**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SAO CARLOS**

MANOEL MESSIAS PEREIRA DE MIRANDA

**Atividade óptica de DNA na
presença de plasmons polaritons de
superfície**

São Carlos
2017

MANOEL MESSIAS PEREIRA DE MIRANDA

Atividade óptica de DNA na presença de plasmons polaritons de superfície

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Euclydes Marega Junior

Versão Corrigida
(versão original disponível na unidade que agrega o programa)

São Carlos
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Miranda, Manoel Messias Pereira de
Atividade óptica de DNA na presença de plasmons
polaritons de superfície / Manoel Messias Pereira de
Miranda; orientador Euclides Marega Junior - versão
corrigida -- São Carlos, 2017.
99 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Luminescência. 2. Plasmons-polarito. 3.
Biossensores. I. Marega Junior, Euclides, orient. II.
Título.

RESUMO

MIRANDA, M. M. P. **Atividade óptica de DNA na presença de plasmons polaritons de superfície.** 2017. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A caracterização das propriedades ópticas de moléculas de DNA, tais como a absorção e a fluorescência por excitação, são importantes para a determinação de parâmetros usados no desenvolvimento de biossensores fotônicos. O estudo da absorção óptica do DNA, obtido por diferentes métodos tem se mostrado muito eficiente na determinação do grau de pureza do material genético obtido por amplificação, ou extração e purificação do DNA total. Por outro lado, a fluorescência por excitação a partir de um marcador cromóforo é uma técnica importante em processos de quantificação de massa, em técnicas tais como a eletroforese em gel de agarose. Devido à baixa fluorescência de moléculas de DNA na região visível do espectro, entre 500-600nm, utiliza-se destes marcadores que se ligam à molécula e que são opticamente ativos nesta região para detecção de sua emissão de fluorescência. Neste trabalho foi realizado um estudo da fluorescência do DNA, obtido a partir de uma amplificação por transcriptase reversa do RNA (RT-PCR), na região de 400nm a 600nm, sem adição de marcador e utilizando excitação por um e dois fótons (405nm e 800nm) através da técnica de microscopia confocal. As amostras contendo solução de dsDNA (237ng/ μ L) foram depositadas sobre um filme de prata de 200nm de espessura que também é crescido previamente sobre um substrato de vidro. Sobre o filme metálico é fabricado nanoestruturas metálicas por de litografia por feixe de íons com um microscópio de duplo feixe FEI Quanta 3D 200i. As nanoestruturas são formadas por arranjos concêntricos de anéis com diâmetros de até 20 μ m, largura 50nm e separados por 400nm. Quando a excitação do material genético ocorre sobre a nanoestrututa o laser gera na nanoestrutura plasmon-polaritons de superfície (SPP) que interagem com as moléculas de dsDNA na solução. Observa-se que nas regiões onde as nanoestruturas são fabricadas que a intensidade de fluorescência da macromolécula é muito maior do que a obtida fora da estrutura e sobre o filme metálico. Os efeitos da interação entre SPPs e as moléculas aumentam a atividade óptica (taxa de emissão) e podem servir como base para a fabricação de sensores fotônicos ultrasensíveis. Concluindo, os efeitos dos campos plasmônicos sobre o fluoróforo são significativos e foram observados pela diminuição do tempo de vida das moléculas e o aumento da sua fluorescência.

Palavras-chave: *Luminescência. Plasmons-polaritons. Biossensores.*

ABSTRACT

MIRANDA, M. M. P. **Optical DNA activities in the presence of surface polariton plasmids**. 2017. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

The characterization of the optical properties of DNA molecules, such as absorption and excitation fluorescence, is important to the determination of the parameters used for the preparation of photonic biosensors. The study of optical absorption of DNA, obtained through different methods, currently has a high sensitivity to determine the degree of purity of the genetic material obtained by amplification, extraction and purification of the total DNA. On the other hand, excitation fluorescence using a marker is an important technique in mass quantification processes together with techniques such as agarose gel electrophoresis. Because of low fluorescence of DNA molecules, in the visible region of the spectrum, between 500-600nm, the use of labels that bind to the molecule are critically for the detection of their fluorescence emission. In this work we studied the DNA fluorescence, obtained from a RNA reverse transcriptase (RT-PCR) amplification, in the region from 400nm to 600nm, without the addition of a marker as a fluorophore and using confocal microscopy with one and two photons (405nm and 800nm). The solutions of dsDNA (237ng/ μ L) were dropped on a silver film with 200nm thickness deposited on a glass substrate. In the silver film nanostructures were fabricated ion beam lithography with FEI Quanta 3D 200i dual beam microscope. The nanostructures are formed by concentric arrangements of rings with diameters up to 20 μ m, width 50nm and separated by 400nm. When the excitation of the genetic material occurs on a nanostructure an excited surface plasmon-polaritons (SPP) is responsible for the DNA excitation. It is observed in these regions an increase of the fluorescence intensity many times higher than one obtained out of the nanostructure on the silver film. The effects of the interaction between SPPs and molecules increase the optical activity of the molecule (emission rate) and can serve as the basis of photonic sensors. Concluding, the effects of the plasmon fields on the fluorophore are significant and were observed by decreasing the life time of the molecules and the increasing of their fluorescence.

Keywords: *Luminescence. Surface Plasmons-Polaritons. Biosensors.*

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1	(a) Estrutura de um nucleotídeo: um grupo fosfato, uma ribose e uma base nitrogenada. (b) estrutura da purina (c) estrutura da pirimidina	23
Figura - 2	(a) Estrutura dos nucleotídeo: A=Adenina, G=Guanina, C=Citosina, T=Timina. (b) Absorção de cada base individualmente. Modelos moleculares de oligonucleótidos com dez pares de bases (c) (AT) 10, (b) (AT) 5 (GC) 5 e (c) (AT-GC) 5 e dados como modelos esquemáticos em 3D. (d) Absorção das estruturas (AT) 10, (b) (AT) 5 (GC) 5 e (c) (AT-GC) 5	23
Figura - 3	Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando os processos envolvidos durante uma excitação e emissão de fluorescência	24
Figura - 4	(a) Absorção normalizada de soluções com DNA sem marcação. (b) Fluorescência das soluções com excitação em 267 nm. Espectros de DNA em água pura (linha contínua) e em tampão fosfato (tracejado)	25
Figura - 5	Esquema de Jablonski representativo dos tempos característicos dos processos numa macromolécula	28
Figura - 6	Esquema de Jablonski representativo da transição a par numa macromolécula	29
Figura - 7	Diagrama de Jablonski para absorção em um e dois fótons representando a absorção de energia e emissão de fluoróforo, e com dois fótons simultâneos de baixa energia podem combinar e ter o mesmo efeito que um em um fóton de energia superior. Em (a) excitação por absorção de um fóton para o diagrama esquemático dos níveis de uma biomolécula e mecanismo de decaimento radioativo e não radioativo (cruzamento intersistema). Em (b) excitação por absorção de dois fótons seguindo o mesmo mecanismo descrito em (a)	31
Figura - 8	Acoplamento de ondas SPPs por prisma usando reflexão interna total nas configurações Kretschmann (esquerda) e Otto (direita)	38
Figura - 9	Relação de dispersão para o plásmen de bulk (BPP), para o plásmen de superfície (SPP) e num dielétrico	39
Figura - 10	(a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um filme metálico de prata de 200nm de espessura depositado sobre vidro. As ranhuras de 20µm de comprimento, espessura de 50nm e espessamento de 400nm foram fabricadas pela técnica de litografia por feixe de íons. (b) Simulação numérica da região indicada em a) usando o software LUMERICAL	40
Figura - 11	Representação dos mecanismos de interação de um fluoróforo - diagrama Jablonski modificado	42
Figura - 12	Emissão de plasmon controlada por fluorescência	45
Figura - 13	Plântulas de abobrinha de moita sadias germinadas em viveiro para controle das cepas virais	48
Figura - 14	Plântulas de abobrinha de moita em fase germinativa uma semana após a contaminação com as cepas	49
Figura - 15	Folhas doentes colhidas 21 dias após contaminação com o vírus	49
Figura - 16	Cotilédones das plântulas com visíveis sinais da infecção pelo vírus ZYMV	50
Figura - 17	Cotilédones das plântulas infectadas pelo vírus ZYMV trituradas com tampão de fosfato	50

para posterior extração do RNA com fenol saturado

Figura - 18	Imagem obtida da Eletroforese em gel de agarose. As bandas indicadas na parte superior são derivadas	52
Figura - 19	Cópia da tela do NANODROP® para a solução D-1 que representa basicamente a absorção da solução	54
Figura - 20	curvas de absorbância da amostra 3 para várias diluições (D-1 a D4). (b) apresenta o detalhe da absorbância da diluição de 50 ng/mL (D-1) em escala logaritmica, com uma longa extensão que ultrapassa 500nm	55
Figura - 21	Curvas de fluorescência com excitação em 260nm para as diluições da amostra 3. (b) Detalhes da fluorescência entre 400 e 500nm	56
Figura - 22	Microscópio confocal Zeiss LSM 800 utilizado no estudo, Instituto de Física de São Carlos	57
Figura - 23	Imagens espectrais obtidas na mesma região limítrofe (borda) de uma gota com 1 µL da solução D-1(A-5) com concentração de 237 ng/µL para diferentes comprimentos de onda depositada sobre um filme de prata de 200nm de espessura. (a) excitação com um fóton - laser de 405 nm (b) excitação com dois fótons – laser em 760 nm (c) excitação com dois fótons - laser em 800 nm (d) excitação com dois fótons - laser em 850nm	58
Figura - 24	Decomposição espectral das regiões indicadas na figura 23 pelo círculo branco	59
Figura - 25	Imagens espectrais obtidas na mesma região limítrofe (borda) de uma gota com 1 µL da solução A3 com concentração com concentração de 1478 ng/µL para diferentes comprimentos de onda de excitação depositada sobre um filme de prata de 200nm de espessura. (a) um fóton - laser de 405 nm (b) com dois fótons laser em 800 nm	60
Figura - 26	Decomposição espectral das regiões indicadas na figura 25 pelo círculo branco	61
Figura - 27	Imagens espectrais obtidas na mesma região limítrofe (borda) de uma gota com 1 µL da solução A3 com concentração com concentração de 1478 ng/µL para diferentes comprimentos de onda de excitação depositada sobre um filme de prata de 200nm de espessura. (a) um fóton - laser de 405 nm (b) com dois fótons laser em 800 nm	62
Figura - 28	Imagens de MEV da nanoestrutura plasmônica (a) e (b). As imagens mostradas em (c) e (d) são imagens de campo escuro da nanoestrutura plasmônica (transmissão óptica extraordinária) com: (c) polarização horizontal, em (d) polarização vertical	66
Figura - 29	Espectro da transmissão óptica extraordinária obtido através do programa Lumerical para a estrutura da utilizada no estudo	65
Figura - 30	Imagens espectrais da nanoestrutura plasmônica com diferentes comprimentos de onda de excitação para a interface Prata/Ar (a) excitação com um fóton em 405nm, (b) excitação com dois fótons em 760nm, (c) excitação com dois fótons em 800nm e (d) excitação com dois fótons de 850nm	67
Figura - 31	Decomposição espectral das imagens na região das nanoestruturas plasmônicas da figura 30	68
Figura - 32	Imagens espectrais da nanoestrutura plasmônica com diferentes comprimentos de onda de excitação para a interface Prata/H ₂ O+solução (solução utilizada foi a de concentração D-1(A-5) com 237 ng/µL (a) excitação com um fóton em 405nm, (b) excitação com dois fótons em 760nm, (c) excitação com dois fótons em 800nm e (d) excitação com dois fótons de 850nm	70
Figura - 33	Decomposição espectral das imagens na região das nanoestruturas plasmônicas da figura 30	71

Figura - 34	Imagem espectral da amostra 2 diluição de 237ng/ μ L, usando laser de 800nm, em (a) interface prata com ar, em (b) interface prata com água, em (c) interface prata com amostra de dsDNA, D-1 de 237ng/ μ L)	72
Figura - 35	Imagem espectral da amostra 2 diluição de 237ng/ μ L, usando laser de 800nm, em (a) interface prata com ar, em (b) interface prata com água, em (c) interface prata com amostra de dsDNA, D-1 de 237ng/ μ L)	73
Figura - 36	Espectro da solução D-1 (237 ng/ μ L), usando excitação com dois fótons - laser em 800nm, obtido da imagem espectral indicada no canto do espectro. As regiões em azul (450nm - canal 1) e verde (550nm canal 2) indicam as regiões utilizadas para a coleta da imagem de tempo de vida	74
Figura - 37	Imagens de tempo de vida médio da mesma região indicada na imagem espectral da figura 36. (a) Imagem de tempo de vida médio (FLIM) para o canal 1. (b) Imagem de tempo de vida médio (FLIM) para o canal 2. (c) Distribuição de tempos de vida médio das imagens (a) e (b)	75
Figura - 38	Imagem de tempo de vida (FLIM) da estrutura plasmônica . (a) e (b) para a interface Prata/ar; (c) e (d) para a interface Prata com H ₂ O; e (e) e (f) para a interface Prata/H ₂ O+dsDNA	77
Figura - 39	Distribuição de tempo de vida médio para as imagens da figura 38. (a) canal 1 as três interfaces, (b) canal 2 para as três interfaces	78

LISTA DE ABREVIACÕES

CP- Capsidial Protein (Proteína Capsidial)
Confocal Laser Scanning Microscopy CLSM (Microscópio Confocal a Laser)
dsDNA-double stranded DNA (Ácido Desoxirribonucleico dupla fita)
FCS-Fluorescence Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de Correlação de Fluorescência)
FLIM-Fluorescence Lifetime Imaging (Imagem de Fluorescência de Tempo de Vida)
FM-Fluorescence Microscopy (Microscópio de Fluorescência)
FRET-Fluorescence Resonant Energy Transfer (Energia de Transferência de Fluorescência Ressonante)
FIB-Focused Ions Beam (Feixe de Íons)
LSPR-Localized Surface Plasmon Resonance (Ressonância de Superfície Plasmônica Localizada)
MEF-Metal Enhancement Fluorescence (Aumento da Fluorescência devido a um metal)
NCBI-International Nucleotide Sequence Database Collaboration (Colaboração de Banco de Dados Internacional de Sequências de Nucleotídeos)
NIB-Nuclear Inclusion Region (Região de Inclusão Nuclear)
OLED-Organic Light Emitting Diodes (Diodos Orgânicos Emissores de Luz)
OSL-Optically Stimulated Luminescence (Luminescência Opticamente Estimulada)
PCR-Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCF-Plasmon Controlled Fluorescence (Plasmons Controlados por Fluorescência)
PSPR-Propagated Surface Plasmon Resonance (Ressonância de Superfície Propagada)
RDE-Radiative Decay Engineering (Engenharia de Decaimento Radiativo)
RECSP-Resonance Excitation of Coupled Surface Plasmon (Ressonância de Excitação de Superfície de Plasmons Acoplados)
RLAP-Recovering Luminescence After Photodegradation (Recuperação da Luminescência após a Fotodegradação)
RNA-Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleotídico)
RP-Radiation Plasmon (Plasmon Radiante)
SEM-Scanning Electron Microscope (Microscópio Eletrônico de Espalhamento)
SHG e THG-Second and Third Harmonic Generation (Segunda e Terceira Geração de Harmônicos)
SPCE-Emission of Plasmon Coupled Surface (Emissão de Plasmon Acoplado em Superfície)
SEF-Surface Enhancement Fluorescence (Aumento da Luminescência devido ao Plasmon-polariton)
SP-Surface Plasmon (Plasmons de Superfície)
SI-Impedance Spectroscopy (Espectroscopia de Fluorescência)
SPP-Surface Plasmons Polaritons (Plasmons Polártons de Superfície)
SPR-Surface Plasmon Resonance (Ressonância de Superfície Plasmônica)
SPFS-Surface Plasmon Surface Fluorescence (Fluorescência de Superfície de Plasmon)
ssDNA-single stranded DNA (Ácido Desoxirribonucleico fita simples)
UV-Ultra Violet (Ultra Violeta)
ZYMV-Zucchini Yellow Mosaic Vírus (Vírus do Mosaico Amarelo da Abobrinha)

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	permissividade magnética
$\text{\AA}$	Angstrom
k	número de onda
λ	comprimento de onda
$\text{\textcircled{R}}$	sinal registrado
Δ	delta ou variação
$<$	menor que
$>$	maior que
a	área
$\ll$	muito menor que
$\gg$	muito maior que
λ_0	comprimento de onda
λ_i	comprimento de onda inicial
ϵ_m	permissividade elétrica no metal
ϵ_{mr}	permissividade elétrica no metal parte real
$++$	sinal de mais em soma ou positivo
i	imaginário numero complexos
r	reais numero complexos
ϵ_{mi}	permissividade elétrica do metal parte imaginária
ϵ_d	permissividade elétrica do dielétrico
c	velocidade da luz constante
Γ	coeficiente de reflexão
Γ_{outros}	coeficiente de reflexão não radiativos
Γ_{EM}	coeficiente de reflexão radiativos
I_0	Intensidade de fluorescência
τ	tempo de vida
τ_{EM}	tempo de vida eletromagnético
$\pi\text{-}\pi^*$	ligante e ante ligante
Q^0	Rendimento quântico
γ_{abs}	taxa de decaimento dissipado pelo calor
γ_{exc}	taxa de excitação
γ_{em}	taxa de emissão
γ_r	taxa de decaimento radiativo
γ_{nr}	taxa de decaimento não radiativo
λ_m	acoplamento a modos não radiativos
$\sqrt{\quad}$	raiz quadrada
$1/2$	raiz quadrada
ω	frequência
ω_p	frequência de plasma
ω_0	frequência de luz incidente
k_0	constante de propagação no vácuo
k_x	vetor de propagação em x
k_{sp}	vetor de onda de plasmons de superfície
k_{ev}	vetor da onda evanescente
$\Delta k_{sp}^{(0)}$	variação do vetor de onda em função do acoplamento
$k_{sp}^{(0)}$	vetor de onda incidente
$k_{sp}^{(1)}$	vetor de onda com acoplamento prisma
n_s	índice de refração do meio sólido
p	polarização/polarizado

=	igualdade
β	constante de propagação na interfase
β_0	constante de propagação inicial
π	pi = 3,1416
μ	micro (10^{-6} metros)
nm	nanômetros
mm	milímetros
mL	mililitros
μm	micrômetros
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
Λ	lambda
γ_{abs}	taxa de absorção
λ_{ab}	comprimento de onda de absorção
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
$\sin\theta$	seno do ângulo teta
μ	permissividade
λ	comprimento de onda
ps	picossegundos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 PROPRIEDADES ELETRÔNICAS DA MOLÉCULA DE DNA	21
2.1 Fluorescência da molécula de DNA	24
2.2 Tempo de vida de fluorescência	27
2.3 Excitações com um ou múltiplos fótons.....	30
3 PLASMONS POLARITONS DE SUPERFÍCIE	33
3.1 Acoplamento entre o campo eletromagnético e elétrons livres num metal	34
3.2 Geração de plasmons-polaritons de superfície em nanoestruturas metálicas.....	39
4 INTERAÇÃO DE PLASMON POLARITONS DE SUPERFÍCIE COM AGLOMERADOS DE MOLÉCULAS DE dsDNA.....	41
4.1 Transferência de energia por ressonância de fluorescência.....	41
4.2 Plasmons controlados por fluorescência.....	43
5 METODOLOGIAS APLICADAS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	47
5.1 Extração do RNA e amplificação do DNA por técnica de RT-PCR	47
5.2 Caracterização óptica das amostras de dsDNA: Absorção e Fluorescência.....	53
5.3 Microscopia óptica Confocal de Fluorescência.....	57
6 INTERAÇÃO DE PLASMON-POLARITONS COM MOLÉCULAS DE dsDNA	63
6.1 Nanoestruturas plasmônicas	63
6.2 Comportamento espectral da fluorescência na região da estrutura plasmônica	66
6.3 Decaimento temporal da fluorescência do dsDNA na presença de plasmons-polaritons ..	73
7 CONCLUSÕES	79
8 TRABALHOS FUTUROS	81
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a ciência de diagnósticos clínicos, em nível molecular, tem assumido grande importância no âmbito de pesquisas aplicadas em biotecnologia devido à crescente demanda por diagnóstico de patologias relacionadas às informações genéticas que podem ser elucidadas, por exemplo, por biossensores. (1-7)

A detecção de sequência das bases de ácidos nucleicos em células animais e vegetais, fungos, em bactérias e vírus é de relevante importância para o diagnóstico clínico de doenças em geral. (3-5,8-16) Com várias aplicações biotecnológicas na medicina humana e animal, agricultura e indústria de fármacos (12,17-19). As análises genéticas dos segmentos específicos de DNA, culminadas a estudos de regulação e expressão genética, se tornaram de fundamental relevância para o desenvolvimento de diagnóstico, no tratamento das patologias genéticas relacionadas e também na descoberta de novos fármacos e entrega *in situ* de fármacos específicos. (2,6,10,19-22)

A detecção de DNA é base de numerosas tecnologias que abrangem desde a triagem diagnóstica em medicina clínica até os testes forenses. Todavia a grande maioria dos métodos atuais de detecção de DNA faz uso de marcadores fluorescentes como parte da transdução do sinal. Isso torna tais técnicas até certo ponto limitadas, uma vez que o dsDNA (DNA de fita dupla) é uma molécula estável, porém sujeita a modificações associadas ao seu manuseio, tanto no seu ambiente natural, quanto em situações *in vitro*. Devido ao pequeno conteúdo de dsDNA detectável em células e à sua complexidade estrutural, sua análise via instrumental requer várias perturbações no microambiente *in situ*, atribuídas a sua manipulação, tais como a desnaturação ou a fragmentação (devido a atuação de endonucleases de restrição), também quanto a separação por técnicas de eletroforese, ou ainda pela amplificação (*Reação em Cadeia da Polimerase PCR*). (14-25) Além dos altos custos, atribuídos aos gastos com reagentes específicos, utilizados durante estes processos, as amostras ainda estão sujeitas a alterações e perdas de informação epigenética, ou adulterações sofridas durante a manipulação, inclusive ao agregar-se a resíduos dos processos mencionados, interferindo na pureza da concentração da sequência de dsDNA final. (7,23-29)

O aperfeiçoamento de técnicas de nanofotônicas são oportunidades únicas para o desenvolvimento de ações diretas, rápidas e também métodos ultra-sensitivos para análise de dsDNA, visando a investigação de amostras de oligonucleotídeos descomprometidos com quaisquer interferências residuais, ou ainda sem a perspectiva da intervenção de marcadores que ocasionalmente podem afetar as propriedades naturais da amostra. Dependendo do

objetivo do estudo e das análises às quais se deseja submeter o dsDNA. A detecção de dsDNA como ciência inovadora, nesses termos, surge promissora no campo de plasmônica, a partir de técnicas de ressonância de superfície plasmônica, de fluorescência confocal melhorada e espalhamento Raman. (7-21)

Recentemente os biossensores ópticos estão sendo amplamente aplicados em diversas áreas para análises patogênicas, bem como para segurança alimentar, monitoramento ambiental e diagnóstico clínico. Assim se destacam técnicas de espectroscopia e eletroquímica; elipsometria e ressonância plasmônica de superfície, visando a melhora da seletividade e sensibilidade dos biossensores ópticos explorando novos modos de transdução, por meio da espectroscopia de fotoluminescência. (1,29-37) Dessa forma atualmente os sensores ópticos baseados na transmissão extraordinária da luz com princípios baseados em tecnologias fotônicas são amplamente utilizados para detectar interação dos ácidos nucleicos e também sequenciamento e hibridização de oligonucleotídeos, além da possível identificação de vírus. (1,3-7,15,35,38-39)

O fundamento clássico da plasmônica é a associação de ondas que evanescem na superfície metálica com os elétrons do metal, gerando um acoplamento entre elétrons e fótons denominado de plasmon-polariton de superfície (*Surface Plasmon-Polariton SPP*). Uma onda evanescente é uma onda eletromagnética gerada quando há reflexão interna total atenuada dentro de uma superfície, que pode ser um metal (Au, Cu, Ag), (12,44,49-52) ou um polímero condutor. Resumidamente, SPPs são campos eletromagnéticos confinados em regiões menores que o comprimento de onda da luz e sua geração ocorre por meio da excitação coletiva de elétrons que se acoplam com a onda eletromagnética incidente nesta superfície metálica, na interface entre dois meios, do metal e o dielétrico. (12,34,40-50).

A aplicação de SPP's como elemento de transdução em biossensores para detecção de DNA é usualmente realizada em conjunto com a imobilização do ácido nucleico sobre a superfície do metal por adsorção com a deposição livre direta na superfície, ou por um acoplamento indireto formando monocamadas auto-organizadas, através de uma matriz de carboxi-metil-dextrana, composto contendo grupo tiol, ou por uma ponte avidina ligada à biotina, formando uma camada hidrofílica que aumenta a sensibilidade da SPR. (51)

Dessa forma a alta sensibilidade dos plásmons de superfície às mudanças no meio dielétrico em campo próximo da superfície das nanoestruturas metálicas tem sido amplamente estudada e utilizada na elaboração de sensores ópticos e biossensores, inclusive para

aplicações em estudos de quantificação em massa de DNA. Explorando sua detecção quantitativa e qualitativa em vários aspectos relevantes nas ciências biomoleculares. (24,29,42,51-73) A interação da radiação com o material biológico permite quantificar parâmetros ópticos como índice de refração, polarização e fluorescência, que são elementos que constituem a base dos sensores ópticos convencionais. (25,61,69,71,73-75) Propriedades de plasmons podem ser ainda utilizadas para melhorar técnicas já conhecidas no estudo quantitativo e qualitativo do DNA, ainda não exploradas, como por exemplo, protocolos da emissão desses oligonucleotídeos que sabidamente tem excitação na região do ultravioleta. Padronizando dessa forma, em medidas espectrofotométricas sua assinatura de emissão de fluorescência, em presença de campos plasmônicos, medidas em concentrações diluídas e concentradas, obtidas de produtos de amplificação, ou até mesmo de extração direta, culminando em um estudo sistemático que possa viabilizar a exploração de dsDNA, diretamente por técnicas espectrofotométricas como microscopia confocal. (76-90)

O objetivo deste trabalho foi o de estudar o acoplamento direto entre SPP's produzidos a partir de uma nanoestrutura fabricada sobre um filme de prata e macromoléculas de dsDNA através da fluorescência direta, sem que haja nenhuma marcação desta molécula ou mesmo funcionalização da superfície. Utilizando a técnica de microscopia confocal de fluorescência com um e dois fótons foi possível estudar o incremento na emissão do dsDNA (em solução aquosa). Com o objetivo de avaliação e otimização da seletividade e precisão para a análise de amostras de dsDNA em meio líquido, um produto de dsDNA amplificado e posteriormente diluído em água ultra-pura, livre da adição de elementos que possam comprometer a detecção como corantes marcadores, foi preparado como resultado das reações de amplificação de um segmento de DNA do vírus do mosaico amarelo da abobrinha. A amplificação da intensidade de fluorescência, resultante do acoplamento com os SPP's foi também verificada pela diminuição do tempo radiativo das moléculas na região da nanoestrutura.

O trabalho está dividido em sete capítulos. No capítulo 2 é feito um breve apanhado das propriedades ópticas da molécula de DNA. Nos capítulos 3 e 4 tratamos da geração de plasmons-polaritons de superfície e como ocorre a sua interação com macromoléculas. No capítulo 5 apresentamos as metodologias de preparação da solução de dsDNA através da amplificação do material genético, permitindo obter o mesmo com uma pureza de mais de 85%, as técnicas de caracterização óptica da solução aquosa de dsDNA e a técnica de caracterização por microscopia confocal de fluorescência com um e dois fótons. No capítulo 6 utilizamos a técnica de microscopia confocal de fluorescência para determinar o incremento

da fluorescência na região da nanoestrutura e também um estudo do tempo de vida que nos permitiu corroborar os resultados de incremento de intensidade.

2 PROPRIEDADES ELETRÔNICAS DA MOLÉCULA DE DNA

Desde a publicação do desenho estrutural em dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA) em 1953 por *Watson e Crick* esta biomolécula tem sido o centro de pesquisas científicas na área de biotecnologia, resultando numa nova ciência inteiramente interdisciplinar, culminando em diversas aplicações tanto em química, física e biologia. Com aplicações cada vez mais avançadas na área bioquímica de estruturas moleculares o DNA recentemente tem chamado a atenção dos físicos como uma nova alternativa de material orgânico, em associação com dispositivos fotônicos, para aplicações optoeletrônicas em nanossensores. (17-18, 91-100)

A unidade básica do DNA é o nucleotídeo. Eles são formados por uma base nitrogenada, uma pentose e uma desoxirribose, cujo nome é devido à desoxigenação da molécula de ribose (açúcar) ligado ao fosfato. As bases nitrogenadas são classificadas em púricas e pirimídicas. As púricas são derivadas da purina e as pirimídicas da pirimidina (figura 1). (55)

Figura 1 - (a) Estrutura de um nucleotídeo: um grupo fosfato, uma ribose e uma base nitrogenada. (b) estrutura da purina (c) estrutura da pirimidina

Fonte: NELSON (55)

As principais bases púricas do DNA são a adenina (A) e guanina (G), enquanto que as pirimídicas são timina (T) e citosina (C). Elas são denominadas de bases fracas e são hidrofóbicas, portanto pouco solúveis em água (em pH 7). As bases nitrogenadas são praticamente não reativas em substituição aromática eletrofílica. Sua estrutura em forma de anel confere delocalização da nuvem eletrônica dos elétrons presentes na ligação dos anéis, o que atribui às suas ligações características de ligação parcialmente dupla. Isso implica que as pirimidinas são moléculas planares e as purinas são quase planares, e que a propriedade de absorção de luz dos ácidos nucleicos é oriunda destas bases nitrogenadas. Todos os nucleotídeos absorvem luz UV em comprimentos de onda próximos de 260 nm (adenina 260 nm, guanina 250 nm, citosina 270 nm, e timina 260 nm). Na figura 2 (b) é mostrada a absorção de cada nucleotídeo individual na região indicada. Ainda que seja uma molécula muito estudada há poucas informações experimentais detalhadas do DNA ou da ordem de empilhamento do par de bases de oligonucleótidos e em suas propriedades espectrais no UV. As figuras 2 (c) e 2 (d) ilustram as características específicas relativas à sequência e à ordem de empilhamento dos pares de bases e sua influência nas propriedades ópticas da molécula para três sequências diferentes de oligo-nucleótidos de DNA duplex distintos: (AT) 10, (AT) 5 (GC) 5 e (AT-GC) 5. Ao compararem-se esses três duplex, pode se abordar os efeitos da composição e da sequência de empilhamento para elucidar a relação estrutura-função desses importantes sistemas biomoleculares. (55)

A interação entre as bases nitrogenadas dos nucleotídeos diminui a absorção de radiação eletromagnética na região UV em comparação quando estão livres em uma solução de mesma concentração. E esta absorção é ainda menor quando duas cadeias de DNA estão pareadas. Este fenômeno é denominado efeito hipocrômico. Já a desnaturação dos ácidos nucleicos aumenta sua absorção na região mencionada, e este é o efeito hipercrômico. Essa transição de DNA em fita dupla e desnaturado pode ser verificada pelo acompanhamento da mudança do espectro de absorção em torno de 260 nm. (44-48, 101-107).

As transições eletrônicas na região do ultravioleta são atribuídas às excitações intramoleculares associadas a orbitais π - π^* (entre os orbitais moleculares ligantes e antiligantes), atribuídas a excitações de um único elétron das bases. (108-209)

Figura 2 - (a) Estrutura dos nucleotídeo: A=Adenina, G=Guanina, C=Citosina, T=Timina. (b) Absorção de cada base individualmente. Modelos moleculares de oligonucleótidos com dez pares de bases (c) (AT) 10, (b) (AT) 5 (GC) 5 e (c) (AT-GC) 5 e dados como modelos esquemáticos em 3D. (d) Absorção das estruturas (AT) 10, (b) (AT) 5 (GC) 5 e (c) (AT-GC) 5 .

Fonte: JACOB (56)

2.1 Fluorescência da molécula de DNA

A fluorescência é um exemplo dos fenômenos de luminescência mais gerais, que podem ser definidos como a emissão de luz após o relaxamento radiativo de um estado excitado. A luminescência é chamada fluorescência quando a excitação é induzida pela luz (também chamada de fotoluminescência) e quando o estado eletrônico excitado é um estado de singlete.

Quando a molécula absorve um fóton de luz com uma energia específica seu elétron migra de um estado fundamental (S_0) para um estado eletrônico de maior energia. A diferença de energia entre o estado excitado (S_2) e o fundamental (S_0) corresponde à energia do fóton absorvido ($E_{fóton}$). (210-214)

No estado excitado, o elétron pode emitir esse excesso de energia ($h\nu$) e ir para um estado de menor energia até o retornar ao seu estado fundamental. O processo pode ser resumido por:

Nessa transição para o nível menos energético as perdas de energia podem ocorrer por mecanismos radiativos (fluorescência e fosforescência) ou por mecanismos não radiativos (conversão interna e cruzamento intersistema), *quenching* e interações no solvente.

No diagrama de Jablonski (figura 3), é possível observar a evolução da excitação e relaxação do elétron por processos radiativos e não radiativos. (43-44)

Figura 3 - Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando os processos envolvidos durante uma excitação e a emissão de fluorescência

Fonte: LAKOVICZ (43)

A figura 3 mostra uma versão simplificada do diagrama que ilustra alguns processos que ocorrem nos estados moleculares. Quando um fluoróforo absorve energia de luz, em seu estado fundamental (S_0) geralmente é excitado para um nível de energia vibracional mais alto no primeiro estado excitado (S_1) ou segundo excitado (S_2), antes de relaxar rapidamente para o nível de energia mais baixo em cerca de 1 ps ou menos (esse processo é chamado de conversão interna). (43-46, 211-223)

A fluorescência das bases de DNA é resultante da fotoexcitação na região entre 260 e 270 nm. Em geral as moléculas de DNA apresentam uma resposta de fluorescência a partir de 300 nm, quando diluído em soluções aquosas. A figura 4 compara os espectros de absorção e fluorescência de DNA dissolvido em tampão fosfato (NaH_2PO_4 (0,1mol/L) e NaCl 0,25 (0,1mol/L) em água ultra pura. (224, 225)

Figura 4 - (a) absorção normalizada de soluções com DNA sem marcação. (b) Fluorescência das soluções com excitação em 267 nm. Espectros de DNA em água pura (linha contínua) e em tampão fosfato (tracejado).

Fonte: Adaptada de SHERRY (225)

Informações relacionadas aos processos não radioativos associados a estes últimos estados podem ser obtidos medindo as propriedades da fluorescência associadas a transições radioativas dos estados excitados de singleto e tripleto. O DNA possui em sua estrutura, grupos riboses e fosfatos de fosforescência com excitação a 260nm, na primeira banda de absorção de singleto, que leva à formação dos estados de tripleto mais baixos, portanto, a extensão a partir de 400nm é atribuído à fosforescência (região demarca em vermelho). (200,209)

É amplamente aceito que a transição de elétrons excitados do nível de energia superior para o nível do estado fundamental acontece por dois métodos; um é emitindo fótons, e o outro é por relaxamento de energia no fônion. (46-48) Com a condição de excitação fraca, isto é, longe da saturação do estado excitado, a taxa de emissão espontânea de fluorescência γ_0 eles podem ser considerados como a excitação do estado fundamental ao estado excitado e o

posterior relaxamento de volta ao estado fundamental pela emissão de fluorescência, isto é (43-48,79, 110-150):

$$\gamma_{em}^0 = \gamma_{exc}^0 Q_i^0 \quad (2.3)$$

Onde Q^0 e γ_{exc}^0 são o rendimento quântico e a taxa de excitação, respectivamente, e o sobrescrito '0' especifica que a molécula está em espaço livre e não se acopla ao ambiente local. O subíndice 'i' indica que o rendimento quântico é definido pelas propriedades intrínsecas da molécula. Como indicado anteriormente, Q^0 é a probabilidade de um fóton relaxar do estado excitado, emitindo um fóton de fluorescência. Aqui, a taxa de decaimento radiativa e não-radioativa pode ser definida como γ_r^0 e γ_{nr}^0 , respectivamente, de modo que o rendimento quântico intrínseco com uma definição mais geral pode ser definido como (44):

$$Q_i^0 = \frac{\gamma_r^0}{\gamma_r^0 + \gamma_{nr}^0} \quad (2.4)$$

Se o ambiente local do fluoróforo mudou, as taxas de excitação e decaimento serão alteradas. Então as equações. (4.1) e (4.2) pode modificar como:

$$\gamma_{em} = \gamma_{exc} Q \quad (2.5)$$

$$Q = \frac{\gamma_r}{\gamma_r + \gamma_{nr}} = \frac{\gamma_r}{\gamma_r + \gamma_{nr}^0 + \gamma_{rabs} + \lambda_m} \quad (2.6)$$

Aqui, γ_{abs} explica a dissipação de calor no meio ambiente e γ_m explica o acoplamento a modos eletromagnéticos não radioativos, como a energia emitida é convertida em calor através da interação entre o elétron e a rede. A taxa total de decaimento $\gamma = \gamma_r + \gamma_{nr}$ define o tempo de vida $\tau = 1/\gamma$ do estado excitado. Em geral, a emissão de fluorescência não depende apenas das propriedades moleculares, mas também dos parâmetros externos que compõem o ambiente local do fluoróforo. Embora a fluorescência seja conhecida como um dos métodos ópticos de melhor escolha para a detecção de espécies biológicas e químicas, uma desvantagem típica da técnica de fluorescência convencional é a relação de sinal/ruído (fundo) relativamente baixa, que restringe sua aplicação a áreas importantes de diagnósticos

médicos, particularmente na detecção de moléculas fluorescentes alvo em nível de uma única molécula. (88, 150-175)

2.2 Tempo de vida de fluorescência

O tempo de vida de fluorescência τ_{EM} é definido como o tempo de relaxamento médio para o estado eletrônico fundamental e é tipicamente da ordem de alguns nanosegundos, dando ao fluoróforo tempo suficiente para atingir o estado vibracional mais baixo do estado excitado S_1 . Para um fluoróforo é o tempo característico que uma molécula num estado excitado leva antes de retornar ao estado fundamental. Em geral pode ser representando na forma de uma função exponencial única e simplificada. (212-230) A intensidade de fluorescência em função do tempo (t) é dada pela equação:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau_{EM}) \quad (2.7)$$

Onde I_0 é a intensidade de emissão de fluorescência inicial imediatamente após o pulso de luz de excitação (muito mais rápido). Este tempo é característico do sistema eletrônico, porém há outros processos que influenciam na emissão total de radiação do sistema. A partir de todas as interações que uma molécula é submetida defini-se rendimento quântico da fluorescência ou a eficiência quântica Q como um parâmetro fundamental usado para determinar a eficiência de fluorescência de um dado fluoróforo. (48) É comumente definido como a probabilidade de um determinado fluoróforo excitado produzir um fóton de fluorescência. A definição mais geral para Q é:

$$Q = \frac{\Gamma_{EM}}{\Gamma_{EM} + \Gamma_{outro}} = \frac{\tau}{\tau_{EM}} \quad (2.8)$$

Onde Γ_{EM} representa todos os processos de relaxamento radiativo (emissão eletromagnética - emissão de um fóton) e Γ_{outros} são todos os outros processos de relaxação que estão relacionados à mecanismos não radiativos induzidos por interação molecular direta (231-232) ou mesmo emissão de plasmons-polarions de superfície. Em alguns processos de relaxamento, os processos EM podem ser não radiativos, em casos muito particulares. (43-48,79)

Os diagramas ilustrados na figura 5 representam as escalas temporais envolvidas nos mecanismos fluorescência (EM) e processos não radiativos (outros) para um fluoróforo. Como vimos acima a decomposição de fluorescência geralmente é uma função exponencial para um único fluoróforo, mas pode exibir características muito mais complexas se o estado excitado possuir inúmeras vias de relaxamento disponíveis no ambiente. (48-50,233-234)

Figura 5 - Esquema de Jablonski representativo dos tempos característicos dos processos numa macromolécula.

Fonte: Adaptada de MOLECULAR. (234)

A emissão radiativa de um fluoróforo ocorre a partir de estados do tipo singlete e tripleto, pode-se observar que no estado excitado singlete a emissão ocorre mais rapidamente, enquanto que no estado tripleto é mais lenta, dessa forma a emissão no estado singlete é de fluorescência (entre 10^{-7} s e 10^{-9} s) e no estado tripleto corresponde a fosforescência entre 10^{-2} e 10^{-3} s). (46)

No caso de soluções muito concentradas a distância intermolecular diminui e estas começam a interagir de forma mais intensa gerando um novo canal de perda de energia para moléculas no estado excitado. Na figura 6 é ilustrada a transferência de energia entre duas moléculas muito próximas de uma forma não radiativa através de interações de dipolo-dipolo. A transferência de energia pode ser entendida tratando-se o fluoróforo excitado como um dipolo oscilante que pode sofrer uma troca de energia com um segundo dipolo com uma frequência de ressonância semelhante. (43) Se houver um aglomerado de moléculas na região, pode haver perda de energia para o meio *inter-cross system*. (47)

Figura 6 - Esquema de Jablonski representativo da transição a par numa macromolécula.
Fonte: Adaptada de MOLECULAR. (234)

Por outro lado a transferência de energia radiativa requer emissão e reabsorção de um fóton e depende das dimensões físicas e propriedades ópticas da amostra, bem como a geometria da superfície. Ao contrário dos mecanismos radiativos, a transferência de energia ressonante pode produzir uma quantidade significativa de informações estruturais sobre o par doador e receptor de elétrons. (42-45)

A transferência de energia ressonante não é sensível às intervenções de solvente de um fluoróforo. O principal impacto do solvente (água) nos fluoróforos envolvidos na transferência de energia de ressonância é sobre as propriedades espectrais do doador e do receptor. A transferência de energia não radiativa ocorre em distâncias muito mais longas do que os efeitos do solvente de curto alcance, A natureza dielétrica dos constituintes posicionada entre os fluoróforos envolvidos tem pouca influência na eficácia da transferência de energia de ressonância, que depende principalmente da distância entre o doador e o fluoróforo receptor. (70-100)

O tempo de vida de um fluoróforo está sujeito a modificações por inúmeras variáveis no microambiente local, incluindo fatores como hidrofobicidade, concentração de oxigênio, força iônica de outros componentes, ligações às macromoléculas e proximidade às moléculas aceitadoras que podem esgotar o estado excitado por transferência de energia de ressonância. É uma vantagem prática significativa que as medidas de tempo de vida podem servir como indicadores absolutos das interações moleculares e são independentes da concentração de fluoróforo. A determinação da concentração em massa dos fluoróforos por luminescência

pode ser parcialmente detectada através de medidas de fluorescência resolvidas no tempo.
(46)

2.3 Excitações com um ou múltiplos fótons

Nos últimos anos os avanços tecnológicos proporcionaram novos usos da fluorescência. Essas tecnologias foram rapidamente adotadas e estão se tornando métodos convencionais. Uma dessas tecnologias é a excitação com dois ou múltiplos fótons (MPE) e pode ser utilizada em conjunto com a técnica de microscopia confocal. (43-46) A fluorescência geralmente é obtida pela absorção de um fóton único com um comprimento de onda dentro da faixa de absorção do fluoróforo. Os lasers com largura de pulso de femtosegundos podem excitar fluoróforos pela absorção de dois fótons. Como a intensidade de pico do laser pulsado é alta, um fluoróforo pode absorver simultaneamente dois fótons de comprimento de onda longo cuja soma em energia é suficiente para promover a absorção para o primeiro estado singleto (ver Figura 7). Este processo depende fortemente na intensidade da luz e ocorre apenas no ponto focal do laser. Fluoróforos fora do volume focal não são excitados. A excitação localizada com dois fótons tem seu uso generalizado em microscopia de fluorescência porque permite imagens apenas a partir do plano focal de um microscópio. Esta é uma vantagem porque as imagens de fluorescência são pouco distorcidas. A nitidez das imagens é devida também a baixa interação (espalhamento) entre o campo eletromagnético do laser com as moléculas do solvente.

Na figura 7 está representado o diagrama de Jablonski para a absorção de um e dois fótons. A absorção de dois fótons requer alta potência para aumentar a probabilidade de que dois fótons serem simultaneamente absorvidos. Devido à interação de dois fótons com o fluoróforo, as regras de seleção para absorção de luz são, em princípio, diferentes daquelas para a espectroscopia de um fóton. Assim, a espectroscopia de dois fótons foi inicialmente utilizada como uma ferramenta para estudar a simetria do estado excitado de cromóforos orgânicos ou para identificar níveis de energia adicionais.

Os parâmetros moleculares básicos em microscopia de fluorescência quantitativa são as secções transversais de excitação de fluorescência. Além disso, muitas vezes é difícil prever os espectros MPE, especialmente os espectros de dois fótons, a partir dos dados conhecidos

de absorção de um fóton por causa das diferentes regras de seleção envolvidas e dos efeitos do acoplamento com níveis vibracionais.

Figura 7 - Diagrama de Jablonski para absorção de um e dois fótons. Em (a) excitação por absorção de um fóton para o diagrama esquemático dos níveis de uma biomolécula e mecanismo de decaimento radioativo e não radioativo (cruzamento intersistema). Em (b) excitação por absorção simultânea de dois fótons seguido dos mesmos mecanismos como descrito em (a).

Fonte: Adaptada de LAKOVICZ (48)

Os processos com múltiplos fótons requerem que dois ou mais fótons venham a interagir simultaneamente com a molécula. Por exemplo, em um processo de dois fótons, o "primeiro" fóton excita a molécula para um estado intermediário, e o "segundo" fóton excita a molécula até seu estado final. Como o estado intermediário pode ser uma superposição de estados moleculares em vez de um estado da molécula, geralmente é referido como o estado intermediário virtual. Embora a força do oscilador de transição de dois fótons consiste em contribuições de todos os estados independentes para os estados intermediários, a aproximação de um único intermediário pode ser usada para dar uma estimativa da magnitude. Podemos representar a seção transversal de absorção de dois fótons σ_2 como:

$$\sigma_2 = \sigma_{ij}\sigma_{jf}\tau_j \quad (2.9)$$

Onde i, j, f são os estados inicial, intermediário e final, σ_{ij} e σ_{jf} representam as seções transversais de absorção de um fóton e τ_j é o tempo de vida do estado intermediário que determina a escala de tempo para coincidência (chegada simultânea). Podemos estimar este

tempo a partir do princípio da incerteza, ou seja, deve ser suficientemente curto para não violar a conservação de energia. Portanto,

$$\tau_j \approx \frac{1}{\Delta\omega} = 1/|\omega_{ij} - \omega| \quad (2.10)$$

Onde ω_{ij} e ω são a frequência de transição e a frequência do fóton incidente, respectivamente. Para uma transição eletrônica (ω_{if}) na faixa de frequência visível e assumindo ainda que o estado intermediário e o estado final estão próximos de energia, então temos $\tau_j \approx 10^{-15} a 10^{-16} s$. A seção transversal de absorção de um fóton de uma molécula pode ser estimada pelo seu momento de dipolo (tipicamente entre $10^{-16} a 10^{-17} cm^2$), resultando numa seção de choque de aproximadamente $10^{-49} \frac{cm^4 s}{fóton}$.

3 PLASMONS POLARITONS DE SUPERFÍCIE

O termo “*Surface Plasmon*” (SP) refere-se aos plasmons confinados na interface entre um metal e um dielétrico e foi atribuído a Stern e Ferrell no início dos anos 60. Os SP foram observados experimentalmente pelos cientistas Powell e Swan e também por Ritchie em 1968, a partir de redes de difração em superfícies metálicas no domínio óptico do espectro, mostrando assim a possibilidade de que um filme metálico possa suportar a propagação de ondas de superfície além das oscilações de plasma de bulk, demonstrando assim a existência de modos eletromagnéticos propagantes na superfície do metal. (44,114-117,124-127) Em seguida Kretschmann e Raether propuseram uma descrição unificada do fenômeno das ondas de superfície de plasmon, na região visível do espectro, descrevendo um modelo físico para a excitação óptica de plasmon de superfície em filmes metálicos. Todavia o termo polariton já havia sido definido por Robert Fano, que o introduziu para denominar a oscilação acoplada entre os elétrons confinados e a luz em um meio transparente. Posteriormente em 1974, Burstein completa seu trabalho com estudos dos modos de poláritons de superfície (44,114-115), sendo que logo depois Stephen Cunningham e colaboradores introduziram o termo surface plasmon-polariton (SPP). (44,128-129)

O grande impulso nas pesquisas envolvendo plasmon-polaritons de superfície é atribuído à observação da transmissão óptica extraordinária (TOE). (58) A TOE é um fenômeno óptico no qual uma estrutura contendo aberturas cujas dimensões são muito menores que o comprimento de onda da radiação eletromagnética incidente sobre uma superfície opaca transmite mais luz do que seria esperado segundo a teoria clássica da difração de Abbe, ou simplesmente do limite de difração $\frac{\lambda}{2n}$ (onde n é o índice de refração do meio). Fenômeno semelhante foi descoberto para arranjos periódicos em duas dimensões de orifícios em metais. Surpreendentemente, tais arranjos podem, para determinados comprimentos de onda, apresentar eficiência na transmissão normalizada na área total dos orifícios que excedem a unidade. (130-131)

Plasmon poláritons de superfície podem então ser definidos como oscilações de elétrons livres em uma superfície que permita que a energia eletromagnética, em escalas menores que o comprimento de onda, seja localizada, confinada, e posteriormente guiada na interface entre um material condutor e um dielétrico. (9, 38, 44, 51, 113-114) A propagação de plasmon poláritons de superfície cria a possibilidade de confinamento da luz abaixo do

limite de difração através de estruturas capazes de suportar um fóton acoplado ao elétron. (8-9,44,51)

O maior desafio no desenvolvimento de sensores é a otimização do seu desempenho que está relacionado com ao desenho geométrico das nanoestruturas e com o tipo de material utilizado em diversas estruturas tais como: nanopartículas (142-149), matrizes de fendas circulares (44,49,150-151) e conjuntos geométricos de quadrados de fendas. (38,77,117,134,151-153) As alterações das constantes ópticas na superfície do metal têm uma grande influência na condição de ressonância, e é um dos princípios base de biossensores por ressonância plasmon de superfície (*Surface Plasmon Ressonance SPR*). (158-160) Tais alterações são ocasionalmente geradas devido à adesão de qualquer outro material que possa influenciar o espectro SPR refletividade.

Neste capítulo faremos uma revisão sucinta das condições para que um campo eletromagnético se acople com elétrons livres num metal gerando assim modos propagantes de SPPs. Além das condições de propagação numa superfície plana é possível acoplar o campo com os elétrons na superfície metálica através de nanosestruturas.

3.1 Acoplamento entre o campo eletromagnético e elétrons livres num metal

O conceito de plásmons é usado para explicar muitas das propriedades ópticas fundamentais dos metais e dos fenômenos da transmissão óptica extraordinária, dispensando o uso de ferramentas complexas. (37) Utilizando esse conceito podemos tratar os elétrons livres em um metal como um gás, com densidade n , movendo-se em redes periódicas de íons positivos. Este movimento é amortecido por colisões entre os elétrons e os íons. Se aplicarmos um campo externo, a esse gás de elétrons, estes irão oscilar em resposta ao campo. Essa excitação coletiva dos elétrons no sólido pode ser entendida como um quantum de energia denominado de plásmon. (5-6) Quando ocorre o acoplamento entre os fótons da radiação incidente e os plásmons dá-se a denominação plásmon-poláriton. (7) Entretanto há condições para que esse fenômeno ocorra como a resposta dielétrica do material, que pode ser descrita pelo modelo de Drude, (37-38)

$$\varepsilon_m(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (3.1)$$

Na equação 3.1, ω_p é o termo da frequência de plasma dos elétrons livres e γ é a taxa de colisão entre os elétrons. O modelo matemático de Drude descreve o comportamento de um elétron livre de um metal nobre sujeito a um campo elétrico $E(t)=E_0e^{i\omega t}$ (132-134), cuja frequência de oscilação é dada por ω . Onde o elétron está sujeito a uma força decorrente do campo elétrico, e fótons de baixa energia absorvidos pelas transições dentro da banda de condução do metal. No caso de energias menores que a frequência de plasmon, o metal é um bom refletor, enquanto para frequências acima da ressonância de plasmon, este tem o comportamento de um dielétrico. (3,8-9,38,44,51,101,134,137,141)

Considerando mínimas as perdas no metal ($\gamma = 0$), quando $\omega > \omega_p$ a permissividade é positiva ($\epsilon_m > 0$) e a luz propaga-se pelo metal por meio dos elétrons livres no *bulk*. Esse acoplamento entre a luz e os elétrons livre é denominado plasmon-polártons de *bulk* (*bulk plasmon-polariton - BSP*).

Quando $\omega < \omega_p$ a permissividade é negativa ($\epsilon_m < 0$) e a luz se propaga na superfície metálica por meio de ondas evanescentes originando os modos plasmon-polártons de superfície (*surface plasmon polariton - SPP*).

O vetor de onda k_{SP} , relacionado às ondas *SPPs*, esta associado à frequência de oscilação ω e a resposta dielétrica pela relação de dispersão descrita por (37):

$$k_{SP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (3.2)$$

Sendo ϵ_m e ϵ_d as permissividades relativas do metal e do dielétrico e c a velocidade da luz. A parte real do k_{SP} é:

$$k'_{SP} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon'_m \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}} \quad (3.3)$$

E define a condição de existência dos modos *SPPs*: a parte real da constante dielétrica do metal deve ser negativa ($\epsilon'_m < 0$) e satisfazer $|\epsilon'_m| > \epsilon_d$ (37), e a parte imaginária (k''_{SP}), determina o amortecimento interno e absorção no material.

$$k''_{SP} = \frac{k_0 \epsilon''_m}{2(\epsilon'_m)^2} \sqrt{\left(\frac{\epsilon'_m \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}\right)^3} \quad (3.4)$$

Substituindo a função dielétrica da equação 3.1 na equação 3.2 e considerando a frequência $\omega \rightarrow \omega_p$, podemos obter a frequência máxima que o vetor de propagação pode atingir ($k_{SP} \rightarrow \infty$). Este valor de frequência é denominado frequência de plamon de superfície (ω_{SP}) e esta relacionada diretamente com o dielétrico utilizado.

$$\omega_{SP} = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + \epsilon_d}} \quad (3.5)$$

O plasmon é definido com um quantum de energia formado pela excitação coletiva dos elétrons livres em sólido, que são observados em metais quando estes são excitados com uma frequência ω abaixo da frequência de plasma ω_p do metal. E o poláriton é um modelo do acoplamento de um fóton junto de uma excitação. Portanto o conceito de plasmon poláriton é um fenômeno de acoplamento do plasmon (oscilação dos elétrons no metal) com o fóton (campo eletromagnético). (44,53,99,132)

A configuração geométrica mais comum para o acoplamento com o modo de propagação na superfície é o método de Kretschmann, onde os fótons de um feixe incidindo no material dielétrico (vide figura 8) com um ângulo maior que o ângulo crítico de reflexão interna total pode excitar SPPs na interface metal e ar. (136) Outra geometria é a configuração Otto, em que o prisma é separado da superfície do metal por uma fina camada de ar. A reflexão interna total ocorre na interface entre a superfície e o ar, por exemplo. Esta configuração é preferível quando se deseja o contato direto com a superfície do metal, para estudos da qualidade de superfície. (50,93-94,106,135,155)

O prisma, pode ser considerado um sistema de três camadas constituídas por uma película fina de metal e dois materiais dielétricos diferentes. Para simplificar, vamos tomar um dos dielétricos como sendo o ar ($\epsilon = 1$).

Figura 8 - Acoplamento de ondas SPPs por prisma usando reflexão interna total nas configurações Kretschmann (esquerda) e Otto (direita).

Fonte: MAIER (101)

O feixe refletido na interface entre o dielétrico e o metal provocará oscilações de carga momentaneamente promovendo um campo eletromagnético que decai exponencialmente para o espaço perpendicular à superfície (um campo evanescente) e tem o seu máximo na interface. O vetor de onda do fóton no prisma é $k_x = k_0 \sqrt{\epsilon} \sin \theta$, que é suficiente para excitar as ondas *SPPs* na interface entre o metal e o dielétrico de menor constante dielétrica, ou seja, a interface ar/metal.

A figura 9 apresenta as curvas de dispersão dos modos *BPP* e *SPP*. A linha tracejada azul representa a dispersão no vácuo, a tracejada laranja num material dielétrico, a curva vermelha a dispersão k_{SP} - modos *SPP* e a linha roxa a dispersão dos modos *BPP*.

Figura 9 - Relação de dispersão para o plásmom de bulk (BPP), para o plásmom de superfície (SPP) e num dielétrico. A linha tracejada azul representa a dispersão da luz no vácuo ($\omega = ck_0$), a linha tracejada laranja representa a dispersão num dielétrico. Para a frequência ω_i temos o vetor de onda k_{SP} que é maior que o vetor de onda da luz se propagando no dielétrico.

Fonte: Adaptada de SILVA (9)

O número de onda no modo *SPP* (k_{SP}) é maior do que no dielétrico (k) para a frequência ω_i , portanto o comprimento de onda *SPP* (λ_{SP}) é menor que o comprimento de onda da radiação incidente (λ). O número de onda da linha de luz (azul), também, é menor que o número de onda no modo *SPP* (k_{SP}) implicando que para uma frequência, ω_i , a radiação incidente não pode excitar diretamente as ondas *SPPs*.

A intensidade do campo evanescente na direção perpendicular a interface determina a profundidade de penetração (δ_d) que é uma medida de quão profundo o campo eletromagnético pode penetrar no material até que a sua intensidade decaia para $1/e$ (cerca de 37%) do seu valor inicial na interface.

A intensidade do campo *SPP* diminui, exponencialmente, normal à superfície por uma onda evanescente proporcional a $e^{-|k_{zi}||z|}$. A profundidade de penetração do campo é definida por:

$$|\delta_i| = \frac{1}{|k_{zi}|} \quad (3.6)$$

onde para a região metálica temos:

$$\delta_m = -\frac{c}{\omega} \sqrt{\frac{|\epsilon'_m + \epsilon_d|}{\epsilon_m'^2}} \quad (3.7)$$

e para o dielétrico:

$$\delta_d = \frac{c}{\omega} \sqrt{\frac{|\epsilon'_m + \epsilon_d|}{\epsilon_d^2}} \quad (3.8)$$

Tipicamente a região de penetração do campo no dielétrico é da ordem de $\lambda/2$.

Além da penetração do campo no material temos, também, o comprimento efetivo de propagação (L) da onda *SPP* ao longo da interface que determina o limiar para a queda da intensidade de $1/e$ do valor inicial do campo. O comprimento efetivo de propagação é definido por (39):

$$L = \frac{1}{2k_{SP}''} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\left(\frac{\epsilon'_m + \epsilon_d}{\epsilon_m' \epsilon_d}\right)^3 \frac{(\epsilon_m'')^2}{\epsilon_m''}} \quad (9)$$

Na região visível do espectro essa distância é da ordem de micrômetros (10^{-6} m).

3.2 Geração de plasmons-polaritons em nanoestruturas metálicas

Além do acoplamento através de prismas, que se baseia na reflexão total, é possível utilizar grades metálicas fabricadas sobre a interface onde se deseja acoplar a luz com os SPP's no plano, conforme mostra figura 10. Esse método, baseado no que se chama de casamento de fase, se baseia no mesmo princípio que a difração de elétrons numa rede cristalina; a diferença entre a componente tangencial do vetor de onda incidente e o vetor de onda do SPP's é compensada por um número inteiro de vetores da rede recíproca gerada pelo padrão. Fica claro neste caso, que a introdução das ranhuras gera naturalmente um espectro de bandas para os SPP's no plano. Dependendo da forma como essas ranhuras são feitas, e.g. utilizando um padrão bidimensional de furos como no experimento de Ebbesen (58), é possível que esse espectro de bandas apresente gaps de energia, dando origem assim ao que chamamos de bandas plasmônicas. (60) O mecanismo do acoplamento da luz com SPP's através de ranhuras numa rede plasmônica são de fundamental importância para o acoplamento de luz com SPP's em geral para aplicações em dispositivos. Outro ponto importante é o fato de que a presença de estruturas plasmônicas fabricadas sobre a interface metal/dielétrico pode selecionar apenas comprimentos de onda bem definidos, funcionando como antenas que podem inclusive ser sintonizadas. (58-60) Além disso, através dessa engenharia é possível desenvolver lentes plasmônicas, que direcionam os SPPs de forma controlável. Porém, vale ainda ressaltar que para que o processo de acoplamento com os SPP's utilizando estruturas metálicas seja eficiente não é necessário que as ranhuras sejam fabricadas sobre a superfície metálica. Para entender isso basta lembrar que o campo do SPP, que é aquele que se acopla com a luz, penetra tanto na região do metal como do dielétrico. Dessa maneira, dependendo da aplicação desejada é possível produzir estruturas plasmônicas tanto com fabricações sobre o metal como sobre o dielétrico. (48, 159, 195, 202)

Na figura 10 (b) mostramos o perfil em profundidade da simulação numérica obtida a partir do software LUMERICAL mostrando o perfil do campo E_x de uma onda plana (comprimento de onda 800nm) incidindo sobre a superfície metálica. As cores indicam a intensidade do campo elétrico na região da interface entre metal/vidro evidenciando ressonâncias com os SPP's formados.

Figura 10 - (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um filme metálico de prata de 200nm de espessura depositado sobre vidro. As ranhuras de 20μm de comprimento, espessura de 50nm e espessamento de 400nm foram fabricadas pela técnica de litografia por feixe de íons. (b) simulação numérica da região indicada em (a) usando o software LUMERICAL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4 INTERAÇÃO DE PLASMON POLARITONS DE SUPERFÍCIE COM AGLOMERADOS DE MOLÉCULAS DE dsDNA

Neste capítulo faremos uma breve descrição dos mecanismos de interação de um fluoróforo quando este é colocado na presença de uma nanoestrutura metálica. Como vimos no capítulo anterior a nanoestrutura metálica gera plasmon-polárítos de superfície em determinados comprimentos de onda possibilitando assim novos mecanismos de transferência de energia entre a macromolécula e o meio e vice-versa. Neste caso o meio é considerado na presença de plasmons-polárítos SPP's. Nesta direção surgiram nos últimos cinco anos estudos sobre a interação nanopartículas e estruturas metálicas com fluoróforos que revelaram uma série de efeitos, tais como, o aumento das taxas de fluorescência através da transferência ressonante de energia (*Transfer of fluorescence resonance energy FRET*) e emissão direcional em superfícies metálicas planas, abordagem esta que será utilizada nos capítulos 5 e 6. Esses feitos resultaram em uma nova geração de metodologias para nanofabricação de sondas e dispositivos para o uso de fluorescência em biociências. (28,43-48,79-86) Para fornecer uma visão geral das interações do fluoróforo com o metal serão apresentados a seguir os aspectos gerais de como ocorre a interação entre o fluoróforo e estrutura plasmônica.

4.2 Transferência de energia por ressonância de fluorescência

A microscopia confocal de fluorescência clássica atualmente depende da emissão espontânea de fótons ocorrendo quase isotropicamente em todas as direções. Uma vez que a emissão é principalmente isotrópica, os espectros observáveis geralmente não dependem da direção de observação e da ótica de coleta para as medições. A informação sobre a amostra é obtida principalmente de mudanças nas taxas de decaimento não radiativas k_{nr} , como colisões de fluoróforos com mecanismos de dissipação k_q e/ou transferência de energia de ressonância de fluorescência k_T (*Transfer of Fluorescence Resonance Energy FRET*). Alterações em k_q ou k_T resultam em mudanças no tempo de vida observado do fluoróforo além da taxa de decaimento radiativa Γ do fluoróforo. Porém as taxas de emissão espontânea de fluoróforos são determinadas pelas suas propriedades eletrônicas e não são significativamente alteradas na maioria das vezes. (164) As propriedades das interações do fluoróforo com o metal podem ser entendidas a partir da figura 11.

Figura 11 - Representação dos mecanismos de interação de um fluoróforo - diagrama Jablonski modificado.
Fonte: LAKOVICZ (46)

Nanopartículas metálicas podem interagir fortemente com a luz incidente gerando plasmon-polaritons localizados. Os coeficientes de extinção de nanopartículas metálicas podem ser até 100 vezes maiores do que um fluoróforo. (33,164) O uso de fluoróforos perto de nanopartículas de metal oferece a oportunidade de utilizar o coeficiente de extinção efetivo maior das nanopartículas de metal. Quando exposto a luz incidente, os campos elétricos estão concentrados em torno do colóide. Esses campos locais podem resultar em um aumento da excitação de fluoróforos próximos dos metais, devido aos grandes coeficientes de extinção dos colóides. Todavia existe outro efeito potencialmente mais importante: um fluoróforo de estado excitado pode interagir com um colóide metálico próximo e criar plasmons. Os plasmons induzidos por fluoróforos podem irradiar para o campo distante. (87,123,229). A emissão mantém o mesmo espectro do fluoróforo, por isso o complexo fluoróforo-metal é a princípio considerado como um emissor (nanoantena) e essa emissão possui propriedades do

fluoróforo e do metal. O aumento na taxa de decaimento radiativo pode ser entendido a partir das definições de rendimento quântico (Q_0) e tempo de vida (τ_0). O rendimento quântico e tempo de vida de um fluoróforo são dados por:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + \kappa_{nr}} \quad (4.1)$$

$$\tau_0 = (\Gamma + \kappa_{nr})^{-1} \quad (4.2)$$

Nos experimentos clássicos de fluorescência, as mudanças nos rendimentos quânticos são decorrentes de mudanças nas taxas de decaimento não radiativas κ_{nr} que resultam de mudanças no ambiente de um fluoróforo, coeficiente de extinção ou FRET. Os valores de Q_0 e τ_0 tanto aumentam quanto ambos podem diminuir. Mudanças espectrais únicas são possíveis para fluoróforos perto de partículas metálicas ou superfícies metálicas. (43-48) Supondo que esta taxa de decaimento radiativo perto do metal seja aumentada e seja dada por $\Gamma + \Gamma_m$, quando Γ_m é a taxa adicional devido ao metal. O rendimento quântico Q_m e a vida τ_m perto do metal tornam-se:

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + \kappa_{nr}} \quad (4.3)$$

$$\tau_m = (\Gamma + \Gamma_m + \kappa_{nr})^{-1} \quad (4.4)$$

A física dos fluoróforos que interagem com os metais é um tema complexo, assim não é possível apresentar aqui uma teoria completa. Existem várias revisões clássicas que fornecem resumos da teoria e resultados experimentais. (47, 89, 203-210) Essas teorias só consideraram as interações eletromagnéticas do fluoróforo com a estrutura metálica.

4.2 Plasmons controlados por fluorescência

Como mostramos no item anterior o ambiente em que se encontra o fluoróforo pode modificar de forma significativa os processos de transferência de energia entre o estado excitado

Os modos de ressonância de plasmon de superfície (SPR) (93-97,157) são produzidos pela ressonância de SPP em uma interface metal-dielétrica e luz incidente polarizada que aumenta a intensidade do campo elétrico para cerca de 20 a 100 vezes o nível do campo incidente. (10-12,93,96,157) O campo elétrico de SPR pode ser aplicado para excitar moléculas fluorescentes, é conhecida como espectroscopia de fluorescência de superfície de plasmon de superfície (SPFS). (28,84-86) A fluorescência observada no SPFS também é aumentada devido à excitação pelo campo de plasmon de superfície aprimorada (ou melhorada). (10-12,84-86,153-155,229)

A intensidade de fluorescência emitida por cromóforos para um determinado comprimento de onda depende da intensidade do campo de excitação óptica e probabilidade de decaimento radiativo do estado excitado ao estado fundamental. (28) A camada é descrita por uma função dielétrica complexa com uma parte real e uma parte imaginária (para materiais absorventes) da espessura da camada. Este tratamento permite calcular todas as quantidades de interesse: polaridade transmitida e intensidades refletidas, intensidades de campo, e a polarização. (215-231)

A maioria das aplicações em plasmônica até o momento compreende a interação da luz com as estruturas metálicas, seguido pela detecção da luz no mesmo comprimento de onda que é refletida ou dispersa nestas estruturas. (232) Acredita-se que é possível manter algumas das propriedades dos plasmons (como as fortes interações com a luz) com as características espectrais da fluorescência de macromoléculas. Isso é possível porque os campos próximos criados pelas ressonâncias de plasmons podem interagir com fluoróforos e servir como fonte de campos locais, por exemplo, ampliando a excitação. Além disso, os fluoróforos excitados podem interagir com o campo próximo nas estruturas plasmônicas, criando plasmons que então irradiam luz no espaço livre. (48,232) Na figura 12 mostramos os mecanismos de interação (diagrama de Jablonski modificado) com a presença de uma estrutura plasmônica nas proximidades de um fluoróforo.

Figura 12 - Emissão de plasmon controlada por fluorescência.
Fonte: LAKOVICZ (44)

A figura 12 representa todos os mecanismos possíveis de interação entre um fluoróforo e o meio, incluindo a presença de plasmons-polaritons, localizados em nanopartículas ou mesmo em nanoestruturas metálicas (denominados de metamateriais).

Vamos abordar apenas as possíveis interações que o fluoróforo pode ter com campos próximos gerados por plasmons-polaritons. Os fluoróforos no estado excitado podem sofrer interações de campo próximo com a superfície metálica criando plasmons de superfície, que por sua vez podem irradiar no campo distante (47, 63-66, 218), ou seja, a luz incidente induz oscilações de elétrons no metal e essas oscilações atuam como dipolos que podem irradiar luz com o mesmo espectro da fluorescência. (43-48,201-211) A indicação da cor azul na estrutura indica a excitação. A excitação pode ser feita de forma direta através da absorção de um ou mais fótons, caso haja a presença de nanopartículas metálicas. Estas podem absorver luz e criar um campo local que modifica o ambiente local do fluoróforo, caso este esteja muito próximo, modificando a taxa de absorção deste. No caso da presença de uma estrutura metálica, o campo de radiação incidente pode gerar plasmons-polaritons e estes transferem

energia para a molécula nas proximidades. Para a emissão o fluoróforo pode emitir diretamente um fóton (transição em verde) e ou transfereir energia para um modo plasmônico presente na nanosestrutura de forma não radiativa. Todos estes processos modificam o tempo de vida médio detectado do fluoróforo (como indicado na equação 4.4). Como veremos nos capítulos seguintes a nanoestrutura que utilizamos sobre um filme de prata é desenhada de forma a possuir bandas tanto para a transferência de energia na excitação do fluoróforo como também interfereir nos processos não radiativos de emissão.

5 METODOLOGIAS APLICADAS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Neste capítulo faremos a descrição dos procedimentos e técnicas experimentais que permitiram a obtenção das amostras de dsDNA e a caracterização destas através das técnicas ópticas de absorção, fluorescência e microscopia óptica confocal de fluorescência. Em particular a técnica de microscopia óptica confocal de fluorescência foi a técnica utilizada para o estudo da interação de SPP's com a solução de dsDNA, objeto principal desta dissertação. A extração do RNA viral foi feita pelo método manual com fenol saturado, e em seguida a transcrição para fita simples de DNA (*single strand DNA*, ssDNA) e posterior complemento para dsDNA, para sua amplificação por PCR.

5.1 Extração do RNA e amplificação do DNA por da técnica de RT-PCR

Foi utilizado o método de reação de transcriptase reversa em cadeia da polimerase (RT-PCR do inglês *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) para amplificar o segmento de DNA do vírus do mosaico amarelo da abobrinha (ZYMV do inglês *Zucchini Yellow Mosaic Virus*) a partir de folhas de cucurbitáceas infectadas. Os iniciadores (*primers*) de oligonucleotídeos desenhados para a RT-PCR, foram obtidos a partir do mapa genético do vírus da planta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As regiões do organismo que foram estudadas estão na área de inclusão nuclear (Nib de 300 pb) dos genes da proteína de revestimento (CP) a partir de um total produto de 1186 pb do ZYMV, que corresponde a este segmento genético. O produto amplificado da CP de 300 pb que foi obtido do ZYMV corresponde ao seguimento da região Nib. As amostras do vírus infectados foram fornecidas pela Faculdade de Zootecnia da USP (ESALQ-USP) e foram incubadas por seis anos em folhas secas, posteriormente reativadas em um viveiro de plantas. Então em seu estado cotiledonar, foram cultivadas por quatro semanas e colhidas folhas frescas infectadas.

A partir do tratamento de cultivo do vírus, nos termos acima descritos, foi realizada a extração das cepas virais do tecido fresco (figuras 13 a 17), a partir de trituração manual, com fenol saturado. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico: tampão de fosfato $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 8,1 \mu\text{mol/L}$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1,2 \mu\text{mol/L}$; tudo em $\text{pH} = 7,4$ e $5 \mu\text{L}$ a $0,1\%$ de Tween® em tampão fosfato e solução salina tamponada de $\text{NaCl} = 138 \mu\text{mol/L}$, $\text{KCl} = 2,7 \mu\text{mol/L}$, ambos em $\text{pH} = 7,4$. O RNA foi extraído por método manual descrito na literatura (201) partir de tecido foliar do material infectado (100 mg) foi triturado em 1 mL de tampão de fosfato de potássio $0,01 \text{ mol/L}$ $\text{pH} 7,5$ contendo $0,5\%$ de sulfito de sódio. O extrato foi

centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e incubado durante 30 minutos com 0,1% de sulfato de Dodecil de sódio e 50 pg/ml de proteinase K. O sobrenadante foi emulsionado uma vez com um volume igual de fenol saturado com Tris-HCl 0,1 M e pH=8,0. Uma vez com um volume igual de fenol, foi adicionado clorofórmio (na proporção 1:1) e álcool *n*-amílico (na proporção 24:1). O RNA foi precipitado a partir da fase aquosa pela adição de 0,1 v/v de acetato de sódio 3 mol/L, pH=5,2 e 2,5% de álcool isoamílico e posteriormente incubado a -20°C durante um mínimo de 3 horas.

Figura 13 - Plântulas de abobrinha de moita sadias germinadas em viveiro para controle das cepas virais
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 14 - Plântulas de abobrinha de moita em fase germinativa uma semana após a contaminação com as cepas virais. Observa-se o surgimento de “furos” na forma geométricas de mosaicos.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 15 - Folhas doentes colhidas 21 dias após contaminação com o vírus

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 16 - Cotilédones das plântulas com visíveis sinais da infecção pelo vírus ZYMV
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 17 - Cotilédones das plântulas infectadas pelo vírus ZYMV trituradas com tampão de fosfato para posterior extração do RNA com fenol saturado.
Fonte: Elaborada pelo autor

Os ácidos nucleicos precipitados foram centrifugados a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C, posteriormente foram lavados em solução de etanol a 70% e secos por evaporação a 4°C. O RNA foi então armazenado a -80°C por 50 dias, após esse período o sedimento foi re-suspenso em 10 µL de água destilada estéril para realização da RT-PCR.

A RT-PCR foi realizada com um kit GeneAmp RNA PCR (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk) para amplificar as regiões do gene NIB, de acordo com as instruções do fabricante, a partir do RNA extraído pelo método descrito acima. O kit realiza a transcrição da fita de RNA para uma fita dupla de DNA e posteriormente na mesma solução realiza no termociclador a PCR. Dois *primers* foram construídos a partir de seqüências conservadas dos genes NIB da CP

de ZYMV. As seqüências dos *primers* são apresentadas na tabela 1. Inicialmente foi realizada a RT a 42°C durante 15 minutos utilizando 2,5 U/pL de transcriptase reversa. A mistura reacional foi subsequente desnaturalizada a 95°C durante 5 min e colocada a 5°C. Em seguida nos mesmos *Eppendorfs* no termociclador, a PCR otimizada foi feita com pares de iniciadores ZY-1 e ZY-3 (amostras de A-1 a A-5) e posteriormente ZY-1 e ZY-2 (Amostras de A-6 a A-10). As condições para a PCR foram: dois minutos a 94°C seguidas de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C e um minuto a 72°C, seguido por dez minutos de incubação a 72°C e arrefecimento a 4°C.

Tabela 1 - Seqüência dos *primers* utilizados na RT-PCR

Primers	seqüência
(ZY-1)	5'-CACAATTTICCCATGAGAACCAGC-3'
(ZY-2)	5'-GCTCCATACATAGCTGAGACAGC-3'
(ZY-3)	5'-TAGGCTTGCAAACGGAGTCTAATC-3'

Fonte: Elaborada pelo autor

Após a extração e realização da RT-PCR o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose, técnica padrão para separação do DNA por tamanho (por exemplo, comprimento em pares de bases). Para a visualização foi utilizado um corante (SYBER®-safe DNA gel) com capacidade para marcar moléculas de até 1 Kb. A eletroforese utiliza um campo elétrico para mover o DNA carregado negativamente através de uma matriz de gel de agarose em direção a eletrodo positivo. Os fragmentos de DNA menores migram através do gel mais rapidamente do que os maiores. Assim pode se determinar o comprimento aproximado de um fragmento de DNA comparando-o com um padrão, em pb, ou em peso (kDa). Os dados de peso molecular das moléculas de ds DNA em determinadas regiões do mapa genético do organismo são obtidos no do banco internacional de dados genômicos NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*- NCBI) disponível em: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

No caso do fragmento do ZYMV, foi utilizado uma seqüência de 300 pb, como descrito acima da região do NIB. O produto final da RT-PCR foi quantificado utilizando um NANODROP®, obtendo-se um rendimento médio perto de 1482 ng/μL. A figura 18 apresenta o resultado da eletroforese da RT-PCR com a amostra de DNA final de 300 pb nos *Eppendorfs* de 100 μL obtidos da concentração final das medidas no NANODROP®. A Eletroforese detecta opticamente as moléculas de DNA marcadas e excitadas com um comprimento de onda de 450 nm, apresentando fluorescência em torno de 560 nm.

A tabela 2 apresenta as medidas obtidas no NANODROP® para as dez amostras resultantes do processo de amplificação descritas como amostras de 1 a 10 (A-1 à A-10) conforme ilustradas no produto final da RT-PCR referidas na figura 18.

Tabela 2 - Medidas das concentrações em massa (ng/μL) e relação de absorção em fração $A_{260/280}$ para as dez amostras obtidas no produto final da amplificação por RT-PCR.

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10
Conc.	1483,4	1478,4	1478,8	1495,1	1285,4	2304,4	1634,6	1543,3	1390,2	1517,6
A_{280}	44,951	44,799	44,691	45,302	38,951	69,830	49,857	46,412	42,127	45,989
A_{260}	27,593	26,747	27,296	27,430	23,349	40,116	28,074	27,379	24,143	25,993
$A_{260/280}$	1,63	1,64	1,63	1,75	1,67	1,74	1,76	1,74	1,74	1,77
$A_{260/230}$	1,41	1,51	1,43	1,46	1,46	1,69	1,62	1,46	1,45	1,63

Fonte: Elaborada pelo autor

Em seguida na tabela 3 apresentamos os resultados da quantificação com o NANODROP® para diluições da amostra A-3 (D-1 à D-4), e uma diluição para amostra A-5 (D-1). Nesta tabela pode-se verificar também a fração $A_{260/280}$ para ambas as amostras e diluições.

Figura 18 - Imagem obtida da Eletroforese em gel de agarose. As bandas indicadas na parte superior são derivadas da combinação dos pares de primers 1 e 3. As bandas na parte inferior são derivadas da combinação dos primers 1 e 2. A escala em kDa foi obtida com a calibração feita com o Marcador (M)

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 3 - Medidas das concentrações em massa (ng/ μ L) e razão $A_{260/280}$ para as diluições das amostras 3 (D-1 à D-4), 5 (D-1), e 2 (D-1) obtidas do produto final da amplificação por RT-PCR, nessa tabela foram obtidas as concentrações em massa e o grau de pureza das concentrações iniciais reportadas na tabela 2, diluídas no fator 2.

	D-1 (A-3)	D-2 (A-3)	D-3 (A-3)	D-4 (A-3)	D-1 (A-5)	D-1 (A-2)
Conc.	50,30	17,80	8,10	5,00	237,00	222,00
A_{280}	1,00	1,00	0,36	0,10	4,74	4,68
A_{260}	0,59	0,38	0,34	0,06	2,74	2,80
$A_{260/280}$	1,69	1,70	1,86	1,65	1,73	1,71

Fonte: Elaborada pelo autor

O valor de $A_{260/280}$ indicado nas tabelas anteriores, correspondente à razão entre a absorção em 260 e 280 nm, o que corresponde ao máximo de absorção para moléculas de DNA e de proteínas respectivamente. Esta razão permite quantificar a pureza das amostras quanto ao material genético. Para a razão média obtida de 1,71 permite-nos inferir que as amostras obtidas pela metodologia apresentada têm em média 85% de pureza para moléculas de dsDNA.

5.2 Caracterização Óptica das amostras de dsDNA: Absorção e Fluorescência

O objetivo do trabalho é o estudo da interação óptica entre moléculas de dsDNA com SPP's confinados em nanoestruturas fabricadas em filmas metálicos. Numa etapa anterior ao estudo realizamos uma caracterização prévia da atividade óptica das soluções que foram obtidas a partir das técnicas de absorção e fluorescência. A quantificação obtida pelo NANODROP® é basicamente uma medida de absorção óptica, que permite quantificar a pureza da solução e identificar a presença de proteína. A figura 19 apresenta um exemplo de resultado da quantificação em massa no NANODROP, cuja curva reportada corresponde a uma concentração de 237 ng/ μ L.

Figura 19 - Cópia da tela do NANODROP® para a solução D1 que representa basicamente a absorção da solução padronizada para uma gota de solução de aproximadamente 1 µL.

Fonte: Elaborada pelo autor

Como quantificação inicial e rápida esta técnica é muito útil, porém não tem muita sensibilidade para regiões onde a absorção é pequena (abaixo de 0,01). É importante determinar e quantificar o espalhamento da luz na região do UV, já que para medidas com o microscópio confocal, este efeito é considerável para a resolução final da imagem. Para a realização de medidas de absorção mais precisas utilizamos um espectrômetro Varian-Cary UV-VIS 50 BIO. As curvas de absorção para as quatro diluições para amostra 3 (A3 de D-1 à D4, vide tabela 3) estão apresentadas na figura 20 (a) e são típicas da absorção de soluções de alta pureza de DNA e estão plenamente de acordo com os resultados obtidos anteriormente. O espectro apresentado na figura 20 (b) apresenta com detalhes a curva de absorção da amostra com 50 ng/µL. Entre 350 e 500nm é possível verificar a influência da contribuição do espalhamento no espectro de absorção (curva tracejada).

Figura 20 - Curvas de absorvância da amostra 3 para várias diluições (D-1 a D4). (b) apresenta o detalhe da absorvância da diluição de 50 ng/mL (D-1) em escala logaritmica, com uma longa extensão que ultrapassa 500nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

Mesmo pequena a absorção da molécula pode ser mensurada na região de 400nm, comprimento de onda que será utilizado para a caracterização microscópica da solução na presença de SPP's.

Na seqüência foram realizadas medidas de fluorescência com fluorímetro Shimadzu RF-5301PC. Para o estudo da emissão, das mesmas soluções que foram utilizadas nas

medidas de absorção, as amostras foram excitadas em 260nm e os espectros de emissão obtidos entre 265 e 700nm e são representados na figura 21. Nos espectros da figura 21 (a) observa-se a atividade óptica de emissão detectável pelo instrumento entre 270 e 400nm. Acima de 500nm observam-se a segunda ordem da difração da excitação (em torno de 520 nm) e a segunda ordem da fluorescência entre 550 e 700nm. No espectro da figura 21 (b) apresentamos com detalhes a região entre 400 e 500nm, onde se observa a fraca atividade óptica, como já era esperado para soluções puras de dsDNA.

Figura 21 - (a) Curvas de fluorescência com excitação em 260nm para as diluições da amostra 3. (b) Detalhes da fluorescência entre 400 e 500nm

Fonte: Elaborada pelo autor

Para a detecção de soluções não marcadas de dsDNA é necessário realização análises nas regiões do UVC (320-400nm) e UVB (280-320nm) usando excitação no UVA ($<280\text{nm}$). O uso de marcadores é necessário, como já mencionamos anteriormente para tornar a detecção no visível (em torno de 550nm).

5.3 Microscopia Óptica Confocal de Fluorescência

Para a caracterização da fluorescência em micro-escala utilizamos um microscópio óptico confocal Zeiss LSM 780 (vide figura 22) com resolução espacial em torno de 300 nm. Utilizados para a excitação das soluções os lasers de 405nm (com potencia nominal fixada em 6mW para todas os estudos realizados) e o laser Chameleon COHRENT para excitação com dois fótons (com a potencia nominal fixada em 10mW para todos os estudos realizados). Em todos os estudos realizados utilizamos a objetiva de 20x e o ganho da detecção foi mantido o mesmo em todas as imagens. As imagens foram sempre obtidas sobre um filme de Prata de 200nm de espessura depositado sobre um vidro Borofloat 33 - Schott, sem atividade óptica nas regiões espectrais estudadas. Uma gota de 1 μL de solução é depositada sobre o filme e as imagens são obtidas com a solução líquida. A solução permanece líquida por um período de aproximadamente 1 hora.

Figura 22 - Microscópio confocal Zeiss LSM 800 utilizado no estudo instalado no Instituto de Física de São Carlos - USP

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 23 - Imagens espectrais obtidas na mesma região limítrofe (borda) de uma gota com 1 μL da solução D-1(A-5) com concentração de 237 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para diferentes comprimentos de onda e depositada sobre um filme de prata de 200nm de espessura. (a) excitação com um fóton - laser de 405 nm (b) excitação com dois fótons - laser em 760 nm (c) excitação com dois fótons - laser em 800 nm (d) excitação com dois fótons - laser em 850nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na figura 23 são apresentadas imagens espectrais obtidas com o microscópio confocal na mesma região limítrofe (borda) de uma gota com 1 μL da solução D-1(A-5) com concentração de 237 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para diferentes comprimentos de onda depositada sobre um filme de prata de 200nm de espessura. A excitação na região de 400nm (3 eV) pode ser feita tanto pela absorção de um fóton quanto pela absorção simultânea de dois fótons. A espectroscopia de dois fótons é muito utilizada para soluções com moléculas orgânicas pelo fato de que neste comprimento de onda o espalhamento de luz é praticamente nulo o que aumenta

consideravelmente a resolução espacial da imagem, como podemos perceber pelas imagens (b), (c) e (d), onde percebemos na borda, devido à espessura da camada de solução, franjas de interferência. Além disto, como já discutido no capítulo 2, a excitação somente ocorre no ponto focal do laser devido à intensidade necessária para a excitação com dois fótons. Em nosso trabalho a excitação com dois fótons é utilizada, para além de fazer a excitação das moléculas, gerar os SPP's nas nanoestruturas que são fabricadas sobre os filmes metálicos. As nanoestruturas são projetadas para que tenham ressonâncias nesta região, tanto na região de 800nm (excitação) como na região de detecção (450-600nm). Abaixo de 450nm há a excitação de plasmons de "bulk" para a Prata.

Figura 24 - Decomposição espectral das regiões indicadas na figura 23 pelo círculo branco.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na figura 24 apresentamos a decomposição espectral da região das imagens da figura 23 indicadas com um círculo branco. A eficiência da excitação é máxima para os comprimentos de onda de 405 nm ($3,06\text{eV}$) e 760 nm ($1,63\text{ eV} : 2x = 3,26\text{eV}$). Para a excitação em 850 nm ($1,45\text{ eV} : 2x = 2,9\text{ eV}$) a eficiência da emissão é muito pequena, ou seja, a energia resultante pela absorção dos dois fótons já não é suficiente para a excitação da molécula. Observa-se para a excitação com o laser de 405 nm que a curva de fluorescência

tem um comportamento muito similar ao observado nos gráficos na figura 20. Já para a excitação com dois fótons pode se observar componentes espectrais na região de 560nm. Para a amostra utilizada (concentração de 237 ng/ μ L) as moléculas estão mais próximas uma das outras o que ocasiona a formação de agregados devido à interação dipolar entre estas. Com a formação destes agregados há transferência de energia entre moléculas vizinhas, fazendo com que a recombinação ocorra já no fundo do estado singlete excitado. A verificação deste efeito pode ser observada nas imagens da figura 25, realizada com a amostra com 1478 ng/ μ L.

Figura 25 - Imagens espectrais obtidas na mesma região limítrofe (borda) de uma gota com 1 μ L da solução A3 com concentração com concentração de 1478 ng/ μ L para diferentes comprimentos de onda de excitação depositada sobre um filme de prata de 200nm de espessura. (a) um fóton - laser de 405 nm (b) com dois fótons laser em 800 nm

Fonte: Elaborada pelo autor

A decomposição espectral das imagens da figura 25 (espectros representados na figura 26) mostra claramente a definição da emissão em torno de 560 nm, com a excitação com dois fótons. Na imagem espectral com dois fótons é possível diferenciar os aglomerados (pequenos pontos em verde com tamanho da ordem de 300nm na superfície do filme metálico). Na figura 27 mostramos as imagens espectrais e a decomposição para uma solução diluída a 8 ng/ μ L, mostrando a baixa eficiência de excitação com dois fótons e o desaparecimento da emissão atribuída a transferência de energia entre os aglomerados de moléculas de dsDNA. A alta concentração de macromoléculas de dsDNA favorece a interação entre estas e a formação de aglomerados e a transferência de energia para estados de mais baixa energia, posterior a recombinação. Os resultados sugerem que estes estados são mais facilmente acessados com o

uso de excitação por dois fótons ao invés da excitação direta com um fóton. Como veremos no capítulo seguinte a formação destes aglomerados faz com que o tempo de vida médio de macromoléculas livres de dsDNA apresentem um decréscimo considerável do que é esperado. Outra evidência do uso da excitação com dois fótons é a sua baixa eficiência para soluções com baixas concentrações de dsDNA, como mostramos nos resultados apresentados na figura 27.

Mesmo sem a utilização de marcadores o microscópio confocal tem sensibilidade para detectar a fluorescência da amostra acima de 450nm (estados de mais baixa energia do primeiro estado singlete excitado). A transferência de energia entre moléculas próximas é mais pronunciada para a excitação com dois fótons muito provavelmente devido à intensidade do laser no infravermelho que opera no modo pulsado.

Figura 26 - Decomposição espectral das regiões indicadas na figura 25 pelo círculo branco.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 27 - Imagens espectrais obtidas na mesma região limítrofe (borda) de uma gota com $1\ \mu\text{L}$ da solução 3(A3) com concentração de $8\ \text{ng}/\mu\text{L}$ para diferentes comprimentos de onda de excitação depositada sobre um filme de prata de 200nm de espessura (a) excitação com um fóton - laser de $405\ \text{nm}$ (b) com dois fótons laser em $800\ \text{nm}$; (c) Decomposição espectral das regiões indicadas pelo círculo branco em (a) e (b)

Fonte: Elaborada pelo autor

6 INTERAÇÃO DE PLASMON-POLARITONS COM MOLÉCULAS DE dsDNA

Neste capítulo serão apresentados e analisados os resultados obtidos do estudo da interação de SPP's com moléculas de dsDNA obtidas e caracterizadas com a metodologia descrita no capítulo anterior.

Para estudar a interação dos SPP's com as moléculas foram utilizadas nanoestruturas planares fabricadas sobre um filme de prata cuja descrição esta no primeiro tópico deste capítulo. Nos dois tópicos seguintes deste capítulo fizemos um estudo com o microscópio confocal utilizando a seguinte metodologia: ETAPA 1 - imagens espectrais ou de tempo de vida (com um e dois fótons) são realizadas na nanoestrutura plasmônica sem nenhuma solução (identificamos estas como interface Prata/Ar); ETAPA 2 - imagens espectrais ou de tempo de vida (com um e dois fótons) são realizadas na nanoestrutura plasmônica com 1 μ L de água deionizada depositada sobre a região onde se encontra a nanoestrutura (identificamos estas como interface Prata/H₂O); ETAPA 3 - Após a secagem completa da água deionizada (etapa 2) uma gota com 1 μ L com solução de dsDNA é colocada na mesma região para a realização de imagens espectrais e de tempo de vida (identificamos esta como interface Prata/H₂O+solução).

6.1 Nanoestruturas Plasmônicas

Para o estudo da interação de plasmon-polaritons com moléculas de dsDNA foram utilizadas nanoestruturas metálicas fabricadas sobre um filme de prata de 200nm depositado sobre um vidro Borofloat 33 (índice de refração em torno de 1,45 na região de estudo de 450 a 850nm). As nanoestruturas foram fabricadas com a técnica de litografia por feixe de íons (106), utilizado um microscópio modelo FEI Quanta 3D 200i, e que consistem de arranjos concêntricos de anéis com diâmetros de até 20 μ m, de largura 50nm e separados por 400nm. Na figura 28 (a) e (b) são mostradas imagens de microscopia eletrônica de varredura da estrutura utilizada. Antes da realização das etapas descritas no início, a nanoestrutura é caracterizada previamente usando um microscópio óptico (Olympus BX 61W1), onde é observada as características desta em campo escuro. Para atuar como uma estrutura plasmônica é necessária que esta apresente transmissão de luz (transmissão de luz extraordinária) e efeito da polarização na transmissão. Nas figuras 28 (c) e (d) não há transmissão de luz quando a polarização é paralela (modo transversal elétrico) à fenda.

Figura 28 - Imagens de MEV da nanoestrutura plasmônica (a) e (b). As imagens mostradas em (c) e (d) são imagens de campo escuro da nanoestrutura plasmônica (transmissão óptica extraordinária) com: (c) polarização horizontal, em (d) polarização vertical.

Fonte: Elaborada pelo autor

Esta estrutura em particular foi escolhida porque simulações indicam que há um pico de transmissão extraordinária na região da excitação por dois fótons (entre 760 e 850nm) como demonstram simulações realizadas (116). Na figura 29 mostramos os espectros de transmissão óptica extraordinária da nanoestrutura plasmônica obtidos a partir do software LUMERICAL. As simulações foram realizadas com as interfaces Prata/Ar e Prata/H₂O para quantificar a influência da mudança de meio (índice de refração ar=1 e água=1,33) na geração de SPP's. O formato da curva de transmissão permanece praticamente o mesmo com o

aumento da banda entre 400-550nm e um pequeno deslocamento da transmissão no infravermelho próximo.

Figura 29 - Espectro da transmissão óptica extraordinária obtida através do programa Lumerical para a estrutura da utilizada no estudo.

Fonte: Elaborada pelo autor

Nas regiões onde há transmissão óptica extraordinária o campo eletromagnético, polarizado perpendicularmente às fendas, é capaz de gerar SPP's. As estruturas circulares além de apresentarem modos nas regiões de interesse (na excitação - 800nm - como na

recombinação - 450 a 550nm) e com a vantagem que não depende de uma direção preferencial de polarização. Observe que para comprimentos de onda nas proximidades de 400 nm não há a geração de plasmons na estrutura.

6.2 Comportamento espectral da fluorescência na região da estrutura plasmônica

Quando iluminada pelo laser de excitação com dois fótons SPP's são formados na nanoestrutura e podem interagir com as macromoléculas que estão nas proximidades da superfície até distâncias em torno de 300 nm (extensão do campo evanescente). Os mecanismos prováveis se baseiam em processos de excitação das moléculas pelos SPP's que podem decair em outros SPP's (independentes dos SPP's de excitação). Este novo canal de decaimento faz com que haja um decréscimo no tempo de vida e conseqüente aumento na intensidade de fluorescência. Quanto mais próxima da superfície estiver a macromolécula maior o acoplamento desta com os modos de SPP's, o que observamos como "acoplamento plasmon-fluorescente". Pois os efeitos plasmônicos se acoplam com a fluorescência das macromoléculas, gerando uma irradiação resultante desse acoplamento. O estudo da interação com os SPP's foi realizado seguindo as etapas indicadas no início deste capítulo. A imagem com a excitação de um fóton foi feita com o laser de 405 nm e com dois fótons nos comprimentos de onda de 760nm, 800nm e 850nm. Os resultados do estudo foram realizados com a solução D-1(A-5) com 237 ng/ μ L por ser uma concentração em que ainda há moléculas de dsDNA livres e também com aglomerados.

Na figura 30 (a-c) são apresentadas as imagens espectrais para excitação com um fóton (laser em 405 nm) e com dois fótons (laser em 760, 800 e 850 nm). Na figura 31 mostramos a dependência espectral (coletada na região da nanoestrutura) respectivamente das imagens da figura 30.

Na figura 30 são apresentadas as imagens para a interface Prata/Ar. Para a excitação com um fóton o que é observado corresponde basicamente ao espalhamento da luz do laser sobre a nanoestrutura. Para as excitações com dois fótons (760, 800 e 850 nm) foi observada uma luminescência natural da estrutura, que segue a polarização original do laser (horizontal) e cujo espectro se estende por toda a região de detecção do microscópio (400 a 700nm). A luminescência de uma estrutura plasmônica é um fenômeno que ainda não foi reportado na literatura e foi observado inicialmente por Silva (9). Uma possível explicação para o

fenômeno responsável por esta luminescência é a excitação de elétrons da banda de Valência (d) da prata para a banda de condução (sp). A excitação eletrônica decai então num SPP na nanoestrutura que acaba gerando fótons detectados pelo microscópio. A transição entre elétrons na banda 3d para 4s são permitidas somente para absorção de dois fótons o que explica a não observação com a excitação por um fóton. Os pontos em cor vermelha nas estruturas são provavelmente plasmons localizados nas pequenas imperfeições que são geradas na estrutura durante o processo de fabricação através de litografia por feixe e íons. Os espectros ópticos com excitação com dois fótons são praticamente os mesmos para todos os comprimentos de onda utilizados. Para a excitação com 760 nm o corte acima de 650 nm (no espectro (figura 31) é devido ao filtro necessário para o bloqueio da luz proveniente do laser).

Figura 30 - Imagens espectrais da nanoestrutura plasmônica com diferentes comprimentos de onda de excitação para a interface Prata/Ar (a) excitação com um fóton em 405nm, (b) excitação com dois fótons em 760nm, (c) excitação com dois fótons em 800nm e (d) excitação com dois fótons de 850nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

Após a obtenção das imagens para a interface Prata/Ar uma gota de 1 μL com solução de dsDNA é depositada sobre a região da nanoestrutura e novas imagens foram realizadas com os mesmos parâmetros e estão indicadas na figura 28 (representadas na figura 32). O foco do laser de excitação é feito na superfície do filme. Como sempre foi utilizada a objetiva de 20x a altura da gota não chega a ficar em contato com a lente, fato este que pode causar perda na intensidade que incide na nanoestrutura e também na intensidade coletada. Com uma simples inspeção visual na figura 32, é possível verificar a mudança com relação às imagens realizadas sem a presença da solução (da figura 30). A polarização característica da estrutura plasmônica é mantida, evidenciado que o laser de excitação para dois fótons continua gerando SPP's.

Figura 31 - Decomposição espectral das imagens na região das nanoestruturas plasmônicas da figura 30.

Fonte: Elaborada pelo autor

A imagem para um fóton, como era de se esperar, tem pouca nitidez devido ao espalhamento do laser ultravioleta. É possível notar também, para a excitação com dois fótons, que fora da região das nanoestruturas há um sinal pequeno devido a interação

direta do laser com as moléculas nas proximidades, muito menor em comparação com a luminescência observada na nanoestrutura. Os espectros da figura 31 representam a decomposição espectral das imagens na região da nanoestrutura. Para a excitação com um fóton o sinal observado é basicamente devido ao espalhamento do laser. Para a excitação com dois fótons é observado nos gráficos um incremento substancial de intensidade para componentes espectrais de menor comprimento de onda (<550 nm), mostrando a ação direta da interação do SPP's com as moléculas de dsDNA. Para o laser de excitação em 850 nm a intensidade do sinal é mais que 10 vezes menor que as excitações com 760 e 800nm. Isto não acontece para a interface Prata/Ar (figura 30), sendo mais uma evidência direta da interação dos SPP's com o dsDNA já que como mostramos no capítulo anterior, para comprimentos maiores que 850 nm a energia somada dos dois fótons tem pouca eficiência na excitação das macromoléculas. Para componentes espectrais acima de 475 nm há uma queda no sinal, que pode ser também uma evidência detecção de aglomerados a partir da estrutura plasmônica.

Figura 32 - Imagens espectrais da nanoestrutura plasmônica com diferentes comprimentos de onda de excitação para a interface Prata/ H_2O +solução (solução utilizada foi a de concentração D-1(A-5) com 237 ng/ μ L). (a) excitação com um fóton em 405nm, (b) excitação com dois fótons em 760nm, (c) excitação com dois fótons em 800nm e (d) excitação com dois fótons de 850nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

Considerando as excitações em 760 e 800 nm a razão entre os sinais na região da nanoestrutura e fora desta é cerca de duas ordens de grandeza maior, ou seja, um incremento na intensidade de 100 vezes devido a presença dos SPP's. Outra característica para estas duas excitações é o fato das imagens não evidenciarem tanto a presença das imperfeições de fabricação como nas imagens com a mesma excitação da figura 32. Esta é outra evidência da presença de moléculas nas proximidades da superfície da nanoestrutura.

Figura 33 - Decomposição espectral das imagens na região das nanoestruturas plasmônicas da figura 32.

Fonte: Elaborada pelo autor

A quantificação da influência da água nas propriedades das imagens obtidas no estudo foi realizada seguindo o mesmo procedimento. Na figura 34 são apresentados os resultados deste estudo para a excitação com o comprimento de onda de 800 nm. Como observado através das simulações (figura 29) a presença da água tem uma pequena influência na curva de transmissão extraordinária, com um incremento de componentes espectrais na região entre 400 e 550 nm. A imagem da nanoestrutura com a água (figura 34 b) apresenta componentes de comprimento de onda nesta região quando comparadas com a imagem na interface Prata/ar (figura 34 (a)). Na sequência a figura 35 mostra a decomposição espectral das imagens da figura 34. Os processos de geração de luminescência pela própria estrutura devido à absorção de dois fótons (ou dois plasmons como aqui foi proposto) pelo metal é um processo novo e ainda não estudado na literatura e merece um estudo mais aprofundado para determinar a sua real contribuição no incremento da luminescência observado para as moléculas de dsDNA. Pela própria natureza dos processos estes são independentes e neste caso a luminescência da estrutura pode ser considerada como um "background" natural do sinal detectado na presença de macromoléculas.

Figura 34 - Imagem espectral da amostra com diluição de $230\text{ng}/\mu\text{L}$, usando laser de 800nm , em (a) interface prata com ar, em (b) interface prata com água, em (c) interface prata com amostra de dsDNA, D-1 de $237\text{ng}/\mu\text{L}$

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 35 - Deconvolução espectral da amostra 2 diluição de 237ng/ μ L (figura 34 anterior), usando laser de 800nm, interface prata com ar, interface prata com água, e interface prata com amostra de dsDNA na água.

Fonte: Elaborada pelo autor

6.3 Decaimento temporal da fluorescência do dsDNA na presença de Plasmons-Polaritons

O estudo do tempo de vida de emissão visa corroborar a influência dos SPPs, como observado no acréscimo da luminescência na presença da nanoestrutura, devido ao decréscimo do tempo de vida associado, característico da interação entre o SPP e o fluoróforo. O efeito plasmônico nas moléculas diminui o tempo de vida do estado excitado, aumentando assim a intensidade de fluorescência, ou seja, uma estrutura plasmônica diminui o tempo de vida detectado da molécula de DNA e em consequência aumenta a resposta de luminescência. Os tempos de decaimento obtidos para o DNA sobre as nanofendas circulares de prata são menores do que os tempos de decaimento obtidos para o DNA depositado na superfície sem a nanoestrutura. O microscópio confocal permite fazer a aquisição do tempo de vida radiativo da fluorescência (e imagens pela técnica de FLIM - *Fluorescence Lifetime Image Mapping*), em até duas faixas espectrais filtradas com resolução temporal em torno de 50 ps. As faixas espectrais escolhidas para o estudo são as indicadas no espectro da figura 36 ($450\text{nm} \pm 20\text{nm}$,

e 550nm $\pm$ 20nm). A figura 36 apresenta um espectro da imagem na região demarcada pelo círculo branco, para a emissão das duas bandas, uma em 450nm nos canais 1 e 2 respectivamente. Nesta solução observa-se a formação de aglomerados, porém ainda há moléculas livres.

Figura 36 - Espectro da solução D-1 (237 ng/μL), usando excitação com dois fótons - laser em 800nm, obtido da imagem espectral indicada no canto do espectro. As regiões em azul (450nm - canal 1) e verde (550nm - canal 2) indicam as regiões utilizadas para a coleta da imagem de tempo de vida.

Fonte: Elaborada pelo autor

As imagens de tempo de vida médio (FLIM) da mesma região espectral da figura 36 estão indicadas na figura 37 para os canais 1 e 2. É possível observar uma distribuição de tempos de vida radiativo de 50 ps até tempos que chegam a 9 ns. A taxa de emissão de fluorescência para macromoléculas de dsDNA é da ordem de 10^{-8} s^{-1} , ou seja, tempos de vida radiativos em torno de 10 ns (43) o que está de acordo com o observado. O surgimento de tempos menores está relacionado com a formação de aglomerados e a migração da excitação (relaxação não radiativa) para estados de mais baixa energia pela troca ressonante entre moléculas próximas, fazendo com que haja um canal adicional relaxação não radiativas. Não é nosso objetivo aprofundar nesta direção e sim observar a emissão das macromoléculas na

solução D-1 como referencia para a verificação do comportamento na região da nanoestrutura plasmônica.

Figura 37 - Imagens de tempo de vida médio da mesma região indicada na imagem espectral da figura 36. (a) Imagem de tempo de vida médio (FLIM) para o canal 1. (b) Imagem de tempo de vida médio (FLIM) para o canal 2. (c) Distribuição de tempos de vida médio das imagens (a) e (b).
Fonte: Elaborada pelo autor

O estudo do tempo de vida na região da nanoestrutura plasmônica foi obtido após a realização das imagens pela técnica FLIM indicadas na figura 38 (quanto mais azul mais rápido o tempo de vida médio observado) e de acordo com a metodologia descrita no início deste capítulo. Na nanoestrutura o tempo de vida de fluorescência do dsDNA é menor devido a interação do DNA com os SPP's, ou seja, o surgimento de um novo canal não radiativo. A molécula pode emitir um plasmon ou um fóton, quando excitada. Grande parte da energia da molécula vai para excitação do plasmon na nanoestrutura, ocasionando um decrescimento do

tempo de vida. Apenas as moléculas que decaem radiativamente, fazendo com que o tempo de vida diminua.

Figura 38 - Imagem de tempo de vida (FLIM) da estrutura plasmônica. (a) e (b) para a interface Prata/ar; (c) e (d) para a interface Prata/H₂O; e (e) e (f) para a interface Prata/H₂O+dsDNA (amostra D-1).

Fonte: Elaborada pelo autor

Na figura 38 são apresentadas as imagens de tempo de vida médio (FLIM) na região da nanoestrutura para as três interfaces. É notável o decréscimo do tempo de vida para as regiões espectrais correspondente aos canais 1 e 2 quando comparamos com a distribuição de tempos de vida da mesma amostra na região sem estrutura (figura 37). O incremento na intensidade da fluorescência nas regiões espectrais 1 e 2 (vide figuras 34 e 35) está em acordo com o decréscimo observado no tempo de vida. Quando comparado com o tempo de vida da solução, mostrado no gráfico da figura 38 (e) e (f), o decréscimo na distribuição de tempos é muito significativo em ambos os canais. Diferente do comportamento espectral os resultados para as interfaces Prata/Ar e Prata/H₂O são similares o que corrobora a conclusão anterior de que o água apenas modifica a posição da ressonância plasmônica da nanoestrutura. Porém de acordo com o modelo proposto para a luminescência da estrutura plasmônica a radiação incidente (800nm) gera um plasmon na estrutura que é absorvido em parte pelo metal decaindo novamente em plasmon na estrutura e que cuja energia é novamente reemitida em luz e coletada pela objetiva. Este plasmon pode ser absorvido pelas moléculas na proximidade também. Os tempos relativos a este processo devem ser da ordem de algumas dezenas de ps. Os tempos registrados no canal 2 são da ordem de 300 ps, porém no canal 1 estes são em torno de 840 ps, ambos maiores que os tempos com a solução com DNA que são no canal 1 de 320 ps e no canal 2 de 160 ps (próximo a resolução temporal do sistema). Os plasmons gerados pelo decaimento da excitação no metal e na macromolécula não devem ter nenhum tipo de correlação porque são processos independentes.

Ambos os resultados observados na análise espectral e temporal indicam que o DNA interage com plasmons gerados na nanoestrutura na excitação com dois fótons, ou seja, o acréscimo na intensidade de luminescência e o decréscimo no tempo de vida.

Figura 39 - Distribuição de tempo de vida médio para as imagens da figura 38. (a) canal 1 as três interfaces, (b) canal 2 para as três interfaces.

Fonte: Elaborada pelo autor

7 CONCLUSÕES

A proposta inicial do trabalho foi a de estudar a influência de plasmons-polárítos de superfície localizados em nanoestruturas metálicas na fluorescência de moléculas de DNA sem a utilização de marcadores. Como mostramos no capítulo 5 a intensidade de emissão de moléculas de DNA é significativa na região do UVB (300 nm) e pouco significativa para a região visível (550nm), fazendo com que o desenvolvimento de biossensores baseados na fluorescência seja ainda pouco desenvolvido sem a marcação prévia da molécula com fluoróforos que se ligam a esta e com emissão na região visível.

Nossa abordagem consistiu em utilizar uma nanoestrutura fabricada sobre um filme de prata, que já foi estudada e caracterizada em trabalhos anteriores (9, 118), para aumentar a eficiência da emissão devido à interação de plasmon confinados na nanoestrutura com moléculas na proximidade. Os efeitos dos campos plasmônicos sobre a molécula são significativos e foram observados pela diminuição do tempo de vida e o aumento da fluorescência a partir da excitação com dois fótons, metodologia ainda pouco estudada na literatura. Com radiação em 405 nm as moléculas excitadas podem emitir fótons e plasmons, porém neste comprimento de onda a nanoestrutura não gera, ou seja, a excitação é puramente fotônica, porém o decaimento por ser não radiativo através da geração de plasmons, observado-se um *quenching* na intensidade de luminescência. Já para a excitação com dois fótons (800nm) o campo eletromagnético do laser gera plasmons-polaritons de superfície na nanoestrutura parte absorvidos pelo próprio metal e parte responsável pelo processo de absorção de dois fótons ("plasmons"), sendo que o processo de decaimento segue o mesmo canal que o da excitação com um fóton.

O fato de o metal absorver energia e luminescer na região da estrutura plasmônica, na região da emissão do DNA, é um resultado que merece ser mais explorado e caracterizado. Talvez se forem utilizados outros tipos de metal este efeito possa vir a ser menos intenso na região de interesse. O Ouro não é um bom candidato porque o plasmon de bulk é na região onde o DNA tem sua atividade óptica no visível (520nm). A prata que foi utilizada é uma boa candidata, mas como vimos apresenta uma forte luminescência na região de interesse. O alumínio pode ser uma opção para uso em biossensores para DNA já que tem uma estrutura de banda diferente da de metais nobres e seu plasmon de bulk é acima de 5 eV.

Em resumo a proposta inicial do trabalho foi realizada sendo observando o aumento da intensidade de luminescência e decréscimo do tempo de vida de transições ópticas de moléculas de DNA na presença de plasmon-polaritons de superfície gerados em filmes

metálicos nanoestruturados denominados na literatura como metamateriais, diferente da abordagem que se vem realizando na literatura com o uso de nanopartículas metálicas.

8 TRABALHOS FUTUROS

Dos resultados obtidos e analisados surgem idéias que podem evoluir em trabalhos na mesma linha de pesquisa. Elencamos abaixo algumas idéias factíveis de serem implementadas:

- 1 - Realizar o mesmo estudo com nanoestruturas plasmônicas com diferentes geometrias e diferentes materiais. Otimizar o processo para a molécula específica que se pretende estudar.
- 2 - Estudar os processos de agregação de moléculas como função da concentração e sua influência nas propriedades ópticas. Este item é interessante para a excitação com dois fótons na presença ou não de uma estrutura plasmônica já que ainda é muito pouco explorado na literatura.
- 3 - Estudar os processos de luminescência de uma nanoestrutura plasmônica. Os mecanismos de transições ópticas em metais muito pouco eficientes (não observamos nenhuma luminescência na superfície metálica), porém o observado na nanoestrutura é muito intenso.
- 4 - Partir dos resultados obtidos e propor uma possível idéia para um biossensor baseado na luminescência do material genético.

REFERÊNCIAS

- 1 BASSO, C. R. **Detecção do vírus da cinomose canina por diferentes metodologias analíticas**. 2015. 68 p. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2015.
- 2 COSTA, M. P. **Desenvolvimento de biossensor impedimétrico para detecção de mycobacterium tuberculosis baseado em ácido mercaptobenzóico e nanopartículas magnéticas**. 2014. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- 3 MARTINS, J. F. S. **Identificação do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* por nanossonda de ouro**. 2012. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade Vale do Paraíba, São Jose dos Campos, 2012.
- 4 GAZOULI, M. et al. Specific detection of unamplified mycobacterial DNA by use of fluorescent semiconductor quantum dots and magnetic beads. **Journal Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2830-2835, 2010.
- 5 VEIGAS, B. M. R. **Au-nanosondas aplicações na detecção de Mycobacterium tuberculosis e Plasmodium berghei**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Faculdade de Tecnologia, Universidade de Nova Lisboa, Lisboa, 2009.
- 6 TELES, F. R.; PRAZERES, D. M. F.; LIMA FILHO, J. L. Trends in dengue diagnosis. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, n. 8, p. 287-302, 2005.
- 7 TELES, F. R. R. **Desenvolvimento de um biossensor para detecção e identificação do vírus da dengue em fluidos biológicos**. 2006. 154 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- 8 SILVA, J. J. R. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezelétrico de DNA para diagnósticos clínicos**. 2004. 114 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.
- 9 SILVA, O. B. **Geração e propagação de ondas de superfície em fendas metálicas de dimensões menores que o comprimento de onda**. 2012. 148 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 10 WANG, S. et. al. Label free imaging, detection, and mass measurement of single viruses by surface plasmon resonance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 37, p. 16028-16032, 2010. doi: 10.1073/pnas.1005264107.
- 11 WANG, L. et. al. Self assembled supramolecular films derived from marine deoxy ribonucleic acid (DNA) cationic surfactant complexes: large-scale preparation and optical and thermal properties. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 5, p. 1273-1281, 2001.

- 12 WANG, Z.; WILKOP, T.; CHENG, Q. Characterization of micropatterned lipid membranes on a gold surface by surface plasmon resonance imaging and electrochemical signaling of a pore-forming protein. **Langmuir**, v. 21, n. 19, p. 10292-10296, 2005.
- 13 GUNTUPALLI, R. et. al. A magnetoelastic resonance biosensor immobilized with polyclonal antibody for the detection of Salmonella typhimurium, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 7, p. 1474–1479, 2007.
- 14 LIMA, J. F. C. et. al. Desempenho da técnica nested PCR na detecção específica do complexo Mycobacterium tuberculosis em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.7, p. 690-697, 2009.
- 15 LIMA, C. L. **Estudo espectroscopico de materiais:** a múltipla aplicabilidade da espectroscopia de raman para caracterização de aminoácidos, molibdato e tungstato de sódio, e óxidos nanomoldados. 2011. 144 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- 16 YU, X.; SHUM P.; REM G. Highly sensitive photonic crystal fiber-based on refractive index sensing using mechanical long-period grating. **IEEE Photonics Technology Letters**, v. 20, n. 20, p. 1688-1690, 2008.
- 17 KIM, Y. H. et. al. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. **Journal of Veterinary Science**, v. 2,n.1, p. 59-63, 2001.
- 18 KIM, S. H.; CHOI, D. S. Single-molecule detection of fluorescence resonance energy transfer using confocal microscopy. **Journal Optical Society of Korea**, v. 12, n. 12, p. 107-111 2008.
- 19 KASEMO, B. Biological surface science. **Surface Science**, v. 500, n. 9, p. 656-677, 2002.
- 20 KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1033-1039, 2002.
- 21 LIU, G. et. al. An enzyme-based E-DNA sensor for sequence-specific detection of femtomolar DNA targets. **Journal American Chemistry Society**, v. 130, n. 69, p. 6820-6825, 2008.
- 22 LUCARELLI, F. et al. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 19, n. 5, p. 515-530, 2004.
- 23 PEREZ, L. V. H. et al. GaAs-AlGaAs quantum cascade lasers: Physics, technology, and prospects. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v. 38, n. 6, p. 547-558, 2002.
- 24 KURLYANDSKAYA, G.; LEVIT, V. Advanced materials for drug delivery and biosensors based on magnetic label detection. **Material Science Engineering**, v. 27, n. 114, p. 495-503, 2007.

- 25 CARVALHO, R.M.; RATH, S.; KUBOTA, L.T.; SPR: uma nova ferramenta para biossensores. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 97-104, 2003.
- 26 DAS, M. et al. Zirconia based nucleic acid sensor for *Mycobacterium tuberculosis* detection. **Applied Physics Letters**, v. 96, n. 13, p. 133-703, 2010.
- 27 BERGER, C. E. H. et al. Surface plasmon resonance multisensing. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 703, 1998.
- 28 LIEBERMANN, T.; KNOLL, W. Surface plasmon field enhanced fluorescence spectroscopy. **Colloids Surface**, v. 177, n. 171, p. 115-130, 2000.
- 29 DIVNE, A. M.; ALLEN, M. A. DNA microarray system for forensic SNP analysis. **Forensic Science Intitute**, v. 154, n. 23, p. 111-121. 2005.
- 30 BARHOUMI, A. et. al. Surface enhanced raman spectroscopy of DNA. **Journal American Chemistry Sociology**, v. 130, n. 16, p. 5523-5529, 2008.
- 31 PAPADOPOULOU, E.; BELL, S. E. J. Direct surface-enhanced raman scattering analysis of DNA duplexes. **Chemistry Europe Journal**, v. 18, n. 39, 5394-5400, 2012.
- 32 PAPADOPOULOU, E.; BELL, S. E. J. Label-Free detection of single base mismatches in DNA by surface enhanced raman spectroscopy. **Chemical Communications**, v. 47, n. 19, p. 10966-10968, 2011.
- 33 YGUERABIDE, J.; YGUERABIDE, E. E. Light scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. **Analytical Biochemistry**, v. 262, n. 2, p. 157-176, 1998.
- 34 LU, L. et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus. **Antiviral Therarpy**, v. 13, n. 98, p. 253-262, 2007.
- 35 MARANGONI, V. S. **Estudo e desenvolvimento de nanocompósitos contendo nanopartículas de ouro conjugadas com biomoléculas: sínteses e aplicações em nanomedicina**. 2012. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 36 HOMOLA, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. **Chemical Review**, v. 108, n. 2, p. 462-493, 2008.
- 37 HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators B**, v. 54, n. 12, p. 3-15, 1999.
- 38 GUIDELLI, E. J. **Luminescência opticamente estimulada em condições de ressonância plasmônica**. 2015. 127 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- 39 COLLETT, J. R.; EUN, J. C.; ELLINGTON, A. D. Production and processing of aptamer microarrays. **Methods**, v. 37, n. 1, p. 4-15, 2005.

- 40 PINES, D. Collective energy losses in solids. **Reviews of Modern Physics**, v. 28, n. 3, p.184-198, 1956.
- 41 GARCIA, M. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. **Journal of Physics D**, v. 44, n. 11, p. 283-401, 2011.
- 42 GARCIA, D.; ABAJO, F. J. Optical excitations in electron microscopy. **Reviews of Modern Physics**, v. 82, n. 1, p. 209-275, 2010.
- 43 LAKOWICZ, J. R. Radiative decay engineering 5: metal enhanced fluorescence and plasmon emission. **Analytical Biochemistry**, v. 337, n. 171, p. 194, 2005.
- 44 LAKOWICZ, J. R. Radiative decay engineering 3. Surface plasmon coupled directional emission. **Analytical Biochemistry**, v.324, n.22, p. 153-169.2004.
- 45 LAKOWICZ JR. et. al. Enhanced and localized multiphoton excited fluorescence near metallic silver islands: metallic islands can increase probe photostability. **Journal Fluorescence**, v. 12, n. 8, p. 299-302, 2002.
- 46 LAKOWICZ, J. R. et al. Radiative decay engineering 2. effects of silver island films on fluorescence intensity, lifetimes, and resonance energy transfer. **Analytical Biochemesttry**, v. 301, n. 7, p. 261-277, 2006
- 47 LAKOWICZ, J. R. Radiative decay engineering 1: biophysical and biomedical applications **Analytical Biochemistry**, v. 298, n. 333, p. 1-24, 2001.
- 48 LAKOWICZ J R. et al. Radiative decay engineering: II. effects of silver island films on fluorescence intensity, lifetimes and resonance energy transfer. **Analytical Biochemistry**, v. 301, n. 1407, p. 261-277, 2002.
- 49 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.
- 50 SANTOS, D. F. N. **Investigação numérica do desempenho de um sensor de fibra opitca de indice de refração, baseado em SPR utilizando COMSOL Multiphysics**. 2011. 143 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Telecomunicações e Redes de Energia)-Universidade da Madeira, Funchal, 2012.
- 51 DINIZ, L. O. **Modelagem de dispositivos opticos em escala nanometrica**. 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 52 LEBARS, I. et. al. Exploring TAR–RNA aptamer loop-loop interaction by X-ray crystallography, UV spectroscopy and surface plasmon resonance. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 22, p. 7146-7156, 2008.

53 BRONGERSMA, M. L.; HARTMAN, W.; ATWATER, H. Plasmonics: Electromagnetic transfer energy and switching in nanoparticle chain-arrays below the diffraction limit. **Most Reading Source Proceedings**, v. 582, n. 24, p. 356-359, 1999.

54 FERRI, F. A. et al. Influence of film thickness on the optical transmission through subwavelength single slits in metallic thin films. **Applications Optics**, v. 50, n. 31, p. 1-6, 2011.

55 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Artmed: Porto Alegre, 12989 p., 2014.

56 JACOB, B. S.; et. al. Optical properties and electronic transitions of DNA oligonucleotides as a function of composition and stacking sequence. **Physics Chemical**, v.1, n. 17, p. 4589-4599, 2015.

57 ZAMARION, V. M. **Estudos e aplicações de ressonância plasmônica superficial em nanosondas SERS**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

58 ZAMARION, V. M. **Funcionalização de nanopartículas plasmônicas para o desenvolvimento de sensores SERS**, 2012. 241 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

59 BARNES, W. L. Fluorescence near interfaces: the role of photonic mode density. **Journal Modedn Optics**, v. 45, n. 5, p. 661–699, 1998.

60 BARNES, W. L.; DREUX, A. EBBESEN, T. W. Surface plasmons subwavelength optics. **Nature**, v. 424, n. 6950, p. 824-829, 2003.

61 BARNES, W. L. Surface plasmon-polariton length scales: a route to subwavelength optics. **Journal of Optics A: pure and applied optics**, v. 8, n. 4, p. 587-597, 2006.

62 BARNES, W. L.; DEREUX, A.; EBBESEN, T. W. Surface plasmon subwavelength optics **Nature**, v. 424, n. 6950, p. 824-830, 2003.

63 SELF, B. D.; MOORE, D. S. Nucleic acid vibrational circular dichroism, absorption, and linear dichroism spectra. I. A DeVoe theory approach. **Biophysics Journal**, 73, n. 5, 339-347, 1997.

64 SELF, B. D.; MOORE, D. S. Nucleic acid vibrational circular dichroism, absorption, and linear dichroism spectra. II. A DeVoe theory approach. **Biophysics Journal**, v. 74, n. 5, p. 2249-2258, 1998.

65 ZHANG, J. et al. Microfiber fabry perot interferometer for dual parameter sensing, **Journal of Lightwave Technology**, v. 31, n. 10, p. 1608-1615, 2013.

66 ZHANG, S.; YANG, W.; NIU, Y.; SUN, C. Multilayered construction of glucose oxidase and poly (allylamine) ferrocene on gold electrodes by means of layer by layer covalent attachment. **Sensors & Actuators**, v. 101, n. 101, p. 387-393, 2004.

- 67 ZHANG H. et al. Immobilization of DNA on silver surface of bulk acoustic wave sensor and its application to the study of UV-C damage. **Analytica Chimica Acta**, v. 374, n. 8, p. 31-38, 1998.
- 68 ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 25, p. 273- 282, 2000.
- 69 ITO, F. et al. Near infrared fluorescence enhancement by local surface plasmon resonance from arrayed gold nanoblocks. **Optical Photonics Journal**, v. 4, n. 3, p. 27-31, 2013.
- 70 MORENO, M. M. et al. Theory of extraordinary optical transmission through subwavelength hole arrays, **Physical Review Letters**, v. 86, n. 6, p. 1114-1117, 2001.
- 71 KRAVETS, V. G. et al. Sensitivity of collective plasmon modes of gold nanoresonators to local environment. **Optics Letters**, v. 35, n. 7, p. 956-958, 2010.
- 72 KNEIPP, K.; KNEIPP, H.; KNEIPP, J. Surface-enhanced raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates from single molecule raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells. **Accounts Chemical Research**, v. 39, n. 7, p. 443-50, 2006.
- 73 KNEIPP, K. et al. Surface enhanced Raman scattering and biophysics. **Journal of Physics**, v. 14, n. 39, p. 597-624, 2002.
- 74 PIUNNO, P. A. E. et. al. Fiber optic biosenor for fluorometric detection of DNA hybridization. **Analytica Chimica Acta**, v. 288, n. 3, p. 205-214, 1994
- 75 SCHWILLE, P. et. al. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one and two photon excitation. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 66, p. 2251-2265, 1999.
- 76 SCHWILLE, P.; BIESCHKE, J.; OEHLenschLÄGER, F. Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies. **Biophysics Chemistry**, v. 66, n. 23, p. 211-228, 1997.
- 77 PATTNAIK, P. Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 126, n. 2, p. 79-92, 2005.
- 78 CHEN, L.; WANG, Q.; WANGUO H. W. The utilization of BSA modified chip on the investigation of ligand and protein interaction with surface plasmon resonance. **Journal Analytical Biotechnology**, v. 8, n. 14, p. 7148-7155, 2009.
- 79 CHEN, I. et al. Enhanced light emission from blue organic light-emitting devices with DNA biopolymer. **Quantum Electronics Conference & Lasers and Electro Optics**, v. 568, n. 2, p. 182-184, 2011.

- 80 CHEN R. et al. Electron transfer based single molecule fluorescence as a probe for nano-environment dynamics. **Sensors**, v. 14, n. 2, p. 449–67, 2014.
- 81 LU, Y.; J.; ZHANG, F.; SUI, S. F. Specific binding of integrin α IIb β 3 to RGD peptide immobilized on a nitrilotriacetic acid chip. **Surface Plasmon Resonance Study**, v. 1, n. 8, p. 50, 2002.
- 82 HOPPENER, C.; NOVOTNY, L. Exploiting the light-metal interaction for biomolecular sensing and imaging. **Quarterly Review Biophysics**, v. 45, n. 2, p. 209–255, 2012
- 80 GEDDES, C. D. et al. Radiative decay engineering. In: GEDDES, C. D.; LAKOWICZ, J. R. (Ed.). **Topics in fluorescent spectroscopy: radiative decay engineering**. New York: Springer Science, 2005. v. 8, p. 405-448.
- 83 GEDDES, C. D. et. al. Metal enhanced fluorescence due to silver colloids on a planar surface: Potential applications of Indocyanine green to in vivo imaging. **Journal Physics Chemistry**, v. 107, p. 3443-3449, 2003.
- 84 GEDDES, C. D. et al. Noble metal surfaces for metal enhanced fluorescence. In: GEDDES, C. D.; LAKOWICZ, J. R. (Ed.). **Topics in fluorescent spectroscopy: radiative decay engineering**. New York: Springer Science. Business Media, 2005. v. 8. p. 365-401.
- 85 GEDDES, C. D.; LAKOWICZ, J. R. Metal enhanced fluorescence. **Journal Fluorescence**, v. 12, n. 2, p. 121-129, 2002.
- 86 TAWA, K. et. al. Optical microscopic observation of fluorescence enhanced by grating coupled surface plasmon resonance. **Optical Express**, v. 16, n. 13, p. 9781, 2008.
- 87 TAWA, K.; KNOLL, W. Mismatching base pair dependence of the kinetics of DNA-DNA hybridization studied by surface plasmon fluorescence spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 13, p. 2372-2377, 2004.
- 88 TAWA, K.; MORIGAKI, K. Substrate supported phospholipid membranes studied by SPR and surface plasmon fluorescence spectroscopy (SPFS). **Biophysical Journal**, v. 89, n. 8, 2750-2758, 2005.
- 89 CHOWDHURY, M. H. et. al. Computational study of fluorescence scattering by silver nanoparticles. **Journal Optics Society American B**, v. 24, n. 9, p. 2259-2267, 2007.
- 90 DONG, J.; ZHANG, Z.; ZHENG, H.; SUN, M. Recent progress on plasmon enhanced fluorescence. **Nanophotonics**, v. 4, n. 1, p. 472-90, 2015.
- 91 FORD, G.W.; WEBER, W. H. Electromagnetic interactions of molecules with metal surfaces. **Physics Reports**, v. 113, n. 4, p. 195-287, 1984.
- 92 COTTAT, M. et al. Localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor for the protein detection. **Plasmonics**, v. 8, n. 2, p. 699-704, 2013.
- 93 DOSTALEK, J.; KNOLL, W. Biosensors based on surface plasmon enhanced fluorescence spectroscopy. **Biointerphases**, v. 3, n. 3, p. 12-22, 2008.

94 BAUCH M. et al. Plasmon enhanced fluorescence biosensors. **Review Plasmonics**, v. 3, n. 9, p. 781-799, 2014.

95 RAETHER, H. **Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings**. New York: Springer Verlag, 1988. p.133-136. (Springer Tracts in Modern Physics, v. 111)

96 RAETHER, H. Surface plasma oscillations and their applications. In: HASS, G.; FRANCOMBE, M. H.; HOFFMAN, R. W. (Ed.). **Physics of thin films**. New York: Academic Press, 1978. p. 145-261.

97 KNOLL, W.; PHILPOTT, M. R.; SWALEN, J. D. Emission of light from Ag metal gratings coated with dye monolayer assemblies. **Journal of Chemical Physics**, v. 75, n. 90, p. 4795-4799, 1981.

98 JORDAN, C. E.; FRUTOS, A. G.; THIEL, A. J. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 4939-4947, 1997.

99 KNOLL, W. Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves, **Annual Review Physics Chemistry** v. 49, n. 9, p. 569-638, 1998.

100 EBBESEN, T. W. et. al. Extraordinary optical transmission through subwavelength hole arrays. **Letter Nature**, v. 391, n. 390, p. 667-669, 1998.

101 MAIER, S. Fundamentals and applications plasmonics. **Physics**, v. 677, n. 2007, p. 200-223, 2004.

102 KRESS, A. et al. Manipulation of the spontaneous emission dynamics of quantum dots in two-dimensional photonic crystals. **Physical Review B**, v. 71, n. 24, p. 241-304, 2005.

103 BOHREN, C. F.; HUFFMAN, D. R. **Absorption and scattering of light by small particles**. New York: John Wiley and Sons, v.1, p.132-150, 1983.

104 CHANCE, R. R.; PROCK, A.; SILBEY, R.; Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces. **Advances Chemistry Physics**, v. 37, n. 4, p. 1589-1595, 1973.

105 GERSTEN, J.; NITZAN, A. Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles. **Journal Chemistry Physics**, v. 75, n. 3, p. 1139-1152, 1981.

106 GERSTEN, J.. I. Theory of fluorophore-metallic surface interactions. In: GEDDES, C. D.; LAKOWICZ, J. R.; (Ed.). **Topics in fluorescence spectroscopy: radiative decay engineering**. New York: Springer Science, 2005. v. 8, p. 197-221.

107 ZELNIG, G. et. al. Two and three dimensional characterization of Zucchini yellow mosaic virus induced structural alterations in Cucurbita pepo L. plants. **Journal Structure Biolgic**, v. 186, n. 2, p. 45-52, 2014.

- 108 ROMAN, A. et. al. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.1 n.5, p. 55, 2004.
- 109 KRETSCHAMNN, E.; RAETHER, H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 23 A, n. 241, p. 2135-2136, 1968.
- 110 TONKS, L.; LANGMUIR, I. Oscillations in ionized gases. **Physical Review**, v. 33, n. 134, p. 195-210, 1929.
- 111 VERMA D. D; FAHR, A. Confocal laser scanning microscopy: an excellent tool for tracking compounds in the skin. In: SMITH, W. E.; MAIBACH, H. I. (Ed.) **Percutaneous penetration enhancers**. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p. 335-357.
- 112 CAPASSO, F. et al., High performance quantum cascade lasers. **Optics and Photonics News**, v. 10, n. 10, p. 32-37, 1999.
- 113 CAPASSO, F. et al. Quantum cascade lasers. **Physics World**, v. 12, n. 6, p. 27-33. 1999.
- 114 CAPASSO, F. et al. Quantum cascade lasers: ultrahigh speed operation, optical wireless communications, narrow linewidth and far-infrared emission. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v. 38, n. 6, p. 511-532, 2002.
- 115 ESCOBE, C. et al. Quantification of ovarian cancer markers with integrated microfluidic concentration gradient and imaging nanohole surface plasmon resonance. **Analyst**, v. 138, n. 5, p. 1450-1458, 2013.
- 116 VIDAL, G. F.; EBBESEN, T. W.; KUIPERS, L. Light passing through subwavelength apertures. **Reviews of Modern Physics**, v. 82, n. 1, p. 729-787, 2010.
- 117 DRUDE, P. Zur elektronentheorie der metalle. **Annalen der Physik**, v. 306, n. 3, p. 566-613, 1900.
- 118 BRATIFICH, R. **Fabricação e caracterização de nanoestruturas metálicas para aplicações em dispositivos plasmônicos**. 2015. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- 119 MIRKIN, C. A. et al. A DNA based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. **Nature**, v. 382, n 24, p. 607-609, 1996.
- 120 MENG, F. et al. Morphological visualization, componential characterization and microbiological identification of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs). **Journal of Membrane Science**, v.1, n. 34, p 150, 2010.
- 121 HIEPA, H. M. et al. A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 8, n. 4, p. 331-338, 2007.

122 VOGEL, R. et al. Absorption and fluorescence spectroscopy of rhodamine 6G in titanium dioxide nanocomposites. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 60, n. 12, p. 245–249, 2004.

123 AZEVEDO, C. G. **Caracterização óptica e eletrônica de filmes semicondutores usando espectros de transmitância e refletância**. 2015. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Bauru, 2015.

124 ROSI, N. L. et al. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. **Science**, v. 312, n. 5776, p. 1027-1030, 2006.

125 PELTON, M. et al. Ultrafast resonant optical sensing from single gold nanorods: Large nonlinearities and plasmon saturation. **Physical Review B**, v. 73, n. 15, p. 155-419, 2006.

126 STERN E. A.; FERRELL, R. A. Surface plasma oscillations of a degenerate electron gas, **Physical Review**, v. 120, n. 1214, p. 130-136, 1960.

127 POWELL, C. J.; SWAN J. B. Origin of the characteristic electron energy losses in aluminum, **Physical Review**, v. 115, n. 58, p. 869-875, 1959.

128 RITCHIE, R. H. et al. Surface plasmon resonance effect in grating diffraction, **Physical Review Letters**, v. 21, n. 106, p. 874-881, 1968.

129 FANO, U. Atomic theory of interactions electromagnetic in dense materials. **Physical Review**, v. 103, n. 213, p. 1202-1218, 1956.

130 BURSTEIN, E. et al. Surface polaritons propagating electromagnetic modes at interfaces. **Journal of Vacuum Science & Technology**, v. 11, n. 15, p. 1004-1019, 1974.

131 CUNNINGHAM, S. L.; MARADUDIN, A. A.; WALLIS, R. F. Effect of a charge layer on the surface plasmon polariton dispersion curve. **Physical Review B**, v. 10, n. 456, p. 3342-3355, 1974.

132 SCARANO, S. et al. Surface plasmon resonance imaging for affinity based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 957-966, 2010.

133 PADDOCK, S. W. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. **Molecular Biotechnology**, v.89, n. 145, p. 123-1321, 2000.

134 KREIBIG, U.; VOLLMER, M. Optical properties of metal clusters. In: GONSER, U. et al. (Ed.). **Materials science**. New York: Springer, 1995. p. 532.

135 UMAZANO J.P.; BERTOLOTTO, J.A. Plasmon resonance: review. **Journal Biological Physics**. v. 34, n. 163, 2008.

136 SOARES, L. et. al. Localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensing using gold nanotriangles: detection of DNA hybridization events at room temperature. **Analyst**, v. 139, n. 19, p. 4964-4973, 2014.

- 137 KRETSCHMANN, E.; RAETHER, H. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. **Zeitschrift für Naturforschung A**, n. 23, p. 2135-2136, 1968
- 138 OKONSKI, C. T.; YOSHIOKA, K.; ORTTUNG, W. H. Electric properties of macromolecules. IV. determination of electric and optical parameters from saturation of electric birefringence in solutions. **Journal Physics Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 1558-1565, 1959.
- 139 BIDAN, G. et al. Electropolymerization as a versatile route for immobilizing biological species onto surfaces. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 89, n. 23, p. 183-94, 2000.
- 140 MICHLER, P. et al. A quantum dot single photon turnstile device. **Science**, v. 290, n. 5500, p. 2282-2285, 2000.
- 141 LODAHL, P. et al. Controlling the dynamics of spontaneous emission from quantum dots by photonic crystals. **Nature**, v. 430, n. 88, p. 654-657, 2004.
- 142 KODADEK, T. Protein microarrays: prospects and problems. **Chemistry Biological**, v. 8 n. 89, p. 105-115, 2001.
- 143 HAAB, B. B.; DUNHAM, M. J.; BROWN, P. O. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. **Genome Biology** 2, v. 4, n. 1, p. 4-13, 2001.
- 144 ZHU, H.; SNYDER, M. Global analysis of protein activities using proteome chip. **Current Opinion Chemical Biological**, v. 7, n. 293, p. 55-63, 2003.
- 145 YUK, J.S. et. al. Sensitivity of ex situ and in situ spectral surface plasmon resonance sensors in the analysis of protein arrays. **Biosensors Bioelectron**, v. 20, n. 45, p. 2189-2196, 2005.
- 146 LINDQUIST, N. C. et al. Engineering metallic nanostructures for plasmonics and nanophotonics. **Reports on Progress in Physics**, v. 75, n. 3, p. 036501-1-036501-61, 2012.
- 147 LINDQUIST, N. C.; NAGPAL, P.; MCPEAK, K. M.; NORRIS, D. J.; OH, S. H. Engineering metallic nanostructures for plasmonics and nanophotonics. **Reports on Progress in Physics**, v. 75, n. 3, p. 036501-1 a 036501-61, 2012.
- 148 FARLAND, A. D.; DUYNE, R. P. van. Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. **Nano Letters**, v. 3, n. 8, p. 1057-1062, 2003.
- 149 MAYERGOYZ, I. D.; ZHANG, Z.; MIANO, G. Analysis of dynamics of excitation and dephasing of plasmon resonance modes in nanoparticles. **Physical Review Letters**, v. 98, n. 14, p. 147-401, 2007.
- 150 RIGNEAULT, H. et al. Enhancement of single molecule fluorescence detection in subwavelength apertures. **Physical Review Letters**, v. 95, n. 11, p. 1-4, 2005.
- 151 HOLCOMB, D. N.; TINOCO, I. Electrical birefringence al high fields. **Journal Physics Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 2691-2698, 1963.

- 152 HAES, A. J.; DUYNE, R. P. A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 35, p. 10596-10604, 2002.
- 153 BROLO, A. G. et al. Basis and lattice polarization mechanisms for light transmission through nanohole arrays in a metal film, **Nano Letters**, v. 5, n. 7, p. 1243-1246, 2005.
- 154 LEE, K. L. et al. Enhancing surface plasmon detection using template-stripped gold nanoslit arrays on plastic films. **ACS Nano**, v. 6, n. 4, p. 2931-2939, 2012.
- 155 LEE, K. L.; WANG, W. S.; WEI, P. K. Comparisons of surface plasmon sensitivities in periodic gold nanostructures. **Plasmonics**, v. 3, n. 4, p. 119-125, 2008.
- 156 LEE, K. L.; WU, S. H.; WEI, P. K. Intensity sensitivity of gold nanostructures and its application for high-throughput biosensing. **Optics Express**, v. 17, n. 25, p. 23104-23113, 2009.
- 157 TAYLOR, E. W.; CRAMER, W. Birefringence of protein solutions and biological systems. **Biophysical Journal**, v. 3, n. 5, p. 127-141, 1963.
- 158 OTTO, A. Optical properties of solids, new development. **Zeitschrift für Physik**, v. 185, n. 232, p. 677, 1967.
- 159 CAVALCANTI, G. O. **Caracterização precisa de filmes metálicos e novas propostas de transdutores ópticos por ressonância de plasmons de superfície**. 2013. 96 p. Tese (Doutorado em Geociências) - Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2013.
- 160 POCKHAND, I.; BRILLANTE, A.; MÖBIUS, D. Nonradiative decay of molecular excitation at a metal interface. **Nuovo Cimento**, v. 63, n. 1, p. 350-357, 1981.
- 161 KNOBLOCH, H. et al. Dispersive surface plasmon microscopy for the characterization of ultrathin organic films. **Applied Physics Letter** v. 69, n. 3, 2336-2337. 1996.
- 162 LIEBERG, B.; NYLANDER, C.; LUNDSTR, O. M. I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. **Sensors Actuators**, v. 4, p. 299-304, 1983.
- 163 LIEBERG, B.; LUNDSTR, O. M. I.; STENBERG, E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. **Sensors Actuators B**, v. 11, n. 10, p. 63-72, 1993.
- 164 EISBERG, R.; LERNER, L. S. **Física fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1983. v. 4.
- 165 DEVOE, H. Optical properties of molecular aggregates. II. classical theory of the refraction, absorption, and optical activity of solutions and crystals. **Journal Chemistry Physics**, v. 43, n. 11, p. 3199-3208, 1964.

- 166 JOSSON, M; LAKOFF, G. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase. **Science**, v. 12, n. 283, p. 169-174, 1999.
- 167 BOZHEVOLNYI, S. I. et al. Channel plasmon subwavelength waveguide components including interferometers and ring resonators. **Nature**, v. 1, n. 440, p. 508–511, 2010.
- 168 MATSUBARA, K.; KAWATA, S.; MINAMI, S. Optical chemical sensor based on surface plasmon measurement. **Applied Optics**, v. 27, n. 6, p. 1160-1163, 1988.
- 169 GINNINI, V. et al. Controlling light localization and light matter interactions with nanoplasmonics. **Chemical Reviews**, v. 6, n. 22, p. 249-257, 2011.
- 170 STEWART, M. E. et. al. Nanostructured plasmonic sensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 494-521, 2008.
- 171 ABAJO, F. J. G. Optical excitations in electron microscopy. **Review Modern Physics**, v. 82, n. 1, p. 1-25, 2010.
- 172 ZHANG, Z.; QIU, M. Small-volume waveguide-section high Q microcavities in 2D photonic crystal slabs. **Optics Express**, v. 12, n. 17, p. 3988-3995, 2006.
- 173 STOYLOV, S.P.; STOIMENOVA, M. Anisotropy of the optical polarizability in the Rayleigh–Debye–Gans approximation. **Journal Colloid Interface Science**, v. 59, n. 90, p. 179-180, 1977.
- 174 RIDGEWAY, D. Transient electric birefringence of suspensions of asymmetric ellipsoids. **Journal of American Chemical Society**, v. 88, n. 56, p. 1104-1112, 1966.
- 175 GIANNINI, V. et. al. Plasmonic nanoantennas: fundamentals and their use in controlling the radiative properties of nanoemitters. **Chemical Review**, v. 11, n. 6, p. 3888-3912, 2011.
- 176 LEEBEECK, A. et al. On chip surface based detection with nanohole arrays. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4094-4100, 2007.
- 177 KROGER, E. Berechnung der energieverluste schneller elektronen in dünnen schichten mit retardierung. **Zeitschrift Physics**, v. 216, n. 7, p. 115-135, 1999.
- 178 FESTENBERG, V. C.; KRÖGER, E. Retardation effects for the electron energy loss probability in GaP and Si. **Physics Letters**, v. 26A, n. 5, p. 339-340, 1968.
- 179 FEHLHABER, R. P.; BURSILL, L. A. Plasmon excitations in small diamond spheres by fast penetrating electrons. **Physical Review B**, v. 60, n. 62, p. 14147-14153, 1999.
- 180 LUCAS, A. A.; HENRARD, P.; LAMBIN, L. Computation of the ultraviolet absorption and electron inelastic scattering cross section of multishell fullerenes, **Physical Review B**, v. 49, n. 26, 2888-2896, 1970.
- 181 MIKAELIAN, T. M. L. **High-energy electromagnetic processes in condensed media**. New York: Wiley, 1972. p. 151.

- 182 SCHIEBER, D.; SCHÄCHTER, L. Reaction forces on a relativistic point charge moving above a dielectric or a metallic half-space. **Physical Review E**, v. 57, n. 406, p. 6008-6015, 1998.
- 183 BOLTON, J. P. R.; CHEN, M. Electron energy loss in multilayered slabs. I. normal incidence. **Journal of Physics: condensed matter**, v. 7, p. 3373-3387, 1995.
- 184 BOSMAN, M. et al. Mapping surface plasmons at the nanometre scale with an electron beam. **Nanotechnology**, v. 18, n. 52, p. 165-505, 2007.
- 185 BORZIAK, P. I. et. al. Cathodoluminescence from metal films. **Thin Solid Films**, v. 35, n. 9, p. 12, 1976.
- 186 LASTDRAGER, B.; TIP, A.; VERHOEVEN, J. Theory of Cherenkov and transition radiation from layered structures. **Physical Review E**, v. 61, n. 5, p. 5767-5778, 2000.
- 187 OLSEN, H. A.; KOLBENSTVEDT, H. Cherenkov radiation and transition radiation from small systems: cherenkov radiation generated in a cylinder. **Physical Review A**, v. 21, n. 58, p. 1987-1990, 1980.
- 188 HECHT, B. et al. Local excitation, scattering, and interference of surface plasmons. **Physical Review Letters**, v. 77, n. 9, p. 1889-1892. 1996.
- 189 MULLETT W. M.; LAI, J. M.; YEUNG, E. P. C. Surface plasmon: a new technology. **Methods**, v. 22, n. 77, p. 1-15, 2000.
- 190 MIE, G. Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. **Analytical Physics**, v. 25, p. 377-445, 1908.
- 191 WHATSON, J. D.; CRICK, F. H. A Structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 9, p. 737-738, 1953.
- 192 WILKINS, M. H. F.; STOKES, A. R.; WILSON, H. R. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. **Nature**, v. 171, n. 45, 738-740, 1953.
- 193 STOIMENOVA, M.; STOYLOV, S. P. Orientational optic effects from above Rayleigh particles. **Journal Colloid Interface Sciety**, v. 76, n. 5, p. 502-514, 1980.
- 194 AUBIN, T. M. E.; HAMAD, S. K. Gold nanoparticle cytochrome c complexes: the effect of nanoparticle ligand charge on protein structure. **Langmuir**, v. 21, n. 26, p. 12080-12084, 2005.
- 195 COSNIER, S.; MAILLEY, P. Recent advances in DNA sensors. **Analytics**, v. 133, n. 5, p. 984-991, 2008.
- 196 HOULTON, A. et al. DNA based routes to semiconducting nanomaterials. **Chemical Communities**, v. 45, n. 8, p. 1797-1806, 2009.

- 197 KWON, Y. W.; CHOI, D. H.; JIN, J. I. Optical, electro optic and optoelectronic properties of natural and chemically modified DNAs. **Journal Polymers**, v. 44, n. 19, p. 1191-1208, 2012.
- 198 MIZOGUCHI, K. et al. Magnetic study of the electronic states of B-DNA and M-DNA doped with metal ions. **Physical Review**, v. 72, n. 24, p. 33106, 2005.
- 199 YANG, D. et al. Novel DNA materials and their applications. **Wiley Interdiscip Review: nanomed nanobiotechnology**, v. 2, n. 8, p. 648-669, 2010.
- 200 YANG, Y.; WANG, Q.; GUO, D. A novel strategy for analyzing RNA-Protein interactions by surface plasmon resonance biosensor. **Molecular Biotechnology**, v.4, n. 56, p. 1-14, 2008.
- 201 THOMPSON, K. G. et al. Identification of Zucchini yellow mosaic potyvirus by RT-PCR and analysis of sequence variability. **Journal of Virological Methods**. v. 55, n. 1, p. 83-96, 1995.
- 202 STECKL, A. J. DNA a new material for photonics. **Nature Photonics**, v. 1, n. 5, p. 3-5, 2007.
- 203 HAGEN, J. A.; LI, W.; STECKL, A. J.; GROTE, J. G. Enhanced emission efficiency in organic light-emitting diodes using deoxyribonucleic acid complex as an electron blocking layer. **Applied Physics Letters**, v. 88, n. 5, p. 171109, 2006.
- 204 SONMESOUGLU, S. Optical and dielectric properties of double helix DNA thin films. **Materials Science Engineering**, v. 31, n. 8, p. 1619-1624, 2011.
- 205 SCHUCK, P. Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. **Analytical Review Biophysics and Biomolecules**, v. 26, n. 1, p. 541-566, 1997.
- 206 VAYA, T. et al. Markovitsi fluorescence of natural dna: from the femtosecond to the nanosecond time scales, **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 34, p. 11834–11835, 2010.
- 207 ANKER, J. N. et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature Materials**, v. 7, n. 6, p. 442-453, 2008.
- 208 BECKS, F. J. et al. Tunable light trapping for solar cells using localized surface plasmons. **Journal of Applied Physics**, v. 105, n. 11, p. 114-310, 2009.
- 209 LAL, S.; LINK, S.; HALAS, N. J. Nano optics from sensing to waveguiding. **Nature Photonics**. v. 1, n. 11, p. 641-648. 2007.
- 210 HAYASHI, S. Spectroscopy of gap modes in metal particle surface systems. **Topical Applied Physics**, v. 81, n. 9, p. 71-95, 2001

- 211 HONG, Y. C.; HUH, Y. M.; YOON, D. S.; YANG, J. Nanobiosensors based on localized surface plasmon resonance for biomarker detection. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, n. 759830, p. 759830-1-759830-13. doi: 10.1155/2012/759830, 2012.
- 212 KATZ, E.; WILLNER, I. Integrated nanoparticle biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, n. 45, p. 6042-108, 2004.
- 213 GAVA, V. A. E. Eletrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification. **Methods**, v.8, n.1, p. 2043-2081, 2008.
- 214 PURCELL, E. M.; PENNYPACKER, C. R. Scattering and absorption of light by nonspherical dielectric grains. **Astrophysical Journal Chemistry Physics**, v.186, n. 5, p. 705-714, 1973.
- 215 PURCELL, E. M. Spontaneous emission probabilities at radio frequencies. **Physical Review**, v. 6, n. 9, p. 681, 1946.
- 216 PANKOVE, J. I. Optical processes in semiconductors. **Biopolymers**, v. 6, n. 43, p. 80, 1968.
- 217 FIELDEN, C. Proceedings of the second international symposium on radiosensitising and radioprotective drugs. **Rome editore H.L.**, v. 1, n. 2, p. 1969, 1970.
- 218 LICHTMAN J. W.; CONCHELLO J. A. Fluorescence microscopy. **Nature Methods**, v. 2 n. 910, p. 910-919, 2005
- 219 DREXHAGE, D.; DREXHAGE, K. H. Influence of a dielectric interface on fluorescence decay time. **Journal of Luminescence**, v. 1, n. 2, p. 693–701, 1974.
- 220 SCHULTZ, L. G.; SCHULTZ, F. R.; TANGHERLINI, J. The Optical Constants of Silver, Gold, Copper, and Aluminum. In: The absorption coefficient k . *Opt. Soc. Am.* 44, 362 (1954); L. G. Schultz. **Journal of the Optical Society of America**, v. 4, n. 4, p. 357, 1954.
- 221 CHANGES, G. A. et al. Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 1, p. 284-288, 1973.
- 222 BROLO, A. G. et al. Enhanced fluorescence from arrays of nanoholes in a gold film. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 42, p. 14936-14941, 2005.
- 223 BENNER, R. E.; DORNHAUS, R.; CHANG, R. K.; Angular emission profiles of dye molecules excited by surface plasmon waves at a metal surface. **Optics Communications**, v. 30, n. 2, p.145-149, 1979.
- 224 DOSTALEK, J.; KASRY, A.; KNOLL, W. Long range surface plasmons for observation of biomolecular binding events at metallic surfaces. **Plasmonics**, v.2, n. 3, p. 97-106, 2007.

- 225 SHERRY, L. J. et.al. Localized surface plasmon resonance spectroscopy of single silver nanocubes. **Nano Letters**, v. 5, n. 10, p. 2034-2038, 2005.
- 226 JENSEN, T. R. et al. Nanosphere lithography: tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 45, p. 10549-10556, 2000.
- 227 SANNOMIYA, T.; HAFNER, C.; VOROS, J. In situ sensing of single binding events by localized surface plasmon resonance. **Nano Letters**, v. 8, n. 10, p. 3450-3455, 2008.
- 228 LAL, S. et al. Tailoring plasmonic substrates for surface enhanced spectroscopies. **Chemistry Society Review**, v. 37, n. 5, p. 898-911, 2008.
- 229 AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 4, pt. 1, p. 1376-1395, 2000.
- 230 ASLAN, K.; LEONENKO, Z.; LAKOWICZ JR, G. Fast and slow deposition of silver nanorods on planar surfaces: application to metal-enhanced fluorescence. **Journal Physics Chemical B**, v.109, p.3157-3162, 2005.
- 231 TOMINAGA, G. The manipulation of surface and local plasmons. In: TSAI, D.P.(Ed.) **Optical nanotechnologies**. New York: Springer Verlag, p. 212, 2003.
- 232 WEDGE, S.; BARNES, W. L. Surface plasmon-polariton mediated light emission through thin metal films. **Optics Express**, v. 12, n. 45, p. 3673-3685, 2004.
- 233 FOSTER, K. R. et. al. Intermolecular energy migration and fluorescence. **Biopolymers**, v. 23, p. 148-160, 1984.
- 234 MOLECULAR expressions: exploring the world of optics and microscopy. Disponível em:<<https://micro.magnet.fsu.edu/>>. Acesso em: 16. nov.2017.