ser uma fonte renovável, disponível e barata, seguindo os preceitos da Química Verde.

Na síntese de AgNPs, a elevação da temperatura reacional pode acelerar a reação. Dentre os métodos de aquecimento, o induzido por irradiação micro-ondas (MW) já foi relatado como eficiente e homogêneo e é considerado como um método verde de aquecimento pois requer bem menos energia que aquecimentos convencionais (KHARISOV *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2020).

Ou seja, a Síntese Verde de AgNPs surgiu com o objetivo de se obter o produto de interesse a partir de reagentes menos poluentes (ou reagentes verdes) e/ou em processos que demandem menos gasto de energia (KHALIL *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2020; RIAZ *et al.*, 2021).

### 2.3.1 Extratos vegetais

Uma alternativa verde para a síntese de AgNPs é com a utilização de extratos vegetais. Folhas, caules, cascas, raízes e sementes possuem biomoléculas como compostos flavonoides, fenólicos e terpenoides com propriedades redutoras e/ou estabilizantes que podem promover a formação de AgNPs (RAJESHKUMAR; BHARATH, 2017). As vantagens da utilização de plantas na síntese de nanoestruturas incluem seu menor preço, fácil aquisição e manuseio além de que esses vegetais não são danosos ao meio ambiente (CHUNG *et al.*, 2016). Por ser um método mais ecológico, não-patogênico e de baixo custo, há o interesse na aplicação em grande escala, e por isso, esta abordagem que vem sendo cada vez mais utilizada na síntese de AgNPs (CHANDHIRASEKAR *et al.*, 2021; GHAFFARI-MOGHADDAM; HADI-DABANLOU, 2014; MEDDA *et al.*, 2015).

#### 2.3.1.1 Extrato de rabanete (*Raphanus Sativus*)

O rabanete rosa (*Raphanus Sativus*) é um vegetal de origem mediterrânea cultivado durante o ano todo (Figura 3). Suas folhas, casca e interior esbranquiçado (raiz) podem servir de agentes redutores/estabilizantes na síntese de nanomateriais

(GOYENECHÉ *et al.*, 2015; HANLON; BARNES, 2011). Esse vegetal recentemente possibilitou a formação de nanopartículas de óxido de zinco a partir do extrato das suas raízes e AgNPs a partir de suas folhas. (ALI; YOUSEF; NAFADY, 2015; LIU D. *et al.*, 2020).

**Figura 3:** Rabanete rosa (*Raphanus Sativus*)



Fonte: autoria própria

#### 2.4 SÍNTESE VERDE DE AgNPs ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Um problema relacionado à formação de AgNPs utilizando extratos vegetais é a cinética lenta de reação à temperatura ambiente, de forma que sejam necessárias 18, 48 e 72 horas por exemplo quando utilizados extratos de rabanete, aloe vera e camomila, respectivamente (ALI; YOUSEF; NAFADY, 2015; MEDDA *et al.*, 2015; UDDIN *et al.*, 2017). Uma forma de acelerar esse processo é por meio da elevação da temperatura reacional. Dentre as formas de aquecimento, a química assistida por micro-ondas (MWAC) é considerada como um método eficiente, *eco-friendly* e homogêneo para a síntese de nanoestruturas (KUMAR *et al.*, 2020), que pode permitir a síntese de AgNPs ocorra em segundos de irradiação (STRAPASSON *et al.*, 2021).

As micro-ondas (MW) fazem parte do espectro eletromagnético com comprimento de onda entre o infravermelho e a radiofrequência. Essas ondas não têm energia o suficiente para quebrar/formar ligações químicas, porém esses fenômenos ocorrem baseados no “aquecimento dielétrico por micro-ondas” dos

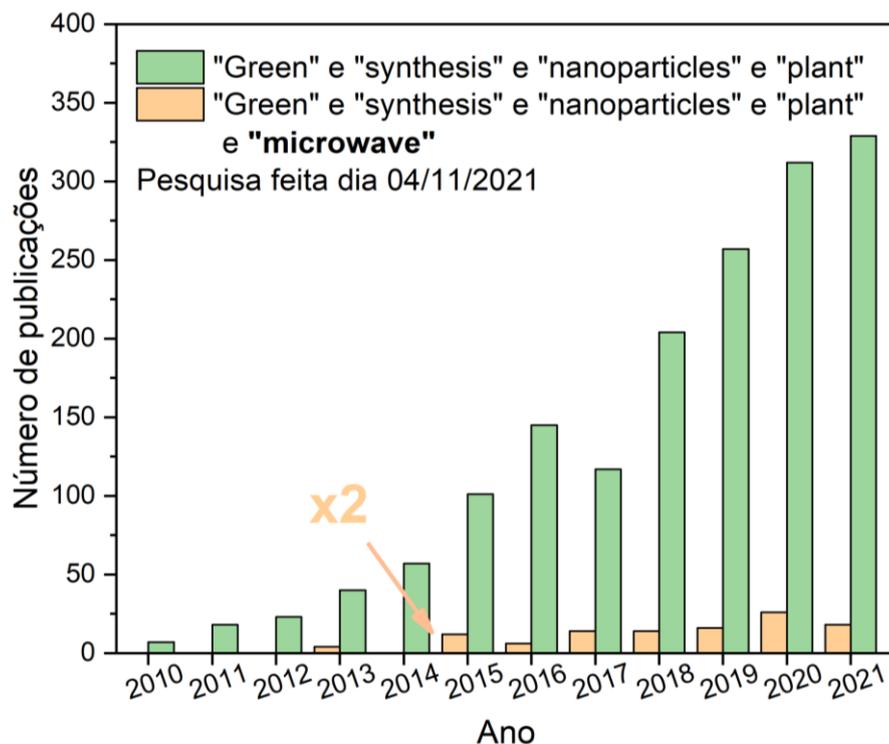
compostos, que está relacionado a habilidade do material em questão de absorver as MW e as transformar em energia térmica (SCHEFFER, 2014).

Há diferentes interações que podem promover o aumento de temperatura por MWAC, como a polarização dipolar e a condução iônica. A primeira utiliza a variação do campo elétrico das MW com o tempo para provocar a agitação/colisão de moléculas polares presentes (como a água), transformando a energia eletromagnética absorvida em calor (BUDARIN *et al.*, 2015). Já a condução iônica, são os íons dissolvidos (como  $\text{Ag}^+$ ) que oscilam sob influência das MW gerando calor também por colisão (SCHEFFER, 2014).

É notório que o aquecimento via MWAC é diferente do aquecimento convencional. Enquanto via MWAC há a agitação em todo o volume reacional pela interação direta das MW com as moléculas, o convencional aquece somente as paredes do recipiente. Este é um método demorado e ineficiente de transferência de calor pois gera gradientes e temperatura que podem diminuir a homogeneidade de diâmetro das AgNPs obtidas (KUMAR *et al.*, 2020; SCHEFFER, 2014). Por outro lado, os principais benefícios da utilização de MWAC são, por exemplo, o menor tempo de reação, a utilização de menos energia e a alta reprodutibilidade por fornecer um aquecimento mais homogêneo (KUMAR *et al.*, 2020).

O cenário científico revela um crescente número de estudos relacionados à síntese verde de nanopartículas utilizando plantas nos últimos onze anos (Figura 4). Porém, a mesma tendência de crescimento não é vista para metodologias envolvendo o MWAC. Estes dados ilustram como a síntese verde de MNPs assistida por MW é uma metodologia inovadora e pode ser ainda bastante explorada, sendo então uma abordagem ainda mais interessante e única para a síntese verde de AgNPs.

**Figura 4:** Número de publicações que contêm as palavras-chave: *synthesis*; *green*; *nanoparticles*; *plant* no abstract comparadas à mesma busca incluindo *microwave*. Fonte: Web of Science.



Fonte: autoria própria

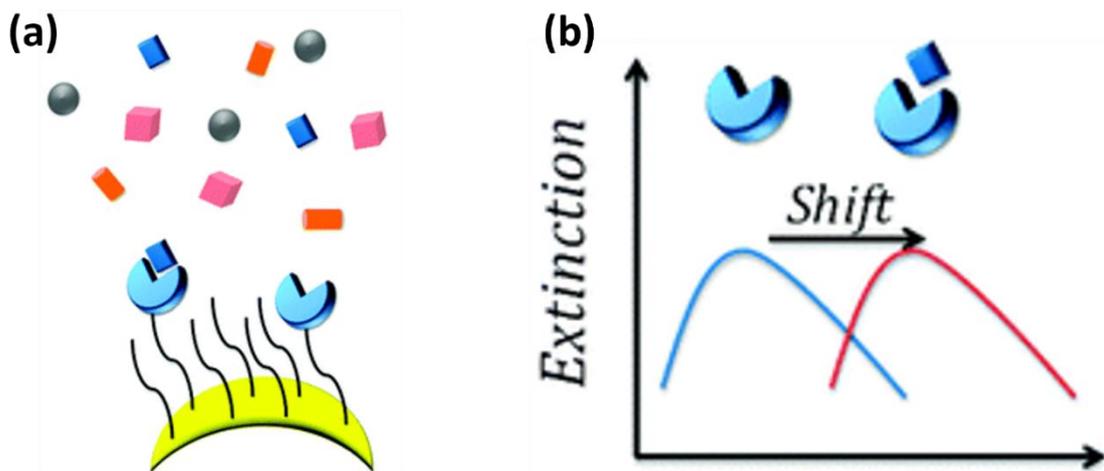
## 2.5 BIOSSENSORES NANOPLASMÔNICOS (LSPR)

Sensor é um dispositivo que responde a um estímulo físico ou químico e o converte em um sinal detectável para fins de monitoramento. É constituído basicamente por um receptor, que é o responsável por transformar a informação detectada em energia, e um transdutor, que transforma essa energia em um sinal mensurável. Os biossensores possuem um componente adicional na sua configuração, o elemento de bioreconhecimento que traz alta especificidade a estes dispositivos devido às altas afinidades envolvendo biomoléculas (PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

Os materiais plasmônicos como MNPs são amplamente estudados como biossensores devido à facilidade de funcionalização e elevadas sensibilidades. Além disso, apresentam resposta em tempo real e são de baixo custo já que não necessitam de nenhuma instrumentação complexa. O fenômeno LSPR resulta em uma banda plasmônica na região visível do espectro com alta sensibilidade ao tamanho, formato e ambiente dielétrico onde se encontram as MNPs.

Como esquematizado na Figura 5a, os biossensores baseados em LSPR podem utilizar dessa sensibilidade para detectar de forma rápida eventos na superfície das MNPs, como a ligação de moléculas (ANKER *et al.*, 2008). A superfície das MNPs é funcionalizada com o elemento de bioreconhecimento que se ligam de forma específica ao analito (nesse exemplo, por conta da forma quadrangular do analito que se encaixa no bioreceptor), sendo possível o seu reconhecimento em uma amostra complexa. Essa detecção pode ser observada pelo deslocamento do  $\lambda_{\max}$  para maiores comprimento de onda (Figura 5b) (JOUYBAN; RAHIMPOUR, 2020). Esse deslocamento com a adsorção de espécies na superfície ocorre devido a elevação do índice de refração (RI) local (SANTOS *et al.*, 2016).

**Figura 5:** Representação do biossensoriamento por LSPR (a) MNP onde uma camada foi depositada na superfície se ligando ao analito de forma específica (b) o espectro de extinção sofrendo um deslocamento para o vermelho com a ligação específica próximo da superfície da MNP.

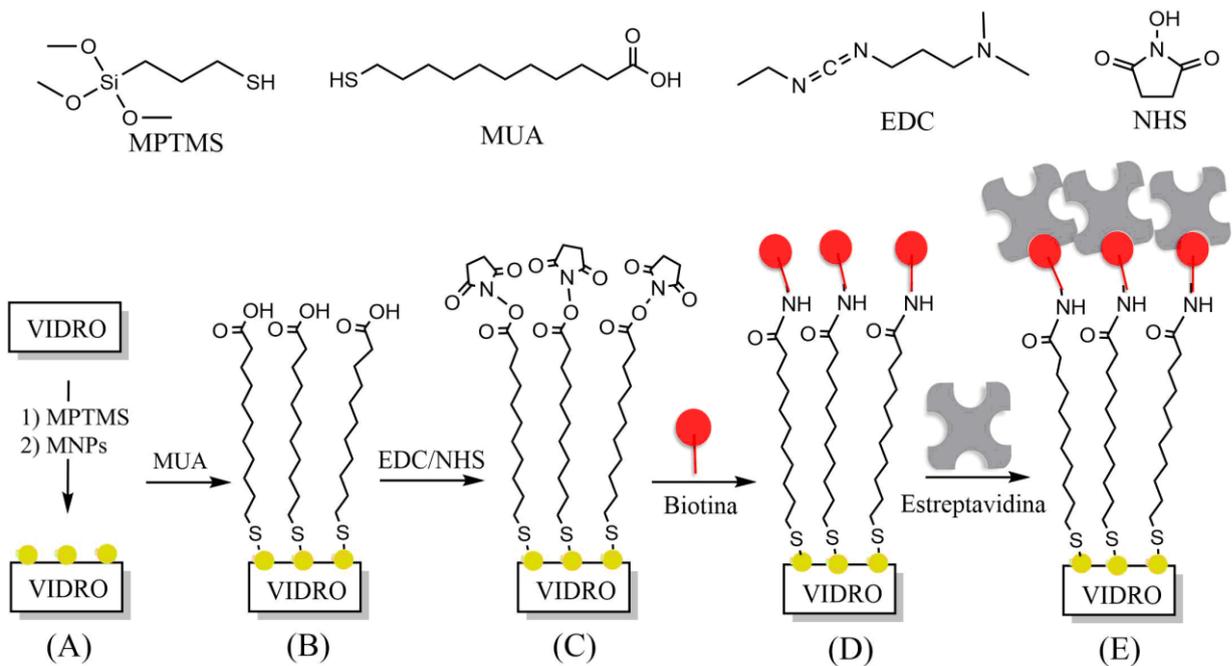


Fonte: adaptado com permissão de (BOLDUC; MASSON, 2011). *Copyright 2011 American Chemical Society.*

Um método de análise da eficiência desses dispositivos é com a determinação de sua sensibilidade. Essa sensibilidade para os biossensores nanoplasmonicos pode ser obtida a partir da inclinação de uma curva de calibração (ou curva analítica) da resposta do sistema versus concentração do analito (ou RI) (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019). Grandes respostas frente a pequenas variações da concentração do analito ou RI do meio são almejadas visando uma alta sensibilidade.

Para aplicação como biossensor, as MNPs precisam ser funcionalizadas. Uma estratégia está ilustrada na Figura 6. Consiste na impregnação de MNPs em uma lâmina de vidro com o auxílio de um ligante, como o 3-mercaptopropilmetoxisilano (MPTMS) (Figura 6A). Após, há a modificação da superfície com ácido-mercaptopundecanóico (MUA) (Figura 6B) e posterior ativação com 1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxissuccinimida (NHS) (Figura 6C), deixando assim a superfície funcionalizada para ligações covalentes com grupamentos amino, comumente presentes nos elementos de bioreconhecimento. Esta estratégia é muito utilizada na literatura, permitindo a aplicação do biossensor por exemplo no reconhecimento de ligações antígeno-anticorpo, detecção de genótipos do HPV e detecção da estreptavidina partir da interação dessa proteína com a biotina (KIM et al., 2015; PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019; ANKER et al., 2008; SILVA et al., 2014). A estreptavidina possui quatro sítios de ligação com a biotina e é muito empregada por se ligar de forma específica à essa vitamina (Figura 6D-E).

**Figura 6:** Esquema do processo de detecção da estreptavidina a partir de um slide de MNPs funcionalizado. (A) impregnação de MNPs no vidro utilizando o ligante MPTMS; (B) MUA sobre o filme de AgNPs; (C) a formação de espécies reativas com succinimida após o tratamento com EDC/NHS; (D) imobilização da biotina; (E) ligação da estreptavidina com a biotina imobilizada.



Fonte: autoria própria

A MNPs podem ser usadas no biossensoriamento tanto dispersas em solução quanto na forma de filmes em suportes sólidos. No entanto, a primeira forma se torna inviável devido às várias etapas necessárias para análise, que envolvem centrifugação, lavagem e ressuspensão (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019). Adicionalmente, Peixoto e colaboradores mostraram recentemente que a utilização de filmes de nanobastões de ouro promoveu o aumento da sensibilidade plasmônica comparado à dispersão coloidal destas nanoestruturas. Isso ocorreu devido ao acoplamento entre os campos eletromagnéticos das AuNPs por estarem próximas, levando a um aumento do campo eletromagnético localizado que faz o sistema todo ser mais sensível a pequenas mudanças no RI (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019).

De acordo com nosso conhecimento, a literatura ainda não reportou a utilização de AgNPs sintetizadas por extratos vegetais via MWAC na construção de biossensores, sendo uma abordagem inovadora do presente trabalho.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi sintetizar AgNPs por uma metodologia rápida e verde acelerada por irradiação micro-ondas.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a síntese de AgNPs variando a concentração do extrato, do precursor de prata e pH reacional;
- Avaliar as propriedades ópticas e morfológicas das AgNPs obtidas por meio de espectroscopia UV-Visível e microscopia eletrônica de transmissão;
- Monitorar a estabilidade óptica das AgNPs;
- Propor uma rota de síntese de AgNPs com extrato de rabanete;
- Obter filmes de AgNPs em slides de vidro;
- Determinar a sensibilidade dos filmes de AgNPs frente a variações de índice de refração;
- Funcionalizar os slides de AgNPs para biodetecção de estreptavidina como prova-de-conceito.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados neste trabalho estão descritos abaixo e foram usados na forma como foram recebidos.

- $\text{AgNO}_3$  (Neon; p.a);
- Rabanete rosa (Comercial Zaffari Ltda, Porto Alegre - RS) ;
- Etanol (Química moderna; p.a);
- Acetona (Anidro; p.a);
- NaOH (Sigma Aldrich;  $\geq 98\%$ )
- $\text{HNO}_3$  (Química Moderna; 65%)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Vetec; 95%);
- $\text{H}_2\text{O}_2$  (Química Moderna; p.a);
- 3-Mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTMS) (Sigma Aldrich; 95%);
- Água deionizada;
- Água ultrapura (18,2 M $\Omega$ .cm, Milli-Q) foi utilizada na preparação das soluções;
- D (+) Glicose (Sigma Aldrich;  $\geq 99,5\%$ );
- Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) (Sigma Aldrich; 95%);
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma Aldrich;  $\geq 98\%$ );
- N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Aldrich,  $\geq 99,5\%$ );
- Biotina (Sigma Aldrich;  $\geq 99\%$ )
- Estreptavidina (Sigma Aldrich)

## 4.2 MÉTODOS

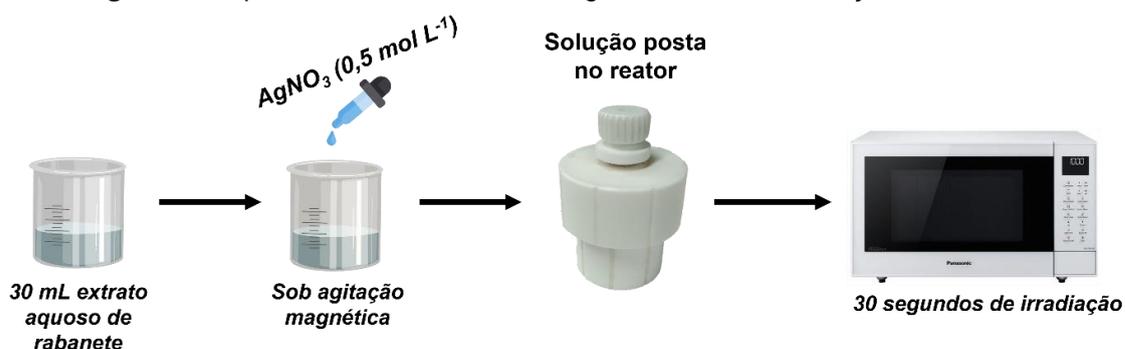
### 4.2.1 Preparação do extrato de rabanete

Para a preparação do extrato aquoso de rabanete, o vegetal foi lavado com água da torneira, descascado, lavado novamente com água deionizada e então seco com papel filtro. A parte interior foi triturada em um liquidificador de cozinha Philips 600 W com água mili-Q (ou uma mistura 4/1 em volume de água/etanol) até a homogeneização. As concentrações de raízes de rabanete foram variadas entre 0,125 e 2 g mL<sup>-1</sup>, visando a análise de como esse fator impactaria nas propriedades das AgNPs obtidas. Por fim, a solução resultante foi filtrada à vácuo a fim de se obter só o líquido, utilizando filtros de vidro sinterizado G2 e G4. Houve a utilização do extrato em temperatura ambiente ou aquecido até a fervura.

### 4.2.2 Síntese Verde de AgNPs via Micro-ondas

Um esquema da síntese está representado na Figura 7. A partir de uma solução de AgNO<sub>3</sub> estoque (0,5 mol L<sup>-1</sup>), diferentes concentrações foram utilizadas para a síntese de AgNPs (entre 1,5 e 6 mmol L<sup>-1</sup>). Em um béquer foram adicionados 30 mL do extrato e levado para agitação por 30 segundos, seguindo da solução de AgNO<sub>3</sub> com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µL. O agitador foi retirado e a solução passada para um reator de teflon. A solução foi irradiada por 30 segundos em um micro-ondas de cozinha Panasonic (1600 W na potência máxima). A mesma síntese também foi realizada empregando extrato da casca de rabanete, com concentração de 0,5 g mL<sup>-1</sup> de extrato e 4,5 mmol L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>.

**Figura 7:** Esquema da síntese verde de AgNPs utilizando irradiação micro-ondas



Fonte: autoria própria

#### 4.2.2.1 Estabilidade ao longo do tempo

As propriedades ópticas das AgNPs foram acompanhadas ao longo do tempo para avaliar sua estabilidade (durante 4-5 meses). A dispersão pós síntese de AgNPs obtida sem a alteração de pH foi diluída previamente com água e guardada no escuro ou exposta à luz do laboratório, dentro de tubos falcon de polipropileno. Já a dispersão em pH 11,4 foi diluída na hora da análise. Ambas foram acompanhadas por espectroscopia UV-VIS.

#### 4.2.2.2 Efeito do pH reacional

A fim de avaliar as propriedades ópticas das AgNPs adquiridas em diferentes condições, o pH reacional também foi alterado. Gotas de soluções concentradas de HNO<sub>3</sub> ou NaOH foram adicionadas aos extratos preparados conforme descrito na seção 4.2.1, sendo posteriormente utilizados na síntese de AgNPs (4.2.2). O monitoramento do pH dessas soluções foi realizado com um medidor de pH de bancada PHOX P1000, com compensação automática de temperatura. O pH do extrato de rabanete inalterado variou entre 6,5 e 6,8. Houve a irradiação de 30 mL do extrato puro por 30 segundos como comparação (ou branco) à solução contendo AgNPs.

#### 4.2.3 Montagem de lâminas de vidro impregnadas com AgNPs

Filmes de AgNPs foram obtidos sobre lâminas de vidro (slides) de microscópio. Após serem cortadas transversalmente em tamanhos de aproximadamente 0,8 cm de largura, as lâminas passaram por processos de limpeza adaptados de uma metodologia reportada previamente (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019), conforme descrito abaixo:

1. Em um béquer grande, as lâminas foram imergidas em etanol e sonicadas por 10 minutos em um equipamento Maxiclean 1600 Unique;
2. Cada uma delas foi lavada com água deionizada;
3. Em outro recipiente, esses slides foram imersos em acetona e novamente sonicados por 10 minutos;

4. Estes foram lavados com água deionizada e solução piranha ( $\text{H}_2\text{O}_2$  /  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1:3 em volume) para retirar restos de matéria orgânica;
5. Por último, os slides foram lavados por água deionizada mais uma vez

Posteriormente, para a adsorção das AgNPs, as lâminas de vidro foram primeiro modificadas utilizando um ligante, o 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTMS). Onde, depois de limpos, os slides foram imersos em uma solução etanólica de MPTMS ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) por 24h, sendo que a  $60^\circ\text{C}$  nas primeiras 2h e o restante à temperatura ambiente. Depois, estes foram lavados com etanol e água para remover qualquer excesso de MPTMS que não se ligou ao vidro. Esse processo foi seguido por uma etapa de cura por 2h a  $120^\circ\text{C}$  a fim de aumentar o grau de polimerização do MPTMS ligado no vidro e a posterior adesão das AgNPs. Finalmente, houve a imersão dos slides na dispersão coloidal de AgNPs por aproximadamente 48h a  $35^\circ\text{C}$ , para impulsionar a primeira deposição de nanopartículas sobre o vidro.

Para as demais deposições de AgNPs, o vidro foi mergulhado em uma solução contendo  $300 \mu\text{L}$  de MPTMS e  $250 \mu\text{L}$  de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em  $25 \text{ mL}$  de água. Depois de 20 minutos, este foi retirado e lavado com água deionizada para ser adicionado à dispersão de AgNPs novamente, por 1h a  $35^\circ\text{C}$ . O mesmo procedimento foi realizado para a formação das demais deposições de AgNPs. Esse processo de formação do filme foi acompanhado por espectroscopia UV-VIS do slide em água utilizando como linha de base um slide apenas com MPTMS em água.

#### **4.2.4 Sensibilidade do substrato plasmônico**

A sensibilidade do slides com multicamadas de AgNPs montado em 4.2.3 foi avaliada pela aquisição de espectros UV-VIS dessa lâmina em meios com diferentes índices de refração (RI) a  $16^\circ\text{C}$ . Para isso, 5 soluções com crescentes concentrações de glicose ( $0\text{-}100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram preparadas, resultando em meios com RIs variando entre 1,3335 e 1,3477 RIU (unidades de índice de refração). O  $\lambda_{\text{max}}$  se desloca para maiores comprimentos de onda com o aumento do RI e é possível determinar a sensibilidade (S) das AgNPs ao meio com esse deslocamento. O índice de refração foi determinado por um refractômetro digital ATAGO 4410.

#### 4.2.5 Montagem do biossensor nanoplasmonico e detecção da estreptavidina

A detecção via LSPR de proteínas envolve uma série de etapas relacionadas à superfície do filme de MNPs (Figura 6). A montagem do biossensor nanoplasmonico ocorreu a partir da funcionalização da superfície das AgNPs impregnadas na lâmina de vidro (4.2.3). O biossensor *label free* foi formado usando a metodologia proposta por Peixoto *et al* (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019). Primeiramente, o substrato após uma deposição de AgNPs foi posto em uma solução etanólica de 1 mmol L<sup>-1</sup> de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) por 72 h. O MUA possui um grupo tiol, que se liga covalentemente às AgNPs. Logo após foi lavado com etanol e água e posto em uma solução 1:1 de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) de 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 3 h.

Posteriormente, o biossensor foi modificado com um elemento de bioreconhecimento (biotina) que se liga de forma específica ao analito (estreptavidina), seguindo a seguinte metodologia (PEIXOTO, 2015): o substrato foi posto em uma solução de biotina 6 mg mL<sup>-1</sup> em dimetilsulfóxido por 6 h. Após esse procedimento, o substrato estava pronto para interagir com a estreptavidina e foi imerso em uma solução contendo 0,125 mg mL<sup>-1</sup> dessa proteína por 15 minutos em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7. A funcionalização do slide de AgNPs foi acompanhada por espectroscopia UV-VIS do slide em PBS pH 7.

#### 4.2.6 Caracterização dos materiais

##### 4.2.6.1 Espectroscopia UV-Visível

Para atestar a formação e caracterizar as AgNPs de forma simples, utilizou-se da espectroscopia UV-VIS. As dispersões coloidais de AgNPs foram analisadas com um equipamento Cary® 50 UV-VIS – Agilent dentro de uma cubeta de quartzo 1x1 cm<sup>2</sup> e em uma faixa de comprimentos de onda de 800-200 nm.

Já para o acompanhamento da impregnação e funcionalização das AgNPs, o Cary® 5000 UV-VIS – Agilent com um feixe retangular de 30 mm<sup>2</sup> foi utilizado. As

lâminas foram imersas em água, em soluções de glicose ou PBS dentro de uma cubeta de quartzo de 1x1 cm<sup>2</sup>.

#### 4.2.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Para verificar a existência de AgNPs, suas morfologias e calcular os diâmetros médios, foram feitas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) usando *grids* de carbono/cobre. O microscópio Tecnai G2 200 kV utilizado pertence ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Para a contagem manual dos diâmetros das AgNPs, o software ImageJ foi empregado.

#### 4.2.6.3 Espectroscopia no Infravermelho

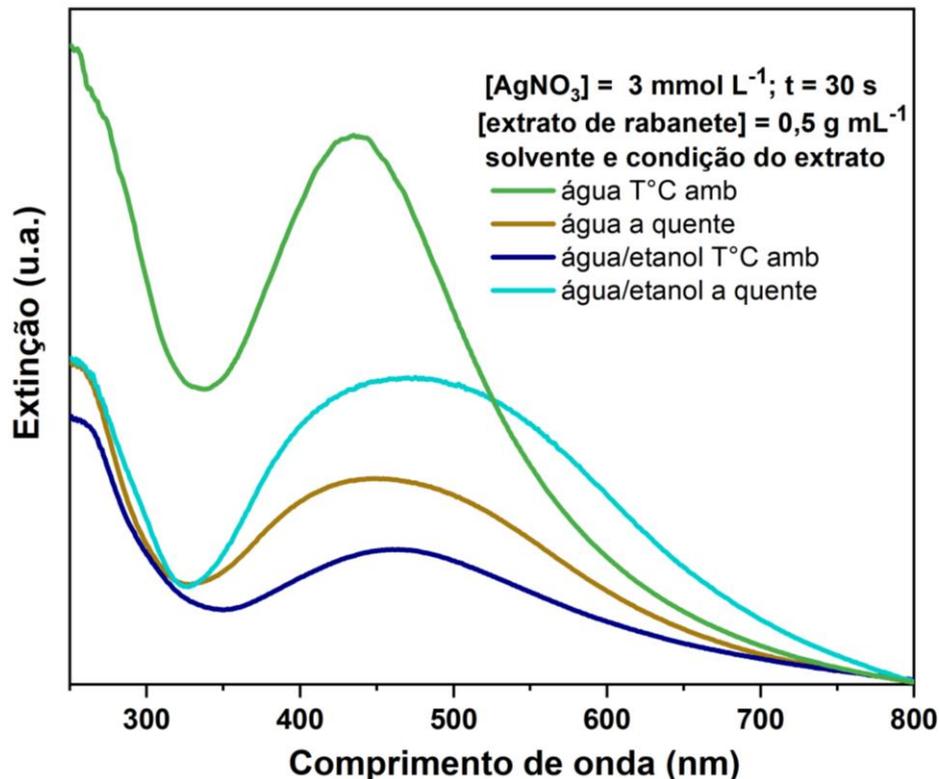
A caracterização estrutural dos extratos de rabanete e dispersões de AgNPs em dois diferentes pH foi realizada através da técnica de espectroscopia no infravermelho com reflexão total atenuada (FTIR-ATR), utilizando um espectrômetro modelo Alpha-Bruker com a obtenção de espectros na faixa de 500 a 4000 cm<sup>-1</sup> com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. As soluções foram postas em placas Petri e secas na estufa por 4 horas a 80°C, e o material sólido resultante foi raspado da placa e analisado.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DAS AgNPs

A metodologia de síntese das AgNPs foi inicialmente investigada alterando a composição e temperatura do extrato de rabanete. Outro parâmetro analisado foi a temperatura, onde extratos (feitos com água ou água/etanol como solventes) foram aquecidos em uma chapa até a fervura antes de serem misturados com  $\text{AgNO}_3$  (Figura 8). Uma ideia sobre a forma e a distribuição de tamanho das AgNPs pode ser obtida a partir da largura, posição e formato da banda plasmônica. Nesse sentido, a presença de uma única banda estreita sugere a formação de AgNPs com pequena distribuição de tamanhos de partícula enquanto bandas alargadas indicam o oposto (PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

**Figura 8:** Espectro UV-VIS das AgNPs sintetizadas em com diferentes solventes e condições.  $[\text{AgNO}_3] = 3 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$  após 30 segundos de irradiação micro-ondas.



Primeiramente foi visto que o aquecimento prévio do extrato promoveu um aumento na intensidade da banda referente às AgNPs obtidas em água/etanol. Porém, o alargamento dessa banda indica a menor homogeneidade de tamanho das

AgNPs, enquanto o deslocamento para um maior  $\lambda_{\max}$  (475 nm) indica o aumento do tamanho médio dessas nanoestruturas. Esse alargamento ocorreu provavelmente porque o extrato etanólico contém menor concentração de compostos fenólicos para estabilizar as AgNPs (comparando ao extrato aquoso, pois é um extrator menos eficiente), como já foi relatado na extração de fitoquímicos de folhas de *Annona muricata* (GAVAMUKULYA *et al.*, 2014). Ainda se destaca o favorecimento da formação das AgNPs em ambiente aquoso (sem etanol) à temperatura ambiente (Figura 8). GAVAMUKULYA e colaboradores também relataram que o extrato aquoso possuía maior poder redutor que o etanólico (GAVAMUKULYA *et al.*, 2014), o que justificaria as características da banda obtida com apenas água como solvente ( $\lambda_{\max}$  em 430 nm, além de ser mais intensa e estreita). Esses últimos resultados podem estar retratando a maior homogeneidade e a formação de mais AgNPs neste caso (SANTOS *et al.*, 2016). Por conta disso, as demais sínteses foram feitas apenas com água à temperatura ambiente como solvente do extrato. Sendo assim, a metodologia proposta requer apenas condições brandas e simples.

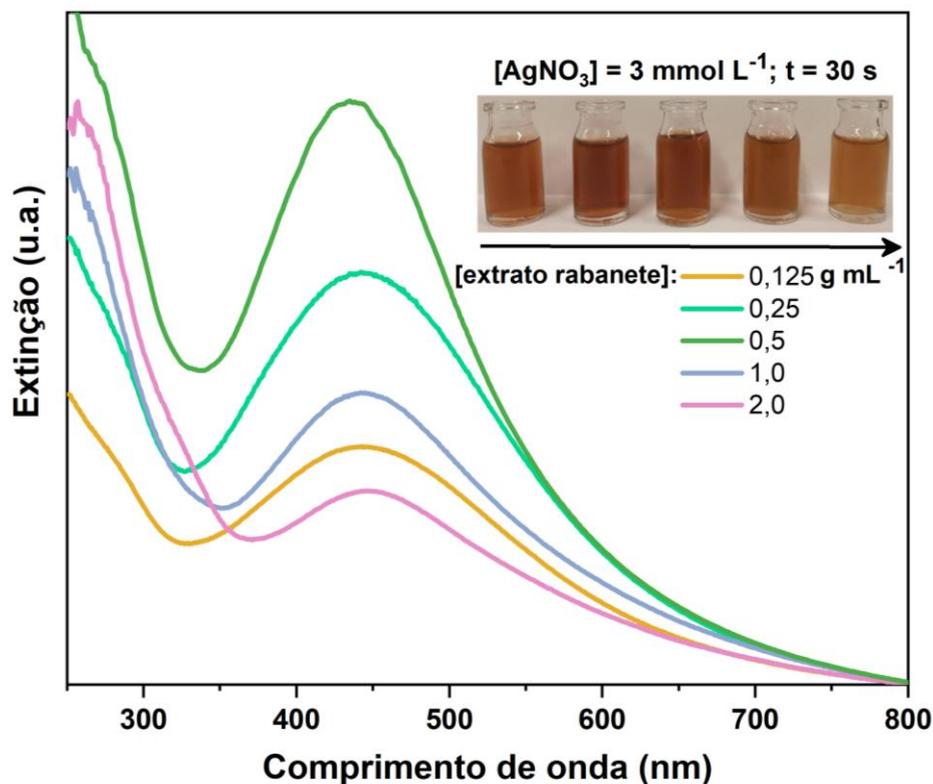
### 5.1.1 Variação das concentrações de extrato e $\text{AgNO}_3$

Para avaliar como as propriedades ópticas das AgNPs variam com a alteração da concentração dos reagentes, sintetizou-se amostras de AgNPs com diferentes quantidades de extrato e  $\text{AgNO}_3$ . No primeiro estudo, a concentração de  $\text{AgNO}_3$  foi mantida constante ( $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A Figura 9 mostra o espectro UV-VIS das AgNPs sintetizadas, assim como imagens das amostras obtidas. A cor das soluções pós-síntese variou entre amarelo escuro e marrom escuro dependendo da concentração de extrato (*inset* Figura 9), indicando a formação de AgNPs, uma vez que essa cor está associada ao fenômeno de LSPR que ocorre em suas superfícies.

Na Tabela 1 estão resumidos os valores de  $\lambda_{\max}$  (nm) e FWHM (nm) para as diferentes composições reacionais. Verificou-se que o  $\lambda_{\max}$  variou entre 436 e 447 nm (Tabela 1). O aumento da concentração de extrato até  $0,5 \text{ g mL}^{-1}$  causou o aumento da intensidade, o estreitamento (FWHM de 236 para 231 nm) e o deslocamento da banda plasmônica para a esquerda de  $\lambda_{\max}$  445 para 436 nm. Isso indica a redução do diâmetro médio e maior homogeneidade das AgNPs formadas, enquanto a intensidade aumentada da banda pode representar a maior eficiência da

síntese (SANTOS *et al.*, 2016), ilustrando como a concentração de extrato tem um papel importante nesse sentido. Em um estudo onde houve a formação de AgNPs a temperatura ambiente utilizando extrato de folhas de oliva, foi relatado que concentrações mais altas desse extrato poderiam reduzir íons prata e proteger a maioria das AgNPs contra a agregação, formando AgNPs menores e estáveis (KHALIL *et al.*, 2014). Picos em 260-280 nm são referentes a transições de compostos flavonoides (ANOUAR *et al.*, 2012), compostos aromáticos, carboxílicos e/ou carbonilas presentes no extrato (WEIBEL *et al.*, 2011).

**Figura 9:** Espectro UV-VIS das AgNPs sintetizadas com  $[AgNO_3] = 3 \text{ mmol L}^{-1}$ , concentrações crescentes do extrato de rabanete após 30 segundos de irradiação micro-ondas. *Inset:* dispersões de AgNPs com concentrações do extrato de rabanete aumentando da esquerda para a direita.



Contudo, para concentrações acima de  $0,5 \text{ g mL}^{-1}$ , houve decréscimo na intensidade e deslocamento do pico para a direita novamente (Tabela 1). Uma hipótese é que devido à alta quantia de biomoléculas vindas do rabanete, essas agora poderiam dificultar a formação e estabilização de AgNPs ao invés de promovê-las. Mansour e colaboradores também perceberam essa mesma tendência ao sintetizar AgNPs usando extrato de *Crataegus douglasii* e escolheram utilizar uma proporção intermediária de extrato/ $AgNO_3$  devido a posição do  $\lambda_{max}$

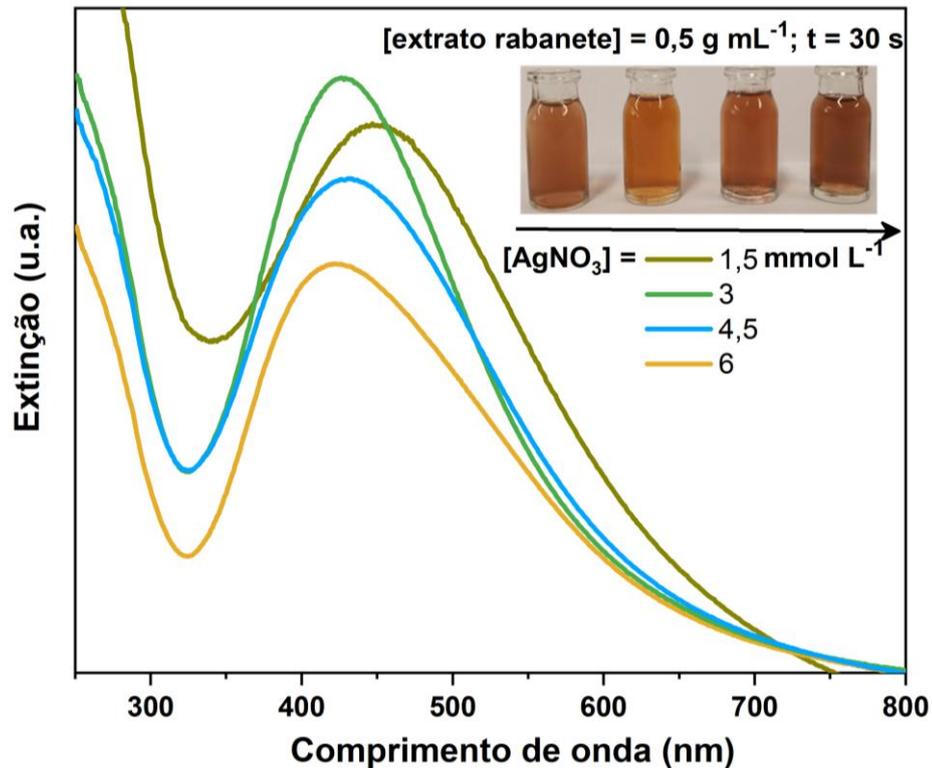
(GHAFFARI-MOGHADDAM; HADI-DABANLOU, 2014). Outro grupo mostrou que a síntese com altas taxas de conversão em AgNPs ocorreu com níveis intermediários de extrato de *Artemisia absinthium* e AgNO<sub>3</sub> (ALI *et al.*, 2016). Logo, por ter um pico intenso e com menor  $\lambda_{\max}$ , e FWHM, a concentração igual a 0,5 g mL<sup>-1</sup> foi usada nos demais experimentos.

**Tabela 1:**  $\lambda_{\max}$  e FWHM das bandas LSPR das AgNPs obtidas com diferentes concentrações de extrato de rabanete e 3 mmol L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>, após 30 segundos de irradiação micro-ondas

[Extrato rabanete] (g mL <sup>-1</sup> )	[AgNO <sub>3</sub> ] (mmol L <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\max}$ (nm)	FWHM (nm)
0,125	3	445	236
0,25	3	443	231
0,5	3	436	191
1,0	3	443	207
2,0	3	447	192

Posteriormente, o efeito da concentração de AgNO<sub>3</sub> foi estudado. Para isso, essa concentração foi aumentada a partir de 1,5 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 10), mantendo o extrato constante em 0,5 g mL<sup>-1</sup>. Para fins de comparação, o  $\lambda_{\max}$  (nm) e FWHM (nm) das bandas estão apresentados na Tabela 2. Os dados apresentados sugerem que quantidades do precursor de prata acima de 1,5 mmol L<sup>-1</sup> levam a uma diminuição do tamanho médio da partícula, assim como uma maior uniformização do seu diâmetro médio. Contudo, entre as AgNPs obtidas com concentrações de AgNO<sub>3</sub> maiores que 1,5 mmol L<sup>-1</sup>, não houve variações expressivas nas suas características ópticas. A amostra contendo 4,5 mmol L<sup>-1</sup> foi utilizada nos demais experimentos.

**Figura 10:** Espectro UV-VIS das AgNPs sintetizadas com concentrações crescentes de  $\text{AgNO}_3$  (em  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e  $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$  após 30 segundos de irradiação micro-ondas. *Inset:* dispersões coloidais das AgNPs com  $[\text{AgNO}_3]$  aumentando da esquerda para a direita.



**Tabela 2:**  $\lambda_{\text{max}}$  e FWHM das bandas LSPR das AgNPs obtidas com concentrações crescentes de  $\text{AgNO}_3$  (em  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e  $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$

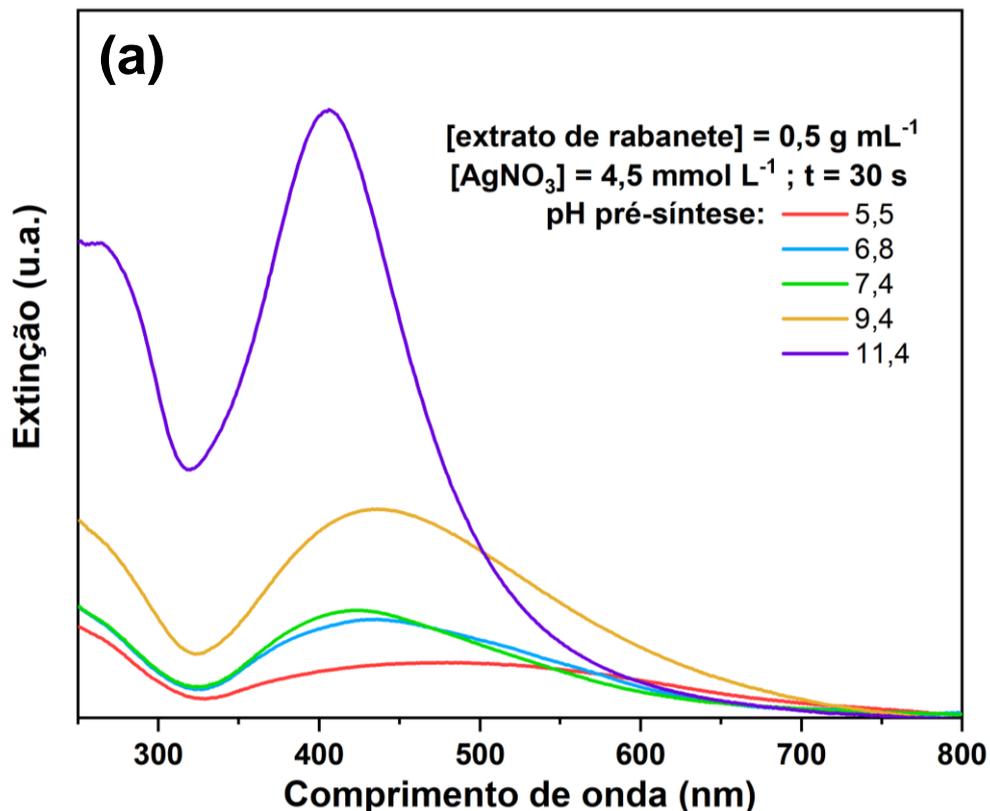
$[\text{AgNO}_3]$ ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	$[\text{Extrato de rabanete}]$ ( $\text{g mL}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	FWHM (nm)
1,5	0,5	447	232
3	0,5	426	168
4,5	0,5	431	199
6	0,5	422	192

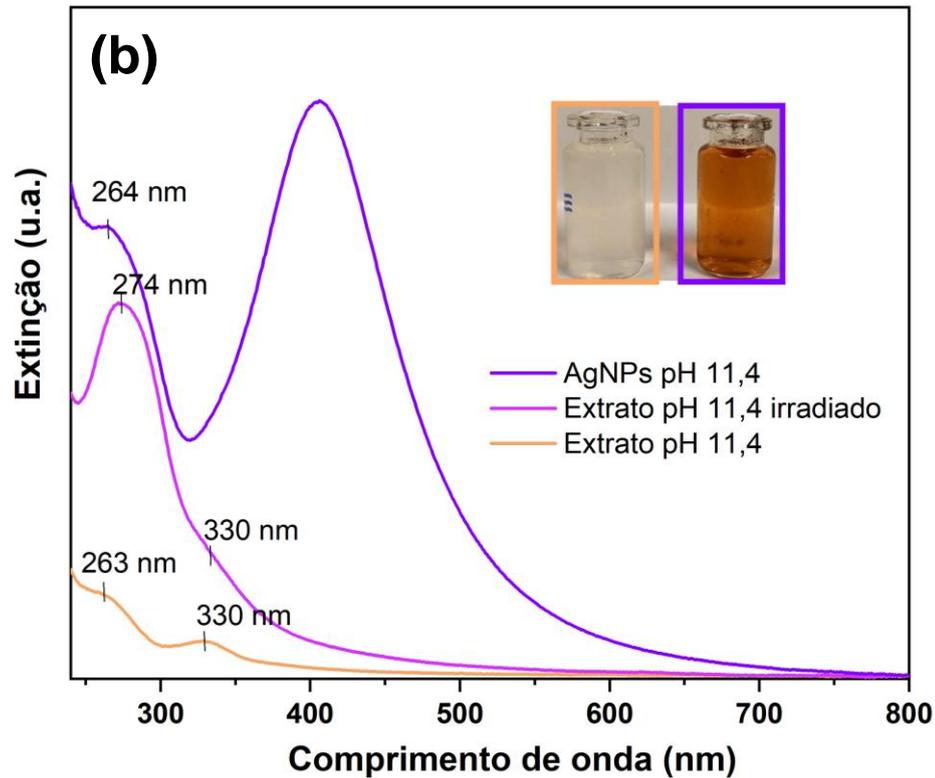
Pensando no aproveitamento dos resíduos gerados com a utilização desse vegetal, realizou-se, de forma alternativa, a síntese das AgNPs empregando apenas o extrato da casca do rabanete (Apêndice A). Devido a mudança de cor da solução para o amarronzado e o surgimento de uma banda plasmônica em 432 nm, pode-se afirmar que o produto foi formado, mostrando que esse método verde de obtenção de AgNPs pode empregar também restos de alimentos como reagentes.

### 5.1.2 Efeito do pH reacional

Outro parâmetro que pode alterar as propriedades das AgNPs é o pH do extrato utilizado, sendo que 6,8 foi o pH medido para o extrato puro neste caso. Com o aumento de pH, houve grande alteração da banda plasmônica das AgNPs formadas, com diminuição do  $\lambda_{\max}$  e ganho na intensidade chegando a um valor ótimo em pH 11,4 (Figura 11a). A banda plasmônica é bem estreita (FWHM = 126 nm) e deslocada para a esquerda com  $\lambda_{\max}$  em 406 nm (ou seja, indicando a formação de AgNPs com tamanho controlado e diâmetro médio pequeno) em relação aos pHs mais ácidos. Ademais, a cor amarronzada característica das AgNPs apareceu rapidamente após a mistura de  $\text{AgNO}_3$  e o extrato neste caso (antes da irradiação MW).

**Figura 11:** (a) Espectro UV-Vis das AgNPs em diferentes pHs; (b) extrato de rabanete puro, após a irradiação, bem como as AgNPs obtidas em pH 11,4. *Inset:* imagem do extrato e dispersão de AgNPs.





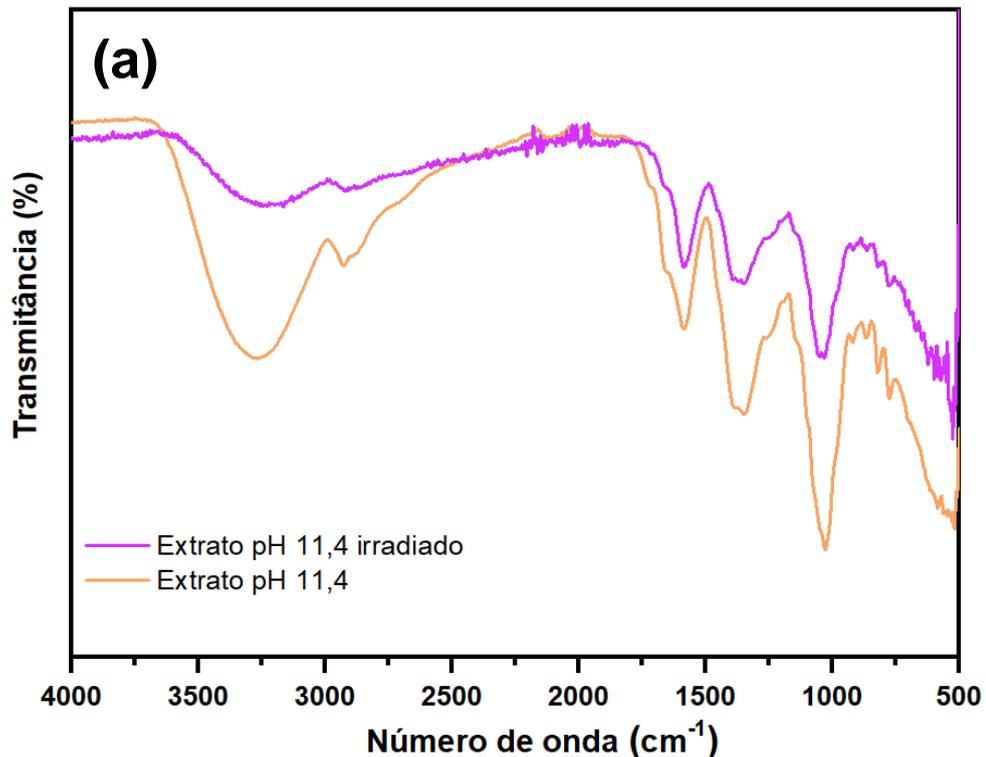
A origem desses resultados pode ser explicada pela variação do pH. RIAZ e colaboradores controlaram o tamanho médio de AgNPs obtidas via síntese hidrotérmica com a variação do pH do extrato de *Camellia Sinensis* utilizado (RIAZ *et al.*, 2021). Em solução básica, o potencial redutor de biomoléculas presentes no extrato pode aumentar, fazendo com que a formação de AgNPs ocorra de forma mais eficiente, homogênea e acelerada (KHALIL *et al.*, 2014). Isso explicaria o comportamento óptico das AgNPs sintetizadas em pH 11,4 e o visto experimentalmente com a rápida mudança de cor. Essa amostra foi considerada otimizada e utilizada para os testes envolvendo a montagem de dispositivos nanoplasmonicos.

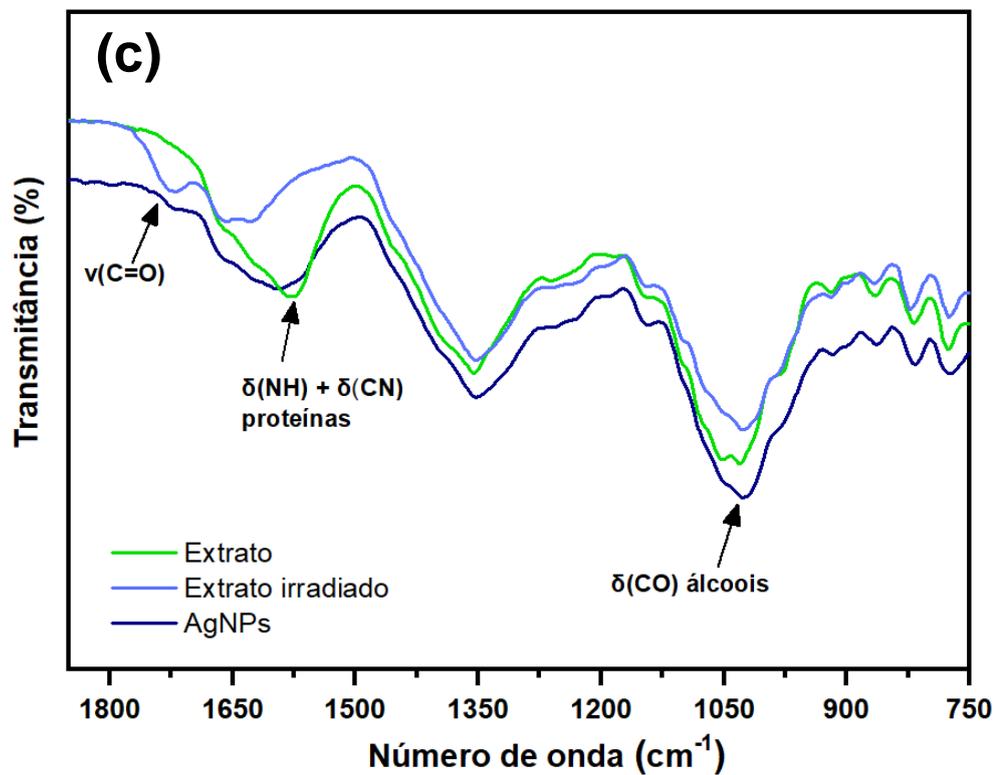
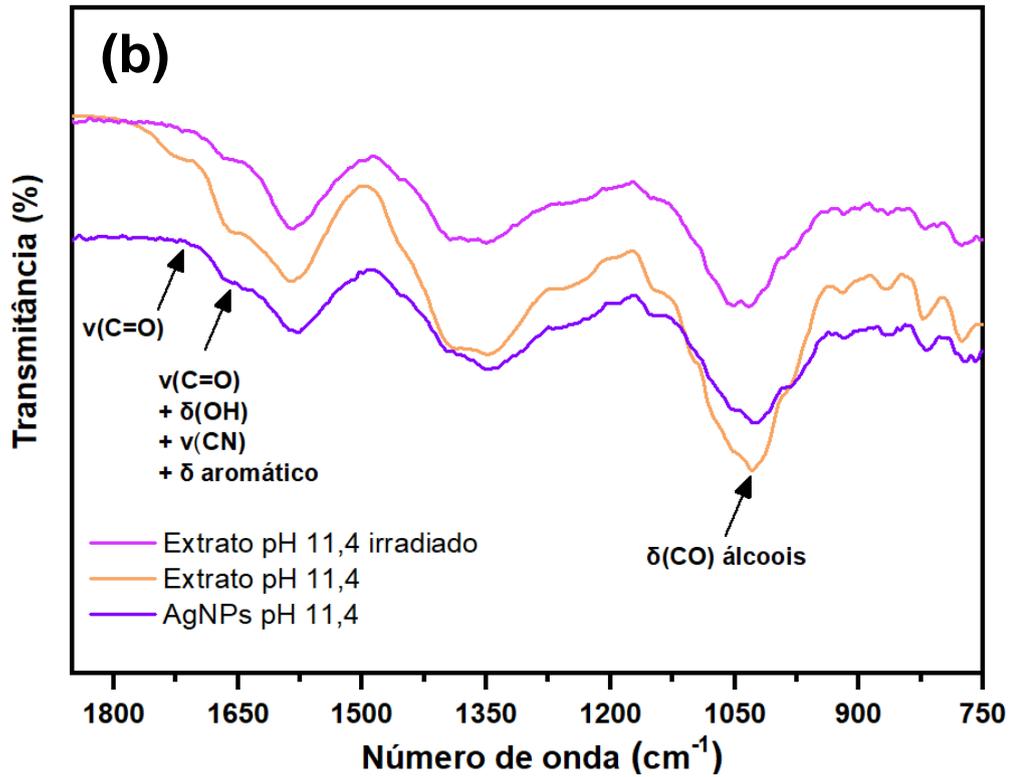
Também foi realizada a análise UV-VIS do extrato em pH 11,4 antes e após a irradiação (Figura 11b). Inicialmente a solução esbranquiçada (*inset* Figura 11b) apresentou os picos em  $\lambda_{\max}$  263 e 330 nm, referentes a transições de flavonoides (ANOVAR *et al.*, 2012), compostos aromáticos, carboxílicos e/ou carbonilas que absorvem nessa faixa do UV (WEIBEL *et al.*, 2011). Após 30 segundos de irradiação micro-ondas, o extrato de rabanete não sofreu variações visíveis na cor (não mostrado) mas houve alteração no espectro UV-VIS. Além disso, o pH diminuiu para próximo a 8,5. Essas alterações indicam que houve mudança de grupos

funcionais/quebra/formação de ligações com o aumento da temperatura formando grupos que absorvem mais fortemente o UV. Já com a adição de  $\text{AgNO}_3$ , o comportamento se alterou e houve a formação de AgNPs. A cor da solução escureceu para marrom amarelado (*inset* Figura 11b) apresentando uma banda em  $\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ nm}$ , além da banda característica das AgNPs.

Análises FTIR-ATR foram realizadas dos extratos, extratos após irradiação e AgNPs (Figura 12a-c). No geral, o padrão vibracional se manteve após a irradiação. As atribuições estão na Tabela 3, onde a presença de álcoois, proteínas, lipídios, compostos carbonílicos e aromáticos foi identificada. Na Figura 12b é possível ver que ao irradiar o extrato em pH 11,4, mudanças sutis ocorreram: o desaparecimento da banda em  $1723 \text{ cm}^{-1}$ , referente a  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , e o quase desaparecimento em  $1663 \text{ cm}^{-1}$  (referentes a  $\delta(\text{OH})$  água +  $\nu(\text{C}=\text{O})$  +  $\nu(\text{CN})$  proteínas +  $\delta$  anel aromático). O mesmo desaparecimento em  $1723 \text{ cm}^{-1}$  foi visto para a dispersão de AgNPs em pH 11,4. Além disso, a banda referente à  $\delta(\text{CO})$  de álcoois sofreu leve deslocamento de 1025 para  $1032 \text{ cm}^{-1}$  após a irradiação, tanto em pH 11,4 como na amostra sem alteração de pH (Figura 12c).

**Figura 12:** Espectros FTIR-ATR do extrato das raízes de rabanete e dispersão de AgNPs em pH 11,4 (a-b) e (c) sem alteração de pH antes e após a irradiação micro-ondas.





Já no extrato sem alteração de pH, o pico em  $1723 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ ), ficou mais evidente (Figura 12c) e a deformação em  $1650 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta(\text{NH}) + \delta(\text{CN})$ ) amida de

proteínas) desapareceu com a irradiação (sendo que com a adição de  $\text{AgNO}_3$  para a formação das AgNPs este último desaparecimento não ocorreu). Mudanças vibracionais ocorreram provavelmente em decorrência da mudança de grupos funcionais/formação/quebra de ligações após a irradiação. Essas mudanças com o pH reacional podem estar relacionadas à diferente capacidade redutora desses extratos e/ou à diferente estabilização das AgNPs.

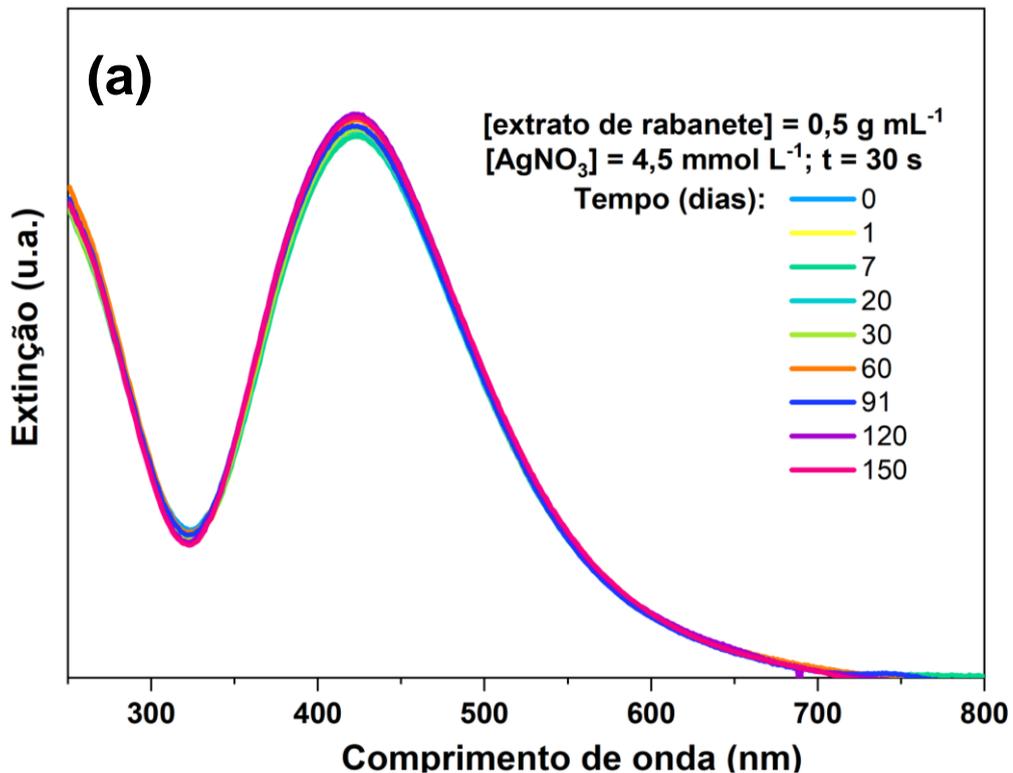
**Tabela 3:** Atribuição dos picos vibracionais referentes ao extrato de rabanete em pH 11,4

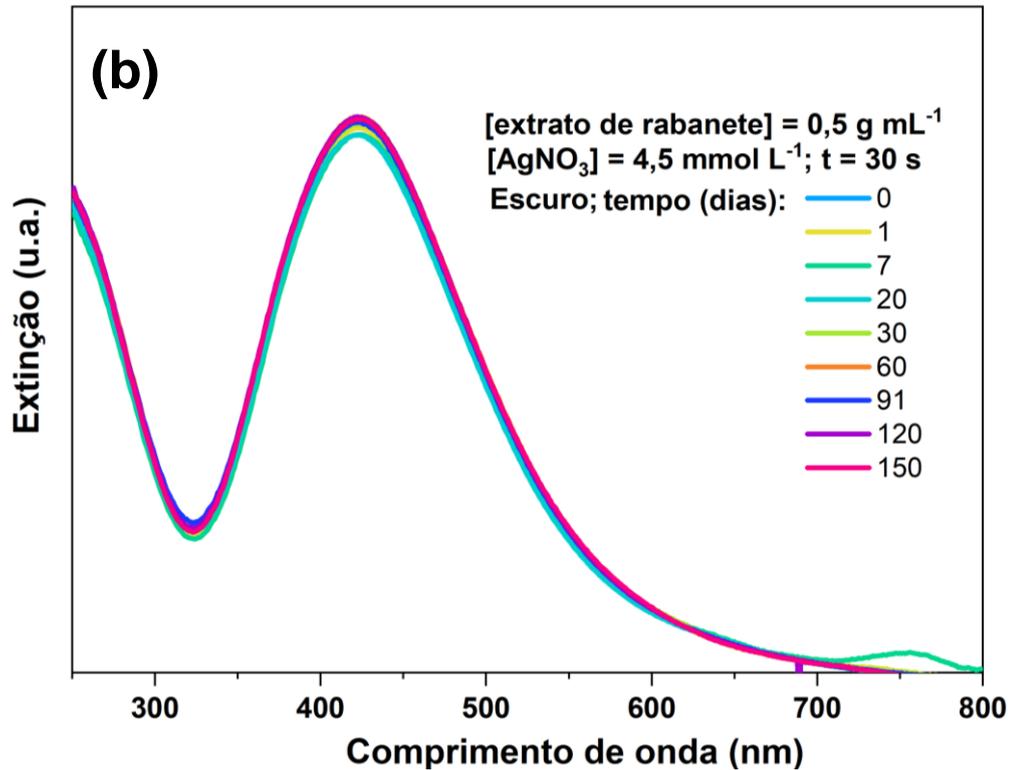
Pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
3270	$\nu(\text{OH})$ água/álcool + $\nu(\text{NH})$	(CHAYAVANICH; THIRAPHIBUNDET; IMYIM, 2020; OSUNTOKUN; ONWUDIWE; EBENSO, 2019)
2932 e 2889	$\nu(\text{CH})$ em $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$ de lipídios	(ZUVERZA-MENA <i>et al.</i> , 2016)
1723	$\nu(\text{C}=\text{O})$	(KHALIL <i>et al.</i> , 2014)
1663	$\delta(\text{OH})$ água/álcool + $\nu(\text{C}=\text{O})$ + $\nu(\text{CN})$ proteínas + $\nu$ anel aromático	(OSUNTOKUN; ONWUDIWE; EBENSO, 2019; ZUVERZA-MENA <i>et al.</i> , 2016)
1624	$\nu(\text{C}=\text{O})$ amida de proteínas	(CHAYAVANICH; THIRAPHIBUNDET; IMYIM, 2020; KHALIL <i>et al.</i> , 2014)
1586	$\delta(\text{NH})$ + $\delta(\text{CN})$ amida de proteínas	(CHAYAVANICH; THIRAPHIBUNDET; IMYIM, 2020; ZUVERZA-MENA <i>et al.</i> , 2016)
1394	$\nu(\text{C}=\text{C})$	(OSUNTOKUN; ONWUDIWE; EBENSO, 2019)
1054	$\delta(\text{COC})$ lignina e $\delta$ anel aromático	(CHAYAVANICH; THIRAPHIBUNDET; IMYIM, 2020; ZUVERZA-MENA <i>et al.</i> , 2016)
1025	$\delta(\text{CO})$ de álcool	(OSUNTOKUN; ONWUDIWE; EBENSO, 2019)

### 5.1.3 Estudo da estabilidade

Para que possam ser usadas com êxito na montagem de biossensores, as AgNPs devem ser estáveis ao longo do tempo. Essa característica foi analisada em uma amostra mantida no escuro e outra exposta a luz, obtidas sem alteração de pH (Figura 13a-b). Ao decorrer de 5 meses, praticamente nenhuma mudança ocorreu nas propriedades ópticas de ambas as amostras, mostrando que são estáveis e não fotossensíveis. O  $\lambda_{\max}$  permaneceu em 423 nm, enquanto o FWHM mudou de 150 nm para 152 e 153 nm para a amostra no escuro e à exposta a luz, respectivamente. O  $\lambda_{\max}$  e FWHM variaram aos obtidos na síntese de AgNPs mostrada anteriormente com os mesmos parâmetros (Tabela 2, onde  $\lambda_{\max} = 431$  nm e FWHM = 199 nm). A matriz do rabanete é complexa, ou seja, os resultados podem ter mudado ligeiramente de uma amostra para outra porque houve mudanças nas proporções de biomoléculas presentes nos extratos. Ademais, essas duas sínteses foram feitas em diferentes épocas do ano, o que também pode ter impactado a concentração das moléculas redutoras/estabilizantes nos extratos devido a temperatura de cultivo.

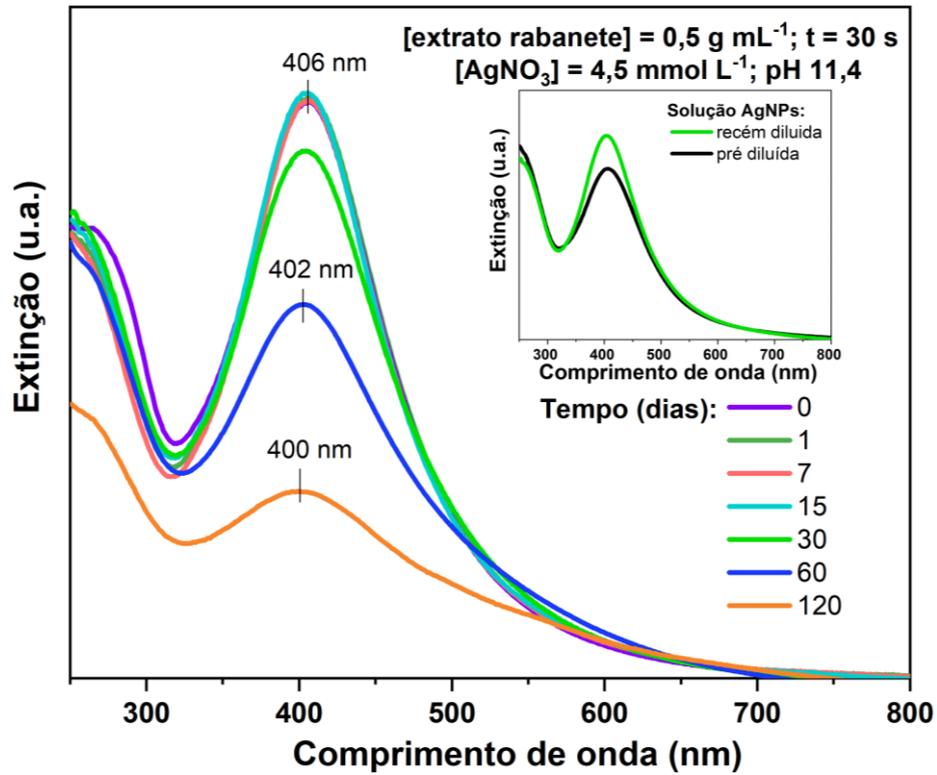
**Figura 13:** Estabilidade das AgNPs (a) expostas a luz do laboratório e (b) mantidas no escuro após 5 meses obtidas com  $[\text{AgNO}_3] = 4,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$ , após 30 segundos de irradiação micro-ondas.





A estabilidade das AgNPs obtidas em pH 11,4 foi acompanhada por 4 meses (Figura 14). Inicialmente houve uma leve queda no FWHM e após 30 dias observou-se diminuição na intensidade da banda (Tabela 4). O  $\lambda_{\max}$  partiu de 406 nm chegando a 400 nm, com posterior alargamento do pico. Uma hipótese é que parte dos átomos que compõem as AgNPs tenham sido redissolvidos na solução ao longo do tempo, levando a diminuição do tamanho médio e a intensidade da banda plasmônica. PERETYAZHKO e colaboradores mostraram AgNPs com diâmetro pequeno liberaram Ag<sup>+</sup> em uma taxa superior as com maior diâmetro (PERETYAZHKO; ZHANG; COLVIN, 2014). Além disso, essa análise de estabilidade foi realizada diluindo-se a dispersão coloidal no momento da medida, pois a diluição prévia causou maior queda na intensidade (*inset* Figura 14). Essa amostra apresenta estabilidade para ser utilizada em diferentes aplicações.

**Figura 14:** Estabilidade das AgNPs após 4 meses ( $[AgNO_3] = 4,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $[\text{extrato de rabanete}] = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$ ) obtidas em pH 11,4. *Inset:* Espectro UV-Vis da dispersão de AgNPs diluída previamente e recém diluída após 30 dias.



**Tabela 4:** Dados obtidos a partir da estabilidade das AgNPs sintetizadas em pH 11,4

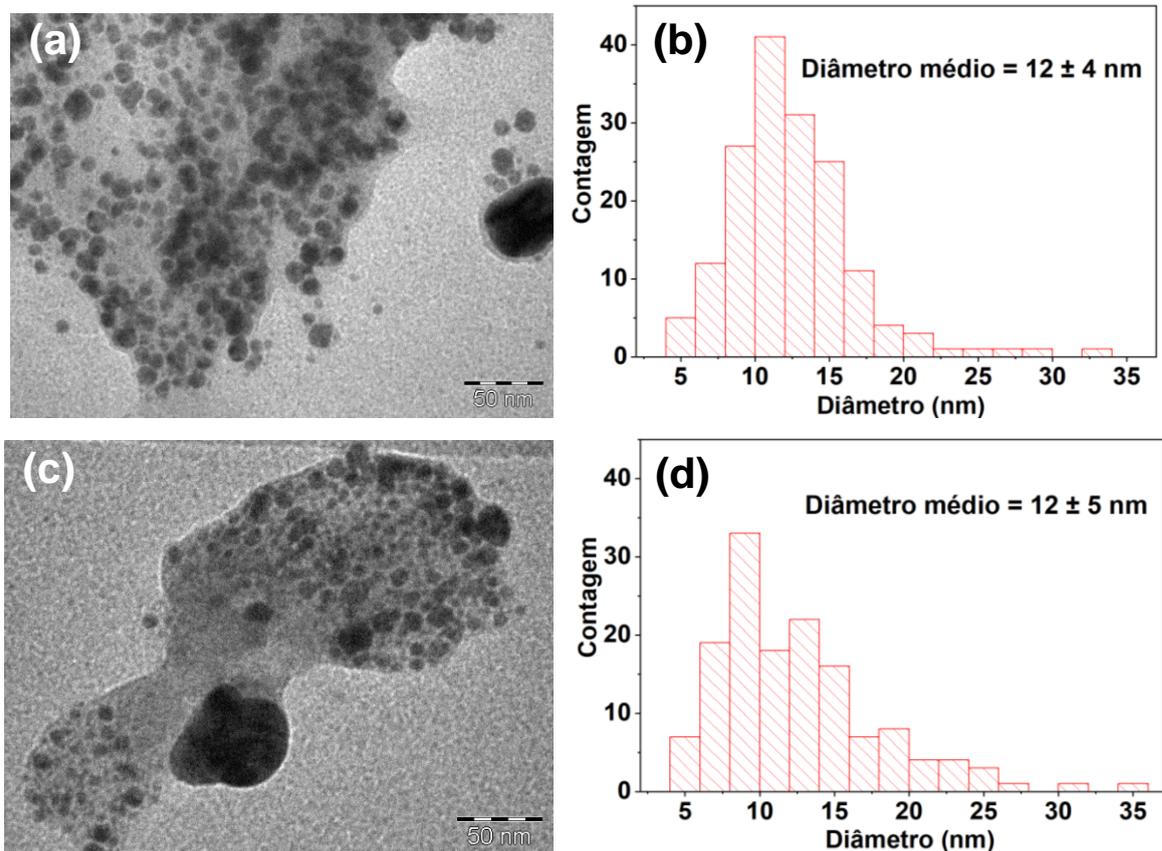
Tempo (dias)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	FWHM (nm)
0	406	129
1	406	119
7	405	117
15	405	118
30	404	134
60	402	162
120	400	179

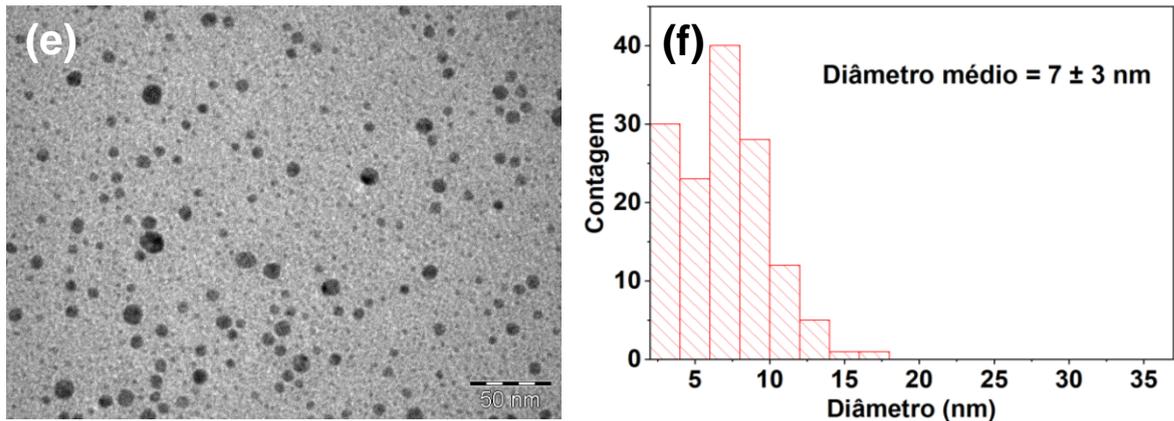
## 5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AgNPs

Análises morfológicas das AgNPs foram realizadas com MET. As amostras foram sintetizadas com  $0,5 \text{ g mL}^{-1}$  de rabanete e  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 15a),  $4,5 \text{ mmol}$

$L^{-1}$  (Figura 15c) ou  $4,5 \text{ mmol } L^{-1}$  de  $AgNO_3$  em pH 11,4 (Figura 15e). Essas tiveram seus diâmetros médios e desvios padrão determinados (Figura 15b,d,f). O comportamento óptico visto anteriormente nas Figuras 9 e 11 é corroborado pelas imagens, uma vez que as amostras sintetizadas com 3 e  $4,5 \text{ mmol } L^{-1}$  de  $AgNO_3$ , apresentaram tamanhos médios de  $12 \pm 4 \text{ nm}$  e  $12 \pm 5 \text{ nm}$ , respectivamente, não tão esféricos devido ao processo de aglomeração. Contudo, na amostra sintetizada em pH básico (Figura 15e-f) o diâmetro médio ficou em  $7 \pm 3 \text{ nm}$ , com menor desvio padrão entre as contagens e sem a presença de grandes aglomerados. AgNPs esféricas e mais homogêneas também foram identificadas nessa amostra, ilustrando como o pH da síntese realmente tem impacto nas propriedades morfológicas, como sugerido nos resultados apresentados na Figura 11. AgNPs pequenas foram sintetizadas por esse método de síntese verde.

**Figura 15:** Imagem por MET e histogramas com o diâmetro médio das AgNPs sintetizadas com [extrato de rabanete] =  $0,5 \text{ g mL}^{-1}$  e (a-b)  $3 \text{ mmol } L^{-1}$ , (c-d)  $4,5 \text{ mmol } L^{-1}$  de  $AgNO_3$  ou  $4,5 \text{ mmol } L^{-1}$  e alteração do pH a 11,4 (e-f). Escala das figuras MET 50 nm

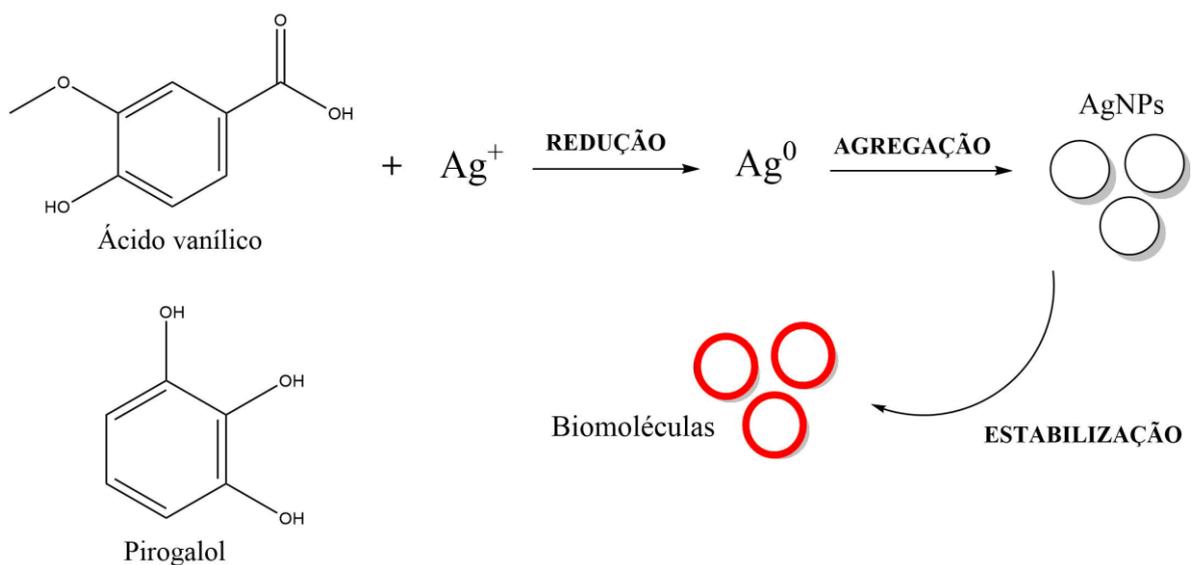




### 5.2.1 Proposta de rota de síntese verde das AgNPs

Uma proposta de rota foi sugerida para a síntese de AgNPs. Segundo Goyeneche e colaboradores, pirogalol e ácido vanílico são compostos fenólicos presentes em alta quantidade nas raízes do rabanete (GOYENECHÉ *et al.*, 2015). Esses podem estar participando ativamente na redução da prata iônica e na sua posterior estabilização, como está esquematizado na Figura 16. Esses compostos apresentam propriedades redutoras e estabilizantes e já foram previamente explorados na síntese de AgNPs (MARTÍNEZ-BERNETT *et al.*, 2016; ZAMANI; MORADSHAHI, 2013).

**Figura 16:** Esquema da proposta de reação de síntese de AgNPs.

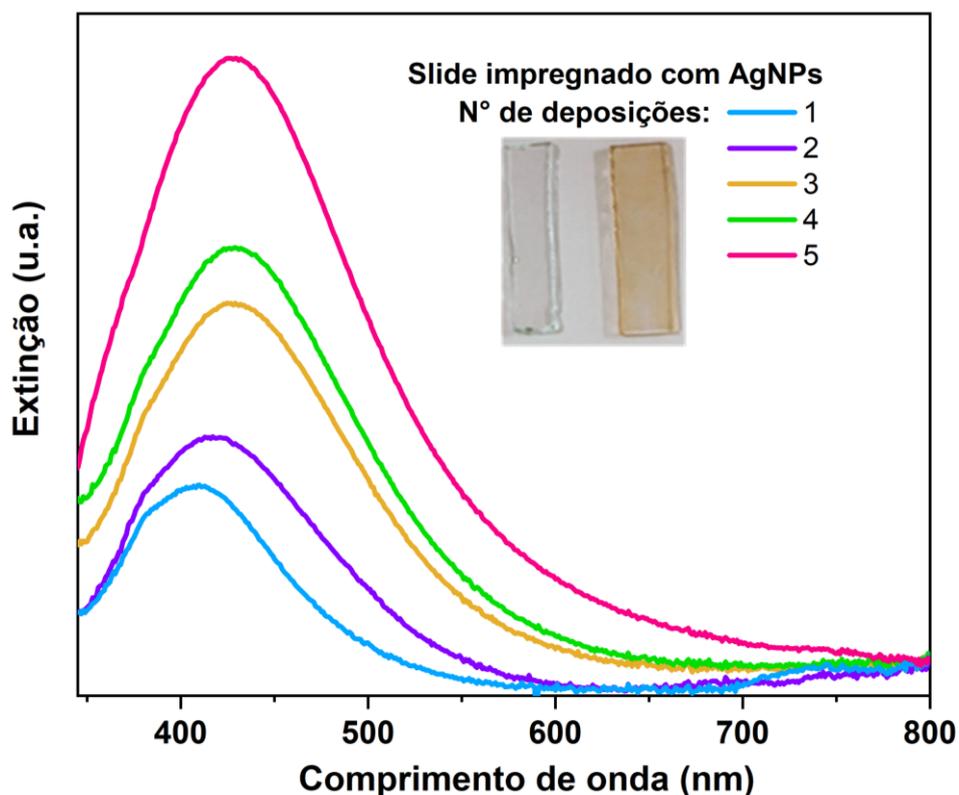


Fonte: Autoria própria

### 5.3 PRODUÇÃO DE SLIDES IMPREGNADOS COM AgNPs

Para ligar quimicamente o vidro com as AgNPs, reagente MPTMS foi empregado para promover a adsorção química pois se liga fortemente com as AgNPs a partir de ligações Ag-S (SILVA *et al.*, 2014). Depois de sucessivas deposições de AgNPs e MPTMS foram formados filmes com multicamadas de AgNPs. Esse processo foi acompanhado por espectroscopia UV-VIS como mostrado na Figura 17.

**Figura 17:** Espectro UV-VIS de uma lâmina de vidro em água após 5 deposições de AgNPs. AgNPs sintetizadas com  $0,5 \text{ g mL}^{-1}$  extrato de rabanete,  $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  em pH 11,4. *Inset:* Slide antes (esquerda) e após a impregnação de AgNPs (direita).



A formação de um filme homogêneo pode ser evidenciada pela alteração da coloração da lâmina de vidro (*inset* Figura 17). Adicionalmente, a formação das camadas múltiplas foi evidenciada pelo aumento da intensidade da banda plasmônica após cada deposição. Houve aumento no  $\lambda_{\text{max}}$  e FWHM com o número de deposições atribuído à alta sensibilidade da banda LSPR ao se diminuir a distância interpartícula com a impregnação no filme. Desvios para o vermelho e alargamento do pico já foram associados ao acoplamento de plasmons entre MNPs

adjacentes através de abordagens tanto teóricas quanto experimentais (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019). Isso explica o  $\lambda_{\max}$  de 410 nm deslocado para 429 nm após a quinta impregnação de AgNPs (Tabela 4). Outro fator a ser considerado que pode afetar o aspecto da banda plasmônica envolve as moléculas estabilizantes que provavelmente foram retiradas ao longo das lavagens/deposições, alterando o meio comparado as AgNPs em suspensão. Após 5 deposições a intensidade da banda plasmônica foi considerada suficiente para os testes de sensibilidade (SILVA *et al.*, 2014).

**Tabela 5:** Valores de  $\lambda_{\max}$  e FWHM das diferentes deposições de AgNPs.

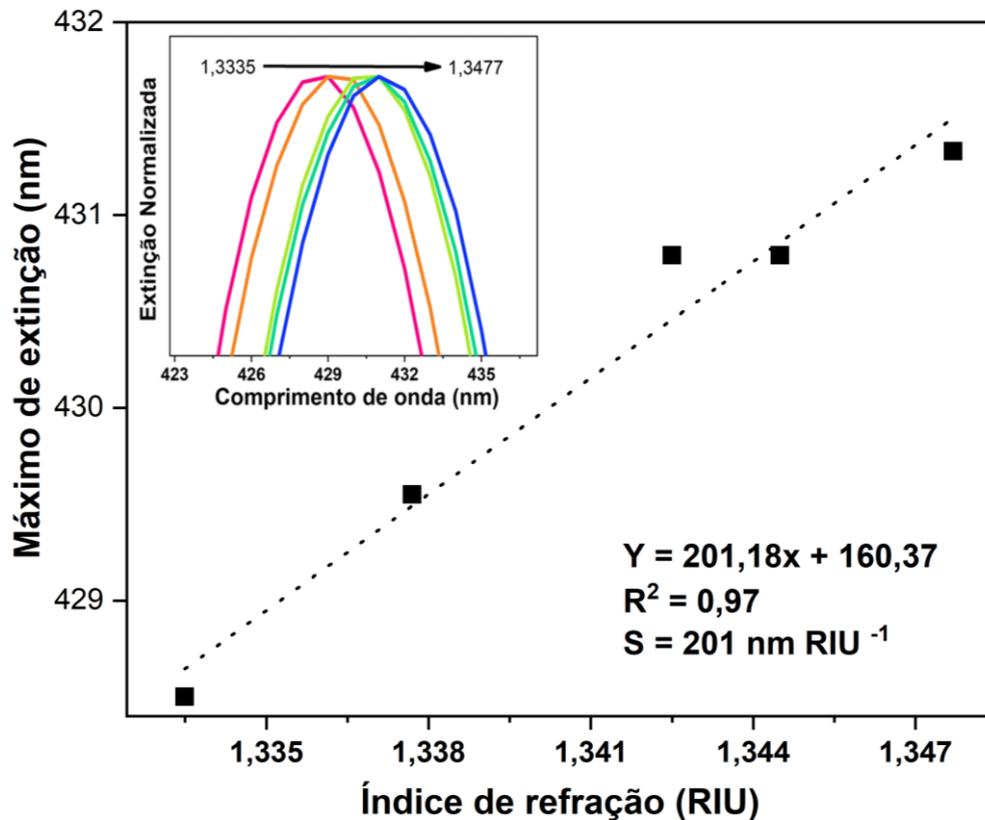
Nº de deposições de AgNPs	$\lambda_{\max}$ (nm)	FWHM (nm)
1	410	129
2	417	124
3	425	137
4	429	142
5	429	151

### 5.3.1 Análise da sensibilidade do sensor baseado em AgNPs

Uma forma de determinar a sensibilidade do slide impregnado com AgNPs é variando o índice de refração do meio (RI). Para isso, essa lâmina foi imersa em soluções com crescentes concentrações de glicose e analisada por UV-VIS. O *inset* da Figura 18 mostra o espectro normalizado de extinção do sensor em soluções de glicose com diferentes RI. A resposta desse slide está relacionada a sua sensibilidade a mudanças de RI no ambiente próximo às AgNPs (SANTOS *et al.*, 2016). Os  $\lambda_{\max}$  dos espectros foram plotados contra o RI de cada solução de glicose e foi possível observar o deslocamento de  $\lambda_{\max}$  para maiores comprimentos de onda com a mudança do RI (de 1,3335 para 1,3477). O coeficiente angular da reta mostrada na Figura 18 é 201 nm RIU<sup>-1</sup> sendo que esse valor representa a sensibilidade (S) do substrato. Esse valor de sensibilidade é considerado alto em comparação a outros trabalhos, onde foram encontrados valores de 80-140 nm RIU<sup>-1</sup>

(PAIGE HALL; N. NGATIA; P. VAN DUYN, 2011; SILVA *et al.*, 2014). A figura de mérito (FOM) (obtida da razão entre S e o FWHM da banda (151 nm)) foi determinada para esse sensor como  $FOM = 1,33 \text{ RIU}^{-1}$  e está de acordo com a literatura (MAYER *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014). Isso demonstra que o filme apresenta sensibilidade frente a variações do meio podendo ser explorado na montagem de dispositivos biossensores

**Figura 18:** Gráfico analítico do deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$  da banda LSPR gerada pelo slide impregnado com multicamadas de AgNPs em função do índice de refração. *Inset:* espectro de extinção normalizado do substrato de AgNPs em diferentes índices de refração.



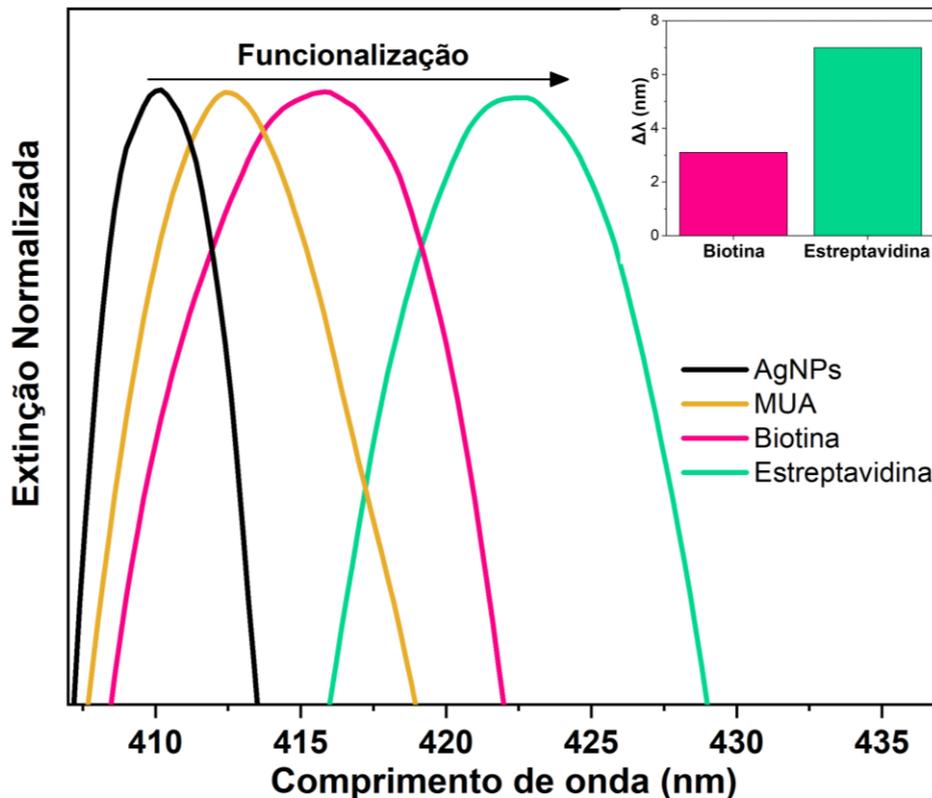
## 5.4 FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS AgNPs IMPREGNADAS

### 5.4.1 Aplicação como biossensor nanoplasmonico

No teste para aplicação como biossensor nanoplasmonico, utilizou-se filmes com uma deposição de AgNPs devido a simplicidade do método. A Figura 6 esquematiza o processo de funcionalização com MUA e ativação com EDC/NHS, que resulta em uma plataforma que pode servir de base para diferentes biossensores (KIM *et al.*, 2015; PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019). Dentre as

opções de biomoléculas, utilizou-se como prova de conceito a ligação entre biotina e estreptavidina, uma vez que sua forte interação bem específica já é conhecida na literatura (ANKER *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014).

**Figura 19:** Extinção normalizada do slide de AgNPs após a impregnação de MUA, ligação com a biotina e estreptavidina. *Inset.* variação do  $\lambda_{\max}$  depois da adsorção da biotina e estreptavidina a partir do  $\lambda_{\max}$  das AgNPs (410 nm)



O processo foi acompanhado por análises UV-VIS, onde desvios esperados do  $\lambda_{\max}$  para maiores comprimentos de onda foram observados devido ao aumento do RI próximo as AgNPs, resultante da adsorção dessas moléculas (Figura 19) (SILVA *et al.*, 2014). A variação total de  $\lambda_{\max}$  durante esse processo foi de 12,3 nm, sendo que o desvio maior ocorreu depois da ligação da estreptavidina (7,1 nm) por esta ser mais volumosa, ocasionando uma maior alteração na constante dielétrica próxima à superfície das AgNPs (*inset* Figura 19).

Desta forma, a plataforma nanoplasmonica construída com AgNPs sintetizadas via micro-ondas e com extrato de rabanete permitiu a detecção dessa proteína, podendo ser empregadas como dispositivos biossensores plasmônicos altamente sensíveis, portáteis e de baixo custo.

## 6 CONCLUSÃO

A metodologia proposta permitiu a obtenção de AgNPs estáveis a partir de uma metodologia verde, utilizando extratos aquosos de raízes e cascas de rabanete, além de rápida empregando irradiação micro-ondas. As caracterizações ópticas e morfológicas mostraram que  $0,5 \text{ g mL}^{-1}$  de extrato de raízes de rabanete,  $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  e pH 11,4 foram os parâmetros de síntese otimizados, levando à formação de AgNPs pequenas e com distribuição de tamanho controlado. A aplicação das AgNPs em plataforma plasmônica resultou em uma sensibilidade de  $201 \text{ nm RIU}^{-1}$  e  $\text{FOM} = 1,33 \text{ RIU}^{-1}$ , posteriormente permitindo a biodetecção da proteína estreptavidina. Portanto, o material obtido por metodologia verde pode ser empregado na biodetecção de biomoléculas como um biossensor LSPR com alta sensibilidade e baixo custo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, Soumyo; MUKHERJI, Suparna. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.
- ALI, M. *et al.* Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Artemisia absinthium* aqueous extract — A comprehensive study. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, p. 359–365, 2016.
- ALI, S. M.; YOUSEF, N. M. H.; NAFADY, N. A. Application of biosynthesized silver nanoparticles for the control of land snail *eobania vermiculata* and some plant pathogenic fungi. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, 2015.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.
- ANKER, J. N. *et al.* Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature Materials**, v. 7, n. 6, p. 442–453, 2008.
- ANOUAR, E. H. *et al.* UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 79–89, 2012.
- BAYDA, S. *et al.* The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 2020.
- BINDHU, M. R.; UMADEVI, M. Silver and gold nanoparticles for sensor and antibacterial applications. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, n. 128, p. 37–45, 2014.
- BOLDUC, O. R.; MASSON, J.-F. Advances in Surface Plasmon Resonance Sensing with Nanoparticles and Thin Films: Nanomaterials, Surface Chemistry, and Hybrid Plasmonic Techniques. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 21, p. 8057–8062, 2011.
- BUDARIN, V. L. *et al.* The potential of microwave technology for the recovery, synthesis and manufacturing of chemicals from bio-wastes. **Catalysis Today**, v. 239, p. 80–89, 2015.
- CHANDHIRASEKAR, K. *et al.* Plant-extract-assisted green synthesis and its larvicidal activities of silver nanoparticles using leaf extract of *Citrus medica*, *Tagetes lemmonii*, and *Tarenna asiatica*. **Materials Letters**, v. 287, 2021.
- CHAYAVANICH, K.; THIRAPHIBUNDET, P.; IMYIM, A. Biocompatible film sensors containing red radish extract for meat spoilage observation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 226, p. 117601, 2020.
- CHUNG, I.-M. *et al.* Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic Properties and Therapeutic Applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 40, 2016.
- FERREIRA, J. *et al.* Attomolar Protein Detection Using in-Hole Surface Plasmon Resonance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 436–437, 2008.
- GAVAMUKULYA, Y. *et al.* Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S355–S363, 2014.

- GHAFFARI-MOGHADDAM, M.; HADI-DABANLOU, R. Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Crataegus douglasii* fruit extract. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 739–744, 2014.
- GOYENECHE, R. *et al.* Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 256–264, 2015.
- HANLON, P. R.; BARNES, D. M. Phytochemical Composition and Biological Activity of 8 Varieties of Radish (*Raphanus sativus* L.) Sprouts and Mature Taproots. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. C185–C192, 2011.
- JL, H. *et al.* Localized surface plasmon resonance as a biosensing platform for developing countries. **Biosensors**, v. 4, n. 2, p. 172–188, 2014.
- JOUYBAN, A.; RAHIMPOUR, E. Optical sensors based on silver nanoparticles for determination of pharmaceuticals: An overview of advances in the last decade. **Talanta**, v. 217, p. 121071, 2020.
- KHALIL, M. M. H. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 1131–1139, 2014.
- KHARISSOVA, O. V. *et al.* Greener synthesis of chemical compounds and materials. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 11, p. 191378, 2019.
- KIM, H. H. *et al.* Highly sensitive microcantilever biosensors with enhanced sensitivity for detection of human papilloma virus infection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 221, p. 1372–1383, 2015.
- KUMAR, A. *et al.* Microwave chemistry, recent advancements, and eco-friendly microwave-assisted synthesis of nanoarchitectures and their applications: a review. **Materials Today Nano**, v. 11, p. 100076, 2020.
- LANCE KELLY, K. *et al.* The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 2002.
- LIU, R. *et al.* Enhancing hydrogen evolution of water splitting under solar spectra using Au/TiO<sub>2</sub> heterojunction photocatalysts. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 56, p. 28462–28473, 2021.
- LIU, X.-Y. *et al.* Gold nanoparticles: synthesis, physiochemical properties and therapeutic applications in cancer. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 5, p. 1284–1292, 2021.
- LIU, D. *et al.* Synthesis of ZnO nanoparticles using radish root extract for effective wound dressing agents for diabetic foot ulcers in nursing care. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101364, 2020.
- MARTÍNEZ-BERNETT, D. *et al.* Chromatographic analysis of phytochemicals components present in mangifera indica leaves for the synthesis of silver nanoparticles by AgNO<sub>3</sub> reduction. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 687, n. 1, p. 012033, 2016.
- MAYER, K. M. *et al.* A Label-Free Immunoassay Based Upon Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanorods. **ACS Nano**, v. 2, n. 4, p. 687–692, 2008.

- MEDDA, S. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles from Aloe vera leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 5, n. 7, p. 875–880, 2015.
- NATSUKI, J.; NATSUKI, T.; HASHIMOTO, Y. A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. **International Journal of Materials Science and Applications**, v. 4, n. 5, p. 325, 2015.
- OSUNTOKUN, J.; ONWUDIWE, D. C.; EBENSO, E. E. Green synthesis of ZnO nanoparticles using aqueous *Brassica oleracea* L. var. *italica* and the photocatalytic activity. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 12, n. 4, p. 444–457, 2019.
- PAIGE HALL, W.; N. NGATIA, S.; P. VAN DUYNE, R. LSPR Biosensor Signal Enhancement Using Nanoparticle–Antibody Conjugates. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 5, p. 1410–1414, 2011.
- PEIXOTO, L. P. F. **Síntese e caracterização de nanobastões e nanopirâmides de Au para aplicação em biossensores plasmônicos**. 85 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.
- PEIXOTO, L. P. F.; SANTOS, J. F. L.; ANDRADE, G. F. S. Plasmonic nanobiosensor based on Au nanorods with improved sensitivity: A comparative study for two different configurations. **Analytica Chimica Acta**, v. 1084, p. 71–77, 2019.
- PERETYAZHKO, T. S.; ZHANG, Q.; COLVIN, V. L. Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 20, p. 11954–11961, 2014.
- PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, 2011.
- PRYSHCHEPA, O.; POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 102246, 2020.
- RAJESHKUMAR, S.; BHARATH, L. V. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 219–227, 2017.
- RIAZ, M. *et al.* Exceptional antibacterial and cytotoxic potency of monodisperse greener AgNPs prepared under optimized pH and temperature. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.
- SANTOS, J. *et al.* Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1098–1111, 2016.
- SCHEFFER, F. R. **Síntese verde de fotocatalisadores nano-estruturados com aplicação em fotogeração de hidrogênio, degradação de poluentes orgânicos e atividade bactericida**. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- SILVA, A. L. C. M. *et al.* SPR biosensors based on gold and silver nanoparticle multilayer films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 928–934, 2014.
- SINTRA, R. A importância da nanotecnologia para a saúde. **IFSC – USP**. São Carlos. 29 jan. 2019. Disponível em: <https://www2.ifsc.usp.br/portal-ifsc/a-importancia-da-nanotecnologia-para-a-saude/>. Acesso em: 30 Out. 2021.

SLAVIN, Y. N. *et al.* Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 65, 2017.

SOARES, A. C. *et al.* A simple architecture with self-assembled monolayers to build immunosensors for detecting the pancreatic cancer biomarker CA19-9. **Analyst**, v. 143, n. 14, p. 3302–3308, 2018.

SRINIVAS, S. *et al.* A Novel Green Chemical Route for Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Camellia Sinensis*. **Acta Chimica Slovenica**, v. 57, p. 808–812, 2010.

STRAPASSON, G. B. *et al.* Microwave assisted synthesis of silver nanoparticles and its application in sustainable photocatalytic hydrogen evolution. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 69, p. 34264–34275, 2021.

STRAPASSON, G. B. *et al.* Visible light sensitization of TiO<sub>2</sub>/Ag/N nanostructures synthesized by microwave irradiation for oxidative degradation of organic dyes. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 543, 2020.

UDDIN, I. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria recutita* (Babunah) plant extract and its study as mercury ions sensor. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 16, p. 62–67, 2017.

VÍCTOR H. PÉREZ-LUNA, † *et al.* Molecular Recognition between Genetically Engineered Streptavidin and Surface-Bound Biotin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 27, p. 6469–6478, 1999.

WEIBEL, D. E. **Polymer Assisted Surface Modification by Photons**. 1 ed. Nova York: Nova Science Publishers, v. 1, 119 p, 2011

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

ZAMANI, H.; MORADSHAHI, A. Synthesis and coating of nanosilver by vanillic acid and its effects on *Dunaliella salina* Teod. **Molecular Biology Research Communications**, v. 2, n. 3, p. 47–55, 2013.

ZEIRI, O. Metallic-Nanoparticle-Based Sensing: Utilization of Mixed-Ligand Monolayers. **ACS Sensors**, v. 5, n. 12, p. 3806–3820, 2020.

ZUVERZA-MENA, N. *et al.* Effects of Silver Nanoparticles on Radish Sprouts: Root Growth Reduction and Modifications in the Nutritional Value. **Frontiers in Plant Science**, v. 0, n. FEB2016, p. 90, 2016.

## APÊNDICE A: SÍNTESE DE AgNPs COM CASCA DO RABANETE

A partir da casca do rabanete, foi feita uma síntese seguindo a mesma metodologia apresentada anteriormente. Na Figura 20 pode-se ver que o extrato da casca puro não tem absorção na região próxima a 400 nm. Após a síntese utilizando  $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ ,  $0,5 \text{ g mL}^{-1}$  desse extrato e 30 segundos no micro-ondas, há uma mudança de coloração (*inset* Figura 20) e um pico em 433 nm apareceu, característicos da presença de AgNPs. Isso mostra que restos de alimentos como a casca podem ser reutilizados com essa metodologia para a formação de AgNPs

**Figura 20:** Espectro UV-VIS das AgNPs sintetizadas com cascas de rabanete em uma concentração de  $0,5 \text{ g mL}^{-1}$  e  $[\text{AgNO}_3] = 4,5 \text{ mmol/L}$ . *Inset:* imagem do extrato da casca de rabanete (esquerda) e da dispersão de AgNPs (direita)

