

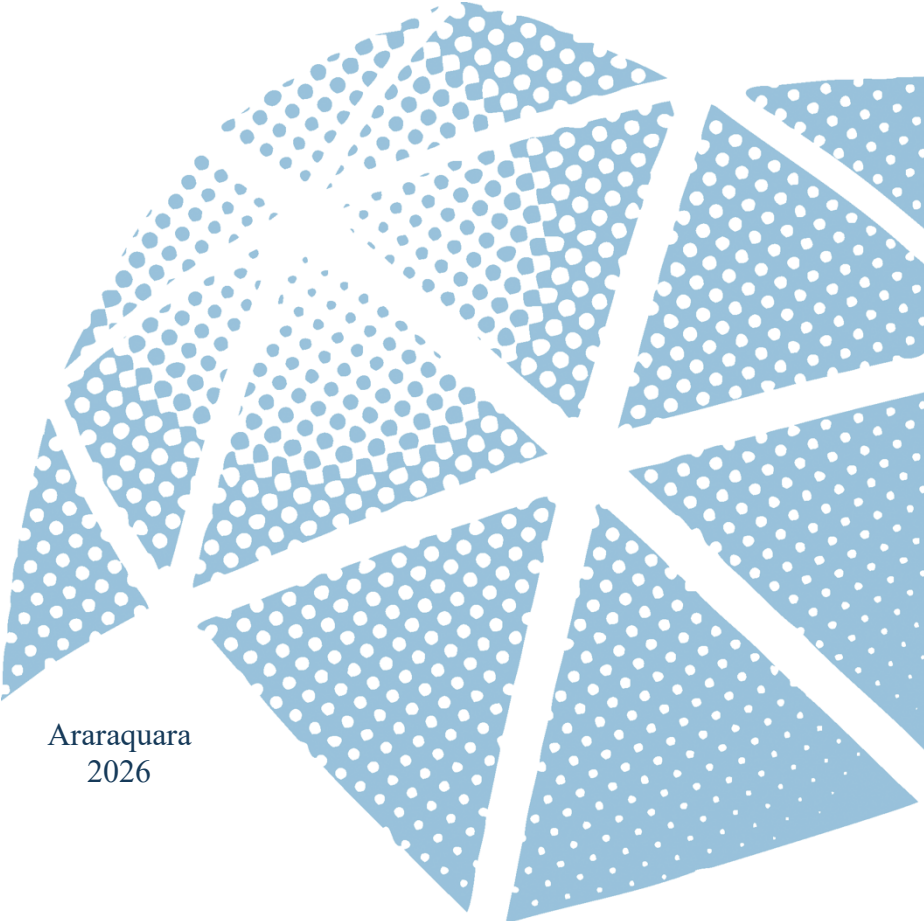
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Plataformas ópticas nanoestruturadas para sensoriamento químico e biológico

Beatriz Bianca Schulz Ramin

TESE DE DOUTORADO

Araraquara
2026



Beatriz Bianca Schulz Ramin

Plataformas ópticas nanoestruturadas para sensoriamento químico e biológico

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual
Paulista para a obtenção do título de Doutor em Química.
Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro

Araraquara
2026

R173p Ramin, Beatriz Bianca Schulz
Plataformas ópticas nanoestruturadas para sensoriamento químico e biológico / Beatriz Bianca Schulz Ramin. -- Araraquara, 2026
151 f.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Sidney Jose Lima Ribeiro

1. Nanopartículas. 2. Fibras ópticas. 3. Biossensores. 4. Luz Espalhamento. 5. Espectroscopia de fluorescência. I. Título.

CONTRIBUIÇÕES E IMPACTO POTENCIAL DA PESQUISA

A obtenção de respostas ópticas confiáveis em meios aquosos complexos permanece limitada por interferências da matriz, adsorção inespecífica, instabilidade interfacial e variabilidade entre plataformas. Esta tese contribui para esse problema por meio do desenvolvimento de duas estratégias de sensoriamento óptico nanoestruturado, baseadas em luminescência por conversão ascendente e espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS). Embora fundamentadas em fenômenos ópticos distintos, ambas demonstram que o desempenho analítico depende da integração entre propriedades do nanomaterial, química de superfície, organização interfacial e arquitetura da plataforma.

No sistema luminescente, UCNPs funcionalizadas foram organizadas em filmes multicamadas para associar emissão óptica e reconhecimento biológico em uma configuração planar destinada à detecção bacteriana. A principal contribuição desse estudo consiste em demonstrar que a resposta da plataforma é determinada não apenas pelas propriedades emissivas das nanopartículas, mas também por sua funcionalização, imobilização e acessibilidade na interface. O sistema estabelece, assim, uma prova de conceito para o desenvolvimento de plataformas luminescentes nanoestruturadas voltadas ao sensoriamento microbiológico.

No sistema SERS, uma arquitetura plasmônica hierárquica foi integrada à fibra óptica para a detecção quantitativa de pequenas moléculas orgânicas em líquidos biologicamente complexos. A plataforma reuniu excitação e coleta localizadas, exclusão física de interferentes de maiores dimensões e regeneração *in situ* da interface sensora. A reutilização da mesma sonda possibilitou a realização de calibração e análise em uma interface comum, reduzindo a influência da variabilidade entre dispositivos preparados separadamente. A geometria integrada à fibra também oferece uma base para futuras aplicações que exijam medições remotas, inserção direta da sonda ou acesso a ambientes confinados.

Em conjunto, os resultados estabelecem a engenharia da plataforma como elemento central para converter propriedades ópticas de nanomateriais em respostas analíticas estáveis, reproduzíveis e interpretáveis. Mais do que apresentar materiais ativos isolados, esta tese demonstra duas soluções arquitetônicas ajustadas às exigências de diferentes mecanismos de transdução e condições de análise. Dessa forma, o trabalho fornece demonstrações experimentais e princípios de projeto que

podem orientar o desenvolvimento de sensores ópticos nanoestruturados para análises biológicas e químicas em meios aquosos complexos.

CONTRIBUTIONS AND POTENTIAL IMPACT OF THE RESEARCH

Obtaining reliable optical responses in complex aqueous media remains limited by matrix interference, nonspecific adsorption, interfacial instability, and platform-to-platform variability. This thesis addresses these challenges through the development of two nanostructured optical sensing strategies based on upconversion luminescence and surface-enhanced Raman scattering (SERS). Although governed by distinct optical phenomena, both demonstrate that analytical performance depends on the integration of nanomaterial properties, surface chemistry, interfacial organization, and platform architecture.

In the luminescent system, functionalized UCNPs were organized into multilayer films to combine optical emission and biological recognition within a planar configuration for bacterial detection. The main contribution of this study is the demonstration that the platform response is determined not only by the emissive properties of the nanoparticles, but also by their functionalization, immobilization, and accessibility at the sensing interface. The system therefore establishes a proof of concept for the development of nanostructured luminescent platforms for microbiological sensing.

In the SERS system, a hierarchical plasmonic architecture was integrated with an optical fiber for the quantitative detection of small organic molecules in biologically complex liquids. The platform combined localized excitation and signal collection, physical exclusion of larger interfering species, and *in situ* regeneration of the sensing interface. Reuse of the same probe enabled calibration and sample analysis to be performed on a common interface, reducing the influence of variability among independently prepared devices. The fiber-integrated geometry also provides a basis for future applications requiring remote measurements, direct probe insertion, or access to confined environments.

Taken together, the results establish platform engineering as a central element in converting the optical properties of nanomaterials into stable, reproducible, and interpretable analytical responses. Rather than presenting isolated active materials, this thesis demonstrates two architectural solutions tailored to the requirements of different transduction mechanisms and measurement conditions. The work therefore provides experimental demonstrations and design

principles that may guide the development of nanostructured optical sensors for biological and chemical analysis in complex aqueous media.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Plataformas ópticas nanoestruturadas para sensoriamento químico e biológico

AUTORA: BEATRIZ BIANCA SCHULZ RAMIN

ORIENTADOR: SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Química, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO (Participação Presencial)

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / UNESP / Câmpus de Araraquara - IQAr

Prof. Dr. DOUGLAS FAZA FRANCO (Participação Presencial)

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / UNESP / Câmpus de Araraquara - IQAr

Prof. Dr. GUSTAVO BRAGA (Participação Virtual)

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Dra. BÁRBARA STHÉFANI CALDAS (Participação Presencial)

Departamento de Química / Centro de Ciências Exatas - UEM - Maringá

Prof. Dr. ALESSANDRO FRANCISCO MARTINS (Participação Virtual)

Química de Materiais e Biomateriais / Colorado State University (CSU) - Estados Unidos

Araraquara, 06 de julho de 2026.

BEATRIZ BIANCA SCHULZ RAMIN

CURRICULUM VITAE

Campinas, São Paulo, Brazil | +55 (19) 99908-3938 | beatriz.schulz@unesp.br

TRAINING AND ACADEMIC

2020-Present: Ph.D. in Chemistry, Department of General and Inorganic Chemistry, São Paulo State University, Institute of Chemistry, Araraquara, Brazil.

Supervisor: Sidney Jose Lima Ribeiro

Thesis title: *Nanostructured Optical Sensing Platforms for Applications in Complex Media*

2023-2025: Ph.D. Research Exchange, Center for Optics, Photonics and Lasers (COPL), Department of Physics, Université Laval, Québec, Canada.

Supervisors: Younes Messaddeq and Sanggon Kim

Project title: *Pushing the Limits of Fiber Optic Sensors*

2021: Teaching Assistant (General Chemistry Laboratory), Department of General and Inorganic Chemistry, Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, Brazil.

Supervisor: Marcelo Nalin

2020-2021: Teaching Assistant (Computer Engineering), Virtual University of the State of São Paulo (UNIVESP), São Paulo, Brazil.

2017-2018: M.Sc. in Chemistry, Department of Chemistry, State University of Maringá (UEM), Maringá, Brazil.

Supervisors: Edvani Curti Muniz and Alessandro Francisco Martins

Dissertation title: *Chitosan/Carrageenan/Curcumin-Based Materials Prepared via Precipitation from Miscible Mixtures in an Ionic Liquid*

2015: Teaching Assistant (Physical Chemistry II), Department of Chemistry, Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), Apucarana, Brazil.

Supervisor: André Luiz Tessaro

2014-2016 - Institutional Program of Scholarships for Teaching Initiation (PIBID, Brazil), Department of Chemistry, Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), Apucarana, Brazil.

Supervisor: Lilian Tatiani Dusman Tonin

2013-2016: B.Sc. in Chemistry, Department of Chemistry, Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), Apucarana, Brazil.

Supervisor: André Luiz Tessaro

Project title: *Synthesis, Characterization, and Evaluation of Silver Nanoparticles Using Pluronic F-127*

2010-2012: Technical Diploma in Biotechnology, Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado, Campinas, Brazil.

Supervisor: Mara Simi Rossin

Project title: *Medicines: Cure or Problem? Promoting Proper Medication Disposal and Preventing Environmental and Public-Health Risks*

GRANTS AND FELLOWSHIPS

2026: Academic Excellence Award – UNESP

2023-2024: São Paulo Research Foundation (FAPESP) – Ph.D. Overseas Research Fellowship (Canada) – Grant no. 23/05092-2.

São Paulo State University (UNESP), Institute of Chemistry, Araraquara, Brazil

Project title: *Development of a fiber-optic nanobiosensor using upconversion nanoparticles (UCNPs) to detect E. coli as a portable, rapid-response, and cost-effective alternative to traditional methods.*

Supervisor: Sidney Jose Lima Ribeiro (UNESP) and Younes Messadeq (Université Laval)

2021: Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) – Teaching Assistant Fellowship (General Chemistry Laboratory), São Paulo State University (UNESP), Institute of Chemistry, Araraquara, Brazil.

Supervisor: Marcelo Nalin

2020-2025: São Paulo Research Foundation (FAPESP) – Ph.D. Research Fellowship (Brazil) – Grant no. 20/14009-3.

São Paulo State University, Institute of Chemistry, Araraquara, Brazil

Project title: *Smart food-packaging development for bacterial sensing based on upconversion nanoparticles and silver nanowires.*

Supervisor: Sidney Jose Lima Ribeiro

2020-2022: São Paulo Research Foundation (FAPESP) – Research Grant (Grant no. 19/15227-7).

Project title: *Additive Manufacturing for Human Health: Sensors, Biosensors, and Active/Intelligent Food Packaging.*

Principal Investigator: Sidney Jose Lima Ribeiro

2020-2021: Virtual University of the State of São Paulo (UNIVESP), São Paulo, Brazil – Teaching Assistant Fellowship.

2017-2018: Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), Master's Fellowship.

State University of Maringá (UEM), Maringá, Brazil.

Supervisors: Edvani Curti Muniz and Alessandro Francisco Martins

Dissertation title: *Chitosan/Carrageenan/Curcumin-Based Materials Prepared via Precipitation from Miscible Mixtures in an Ionic Liquid*

2015-2016: Office of Undergraduate Studies (PROGRAD) – Undergraduate Research Funding.

Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), Brazil.

Project title: *Synthesis, Characterization, and Evaluation of Silver Nanoparticles Using Pluronic F-127.*

Supervisor: André Luiz Tessaro

2014-2016: Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), PIBID Teaching Initiation Fellowship Program.

Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), Apucarana, Brazil.

Supervisor: Lilian Tatiani Dusman Tonin

PUBLISHED PAPERS

- 1. RAMIN, B. B. S.;** KIM, S.; KONINCK, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. A 3D-engineered fiber-integrated SERS material architecture enabling on-probe calibration and regeneration for quantitative detection in biologically complex liquids. *Chemical Engineering Journal*, v. 542, 2026.
- 2. Cover Feature – ACS Omega:** SANTOS, W. G.; PEREIRA, L. H.; **RAMIN, B. B. S.;** BOTELHO, S. M.; MORAIS, S. T. B.; CARDOSO, D. R.; SANTAGNELI, S. H.; FERREIRA, F. F.; LEITÃO, A.; RIBEIRO, S. J. L. Pyrylazo Dye: A Novel Azo Dye Structure with Photoinduced Proton Release and Highlighted Photophysical Properties in Biological Media. *ACS Omega*, v. 10, p. 2517-2527, 2025.
- 3. Inside Back Cover – ACS Applied Bio Materials:** ABUÇAFY, M. P.; **RAMIN, B. B. S.;** GRAMINHA, A. E.; SANTOS, W. G.; FREM, R. C. G.; NETTO, A. V. G.; PEREIRA, J. C. M.; RIBEIRO, S. J. L. Core-Shell UCNP@MOF Nanoplatfoms for Dual Stimuli-Responsive Doxorubicin Release. *ACS Applied Bio Materials*, v. 8, p. 2954-2964, 2025.
- 4. RAMIN, B. B. S.;** SANTOS, W. G.; MESSADDEQ, Y.; DEFFUNE, E.; MORAES, M. L.; RIBEIRO, S. J. L. Layer-by-layer assembly of NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ UCNPs@Cystein and UCNPs@Cys-Ab as hybrid bio-optical sensors for E. coli bacteria. *Journal of Luminescence*, v. 271, p. 120590, 2024.
- 5. RAMIN, B. B. S.;** RUFATO, K. B.; SABINO, R. M.; POPAT, K. C.; KIPPER, M. J.; MARTINS, A. F.; MUNIZ, E. C. Chitosan/iota-carrageenan/curcumin-based materials performed by precipitating miscible solutions prepared in ionic liquid. *Journal of Molecular Liquids*, v. 290, p. 111199, 2019.

6. DA CRUZ, J. A.; DA SILVA, A. B.; **RAMIN, B. B. S.**; SOUZA, P. R.; POPAT, K. C.; ZOLA, R. S.; KIPPER, M. J.; MARTINS, A. F. Poly (vinyl alcohol)/cationic tannin blend films with antioxidant and antimicrobial activities. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, v. 107, p. 110357, 2019.

PUBLISHED BOOK CHAPTER

RAMIN, B. B. S.; TONIN, L. T. D. Relato de experiência: olhar de uma bolsista do projeto PIBID de Química no Colégio Estadual Nilo Cairo. In: André Luis Trevisan; Angélica Cristina Rivelini; Roseli Gall do Amaral. O pedagógico entra em cena na Universidade Tecnológica: Experiências em Ensino, Pesquisa e Extensão na UTFPR Câmpus Apucarana. 1st ed. Apucarana: Platão Gráfica, 2015. p. 183–188.

SUPERVISION ACTIVITIES – UNDERGRADUATE

1. Drone via Wi-Fi or Cable: Prototype of a Cable-Driven Drone Controlled by Smartphone for Urban or Rural Areas. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
2. Traffic Light System for Flood-Prone Areas. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
3. Analysis of the Applicability of the Data Protection Law in Companies with Emphasis on Process Implementation. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
4. Network Vulnerability in Home Office Environments. Undergraduate Thesis - Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
5. Classroom Automation via Voice Command. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.

EXAMINATION COMMITTEES – UNDERGRADUATE

1. Use of Water Treatment Plant Sludge as a Raw Material for Brick Production in Civil Construction. Production Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2022.
2. The Contributions of Storytelling to the Teaching and Learning Process of Reading and Writing. Pedagogy, Virtual University of the State of São Paulo, 2022.
3. Development of a Detachable Irrigation System for Family Farming. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2022.
4. Development of an Educational Electronic Game to Teach Basic Electronics Concepts to Children. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2022.
5. Accident Monitoring through GPS Coordinates. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2022.
6. Water Flow Control in Residential Pipelines. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2022.
7. Optimization of Salmonella Analysis in a Microbiology Laboratory. Production Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2022.
8. Classroom Automation via Voice Command. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
9. Traffic Light System for Flood-Prone Areas. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
10. Drone via Wi-Fi or Cable: Prototype of a Cable-Driven Drone Controlled by Smartphone for Small Urban or Rural Areas. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
11. Analysis of the Applicability of the Data Protection Law in Companies with Emphasis on Process Implementation. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
12. Network Vulnerability in Home Office Environments. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
13. Pedagogical Political Project: Its Importance and Relationship with Democratic Management and Learning. Pedagogy, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.

14. Proposal for a Didactic Activity Using the Abacus in Mathematical Operations. Mathematics, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
15. Advantages and Challenges of Using ICT in the Teaching and Learning Process in Elementary Education. Pedagogy, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
16. Analysis of a Cultural Competition Focused on Mathematics to Promote Content Retention. Mathematics, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.
17. Use of the Arduino Platform as a Learning Tool. Computer Engineering, Virtual University of the State of São Paulo, 2022.
18. Environmental Education and Natural Science Teaching for Elementary School: Lesson Plan Focused on Solid Waste Management. Pedagogy, Virtual University of the State of São Paulo, 2021.

CONFERENCE EVALUATIONS

1. XXXVII Scientific Initiation Congress of São Paulo State University (UNESP). Institute of Chemistry, Araraquara. 2025.
2. XXII Symposium on the Experimental Basis of Natural Sciences. Federal University of ABC, São Paulo. 2024.
3. XXXV Scientific Initiation Congress of São Paulo State University (UNESP). Institute of Chemistry, Araraquara. 2023.
4. XXXIV Scientific Initiation Congress of São Paulo State University (UNESP). Institute of Chemistry, Araraquara. 2021.

CONFERENCE PRESENTATIONS

ABUÇAFY, M. P.; **RAMIN, B. B. S.**; RIBEIRO, S. J. L. Luminescent and promising antimicrobial composite based on UCNPs, ZnO, and Metal-Organic Frameworks. 48^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2025.

ABUÇAFY, MARINA P.; **RAMIN, BEATRIZ B. S.**; RIBEIRO, S. J. L. MOF-Integrated UCNPs-ZnO nanostructure for dual-action photodynamic therapy. 4th International School on Porous Materials MOF school. 2025.

RAMIN, B. B. S.; KIM, S.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. 3D Structured Fiber Optic SERS Probes Fabricated by Laser-Induced Growth for Contamination-Free Water Quality Monitoring. SolGel 2024 Conference. 2024.

RAMIN, B. B. S.; SANTOS, W. G.; MORAES, M. L.; RIBEIRO, S. J. L. Layer-by-Layer Assembly of NaYF₄:Yb/Er UCNPs@Cysteine and Antibody: A Sensor For Escherichia Coli Bacteria. 46^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 2023.

RAMIN, B. B. S.; MORAES, M. L.; SANTOS, WILLY G.; BARUD, H. S.; RIBEIRO, S. J. L. Synthesis and surface modification of NaYF₄:Yb,Er nanoparticles for biological applications. XX Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. 2023.

ABUÇAFY, M. P.; **RAMIN, B. B. S.**; GRAMINHA, A. E.; FREM, R. C. G.; RIBEIRO, S. J. L. Upconversion Nanoparticle@Metal Organic Framework (UCNP@MOF) core-shell nanostructures as theranostic materials for treatment and imaging of cancer. XXI Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. 2023.

ABUÇAFY, M. P.; **RAMIN, B. B. S.**; FREM, R. C. G.; RIBEIRO, S. J. L. Development of core-shell UCNPs@MOF theranostic system for application in cancer treatment. I Simpósio de Nanotecnologia aplicada à Nanomedicina e ao Agronegócio (SiNMA). 2022.

CONFERENCE ORGANIZING COMMITTEE

1. 12th NanoAndes Workshop: Photonics and Applications. São Paulo State University (UNESP) - Institute of Chemistry, Araraquara. 2021.
2. Chemistry and the Environment. Federal University of Technology - Paraná (UTFPR), Apucarana, 2015.
3. III Week of Chemistry Technology. Federal University of Technology - Paraná (UTFPR), Apucarana, 2015

Aos meus pais, que sempre me apoiaram, apesar de todas as dificuldades, e sem os quais nada disso teria sido possível. Ao meu companheiro, Adriano, por seu amor, apoio incondicional e parceria ao longo do doutorado.

AGRADECIMENTOS

Minha trajetória acadêmica, especialmente durante o doutorado, foi muito difícil e marcada por desafios, incertezas e muitos conflitos internos. Escrevi estes agradecimentos aos poucos, ao longo dos anos, e, nos momentos em que pensei que não conseguiria continuar, reler estas palavras me fazia lembrar de quantas pessoas estavam ao meu lado. Hoje, olhando para tudo o que vivi até chegar aqui, sei que as palavras nunca serão suficientes para agradecer a todos como eu gostaria. Mas tenho certeza de uma coisa: se esta tese existe, é porque eu nunca estive sozinha.

Em primeiro lugar e, acima de tudo, quero agradecer ao meu orientador, professor Sidney. Comecei o doutorado em meio à pandemia e, logo no início, me vi sem bolsa e sem saber se conseguiria continuar. Em um dos momentos mais difíceis dessa trajetória, enviei a ele um e-mail dizendo que estava desistindo do doutorado. O professor Sidney me apoiou imediatamente e me ajudou a conseguir uma bolsa, tornando possível que eu continuasse. Nunca vou me esquecer disso. Mais tarde, ele também me incentivou a submeter um projeto à FAPESP, que acabou sendo aprovado. Esse apoio mudou completamente o rumo do meu doutorado e, de muitas formas, também mudou a minha vida. Foi graças a esse caminho que pude realizar o sonho de estudar no exterior, uma experiência que me transformou tanto como pesquisadora quanto como pessoa. Por tudo isso, sou profundamente grata por ele ter me ajudado justamente nos momentos em que eu mais precisei e por ter contribuído de forma tão importante para que eu pudesse chegar até aqui.

Também sou muito grata à UNIVESP pelo apoio financeiro proporcionado por minha atuação como professora assistente e à FAPESP pelas bolsas concedidas para o desenvolvimento da minha pesquisa no Brasil e no exterior (Processos 2020/14009-3; 2021/0811-2 e 2023/05092-2). Esse apoio foi essencial para que eu pudesse realizar este trabalho e viver experiências que contribuíram enormemente para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Sou também profundamente grata ao professor Younes por ter me acolhido durante meus estágios de pesquisa na Université Laval com muita generosidade e disponibilidade ao longo desse período. Sempre me lembrarei de sua gentileza com que me recebeu e da maneira como ele e seu grupo me ajudaram a me adaptar a um novo ambiente. Sou especialmente grata pelas reuniões em que me orientou e pela ajuda com o inglês durante esses encontros. O período que passei lá foi uma

das experiências mais felizes e significativas da minha vida, e sempre me lembrarei dele com carinho, orgulho e gratidão.

Durante esse período, também tive o privilégio de trabalhar diretamente com Sanggon, e é difícil colocar em palavras o tamanho da minha gratidão por ele. Sanggon foi a pessoa que mais me ensinou dentro de um laboratório. Sempre muito profissional, justo, paciente e disposto a ajudar, compartilhou comigo tudo o que sabia com uma generosidade enorme. Praticamente tudo o que aprendi sobre fibras ópticas e SERS veio dessa experiência: dos treinamentos no laboratório às discussões dos resultados, dos pequenos detalhes experimentais às explicações teóricas, sempre dadas de uma forma clara e cuidadosa. Seu apoio foi muito além da pesquisa. Sou muito grata por ele ter me apresentado à sua família, à sua esposa tão amável e às suas filhas fofas, que me receberam com tanto carinho. Seus conselhos e conversas sobre a vida me ajudaram a crescer como pesquisadora e também me fizeram perceber, ainda mais, o quanto eu amo fazer ciência. É uma daquelas gratidões que eu sei que nunca vou conseguir explicar completamente em palavras.

Sou igualmente grata a todos os professores que contribuíram para minha formação ao longo da minha trajetória acadêmica. Gostaria de agradecer especialmente ao meu primeiro orientador, professor André, que supervisionou minha iniciação científica e me ensinou tanto no laboratório, sempre com paciência, tranquilidade e dedicação. Gostaria também de agradecer ao meu coorientador de mestrado, professor Alessandro, que, embora não tenha participado diretamente do meu doutorado, me ensinou muito sobre escrita científica. Para mim, o professor Alessandro é um exemplo de resiliência diante das adversidades, de alguém que trabalha com aquilo que ama e torna esse amor visível tanto no ensino quanto na pesquisa. Sempre o admirei, e ele continua sendo uma inspiração para mim. Agradeço à professora Marli pelo apoio no desenvolvimento do primeiro artigo deste doutorado e à professora Elenice pelo fornecimento do anticorpo utilizado nesse estudo. Suas contribuições foram importantes para a realização desta etapa da pesquisa.

Nesse mesmo espírito de orientação e apoio, quero agradecer a dois amigos que, na prática, se tornaram meus coorientadores não oficiais: Willy e Gustavo. Ambos me apoiaram imensamente nos âmbitos acadêmico, profissional e pessoal, tanto por meio de contribuições científicas quanto pelo suporte emocional. Sem eles, sinceramente, não sei o que teria sido deste doutorado; acredito que talvez eu nem estivesse escrevendo esta tese hoje. Agradeço ao Willy, que desempenhou um papel fundamental no início do meu doutorado, orientando-me no desenvolvimento do trabalho, nas

análises e até mesmo na escrita do artigo. Nossas conversas e até mesmo nossas fofocas me davam energia para continuar, e sinto muita falta dessa companhia. Agradeço ao Gustavo por seu apoio desde o mestrado, especialmente durante o período em que eu me preparava para o processo seletivo do doutorado, sempre me oferecendo conselhos valiosos sobre a vida no laboratório, os caminhos acadêmicos e a escrita.

Agradeço também aos meus alunos da UNIVESP, especialmente aos meus alunos de trabalhos de conclusão de curso tive a oportunidade de orientar. Sou grata pela confiança e pela paciência durante todo o processo de orientação, muitas vezes em uma área bastante distante da minha formação principal. Muitos deles foram extremamente dedicados e esforçados: chegavam às reuniões cansados depois do trabalho e, ainda assim, permaneciam totalmente empenhados em discutir seus projetos e esclarecer suas dúvidas. O esforço e a confiança de vocês significaram muito para mim. Agradeço também ao Armando e ao meu noivo, que, durante esse período, me ajudaram a esclarecer dúvidas para que eu pudesse ministrar disciplinas na área de Engenharia de Computação.

Minha gratidão se estende também aos técnicos que, de diferentes maneiras, tornaram este trabalho possível. Meus sinceros agradecimentos ao Rafael, do IQ-Unesp, por todas as conversas e fofocas e, especialmente, por sua ajuda na compra dos reagentes, que muitas vezes levavam meses para chegar e exigiam cobranças constantes aos fornecedores. Sou profundamente grata ao Stéphanie, da Université Laval, pela paciência em me ajudar a obter quase 3.000 imagens de microscopia eletrônica de varredura, por realizar as análises até mesmo fora de seu horário habitual e por ser sempre tão gentil, prestativo e acolhedor, recebendo-me com um sorriso no rosto todas as vezes que eu chegava para realizar as análises. Agradeço também às secretárias do IQ-Unesp, Denise, Wenia e Isabel, por serem sempre tão solícitas diante das burocracias, dos documentos e das exigências institucionais que sustentam silenciosamente uma tese muito antes de ela se transformar em um volume encadernado.

Ao longo do caminho, também tive a sorte de estar cercada por colaborações e amizades que tornaram essa trajetória mais leve, mais acolhedora e, em alguns momentos, simplesmente possível. Agradeço ao meu filho acadêmico do coração, Renan, pela parceria, pelos erros e acertos que compartilhamos e por ser o Batman da nossa dupla. Agradeço à minha amiga de laboratório Marina por todas as conversas, pela escuta sempre atenta, pelo carinho e pelo apoio constante, que foram

essenciais para que eu encontrasse forças para seguir em frente. Agradeço também à Roberta por todo o apoio durante a apresentação da minha defesa. Suas dicas, seu acolhimento e sua presença foram especialmente importantes naquele momento. Agradeço ao York, que me ajudou no início do doutorado com a síntese das nanopartículas de conversão ascendente e sempre foi generoso e disponível. Agradeço à Francine, uma amiga querida que encontrei no IQ, pela companhia, pela amizade e por ter ido comigo tantas vezes ao meu bar favorito, mesmo sem gostar de lá. Agradeço também à Debora por tantos anos de conversas, conselhos e apoio emocional.

Sou também profundamente grata aos amigos que fiz durante meu período de intercâmbio na Université Laval, que me acolheram desde o primeiro dia e fizeram com que um lugar estrangeiro parecesse mais gentil e menos distante. Agradeço especialmente a Anees e Ali por toda a ajuda durante a mudança e pela companhia, e ao Gabriel pelo apoio no laboratório durante minha segunda estadia em Québec.

Minha mais profunda gratidão é dedicada à minha família, que sustentou essa trajetória de tantas maneiras que seria impossível enumerá-las. Agradeço aos meus pais que, mesmo diante das dificuldades, sempre me incentivaram a não desistir dos estudos e acreditaram em mim até mesmo nos momentos em que eu própria deixei de acreditar. Agradeço à minha tia e madrinha, Elizabetth, por ser uma referência em minha trajetória acadêmica e por ter me ensinado, desde cedo, que desistir dos estudos nunca seria uma opção. Ao meu irmão, Rafael, agradeço pelo companheirismo e por estar sempre disposto a me ajudar, especialmente pelas tantas caronas até a rodoviária. À minha amada avó, Orminda, que, embora já não esteja fisicamente presente, permaneceu comigo em meus pensamentos e continuou a me fazer companhia em meus sonhos. Minha avó sempre será minha pessoa favorita no mundo, e espero que, onde quer que esteja, possa sentir orgulho de mim. Agradeço à minha melhor amiga, Camila, por tantos anos de amizade, pelo incentivo constante e por celebrar cada uma das minhas conquistas como se também fossem suas. E, de maneira muito especial, agradeço ao meu noivo, Adriano, por todo o amor, companheirismo e incentivo que me ofereceu desde antes mesmo do início do doutorado. Seu apoio foi tão imenso e tão essencial ao longo dessa trajetória que seria impossível traduzi-lo plenamente em palavras. Amo todos vocês!

“O conhecimento serve para encantar as pessoas,
não para humilhá-las.”

-Mário Sérgio Cortella

RESUMO DA TESE

A detecção confiável de espécies biológicas e químicas em meios aquosos complexos permanece um desafio na ciência analítica, uma vez que interferências da matriz podem comprometer a estabilidade, a reprodutibilidade e a interpretação do sinal. Esta tese aborda esse problema por meio do desenvolvimento de duas plataformas ópticas nanoestruturadas baseadas em mecanismos distintos de transdução: luminescência por conversão ascendente e espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS). A primeira plataforma foi baseada em nanopartículas de conversão ascendente dopadas com lantanídeos (UCNPs), funcionalizadas e organizadas em filmes multicamadas Layer-by-Layer para a detecção de *Escherichia coli* em meio aquoso. A arquitetura planar permitiu integrar as propriedades fotofísicas das UCNPs a uma interface de reconhecimento biológico. Os resultados mostraram que a resposta luminescente depende não apenas das propriedades emissivas das nanopartículas, mas também de sua funcionalização, imobilização e acessibilidade no filme, estabelecendo uma prova de conceito para o sensoriamento bacteriano. A segunda plataforma consistiu em uma sonda SERS integrada à fibra óptica e funcionalizada com uma arquitetura plasmônica hierárquica para a detecção quantitativa de pequenas moléculas orgânicas em líquidos biologicamente complexos. A combinação entre nanoestruturação e integração à fibra permitiu realizar excitação e coleta localizadas, reduzir interferências associadas ao fouling e regenerar *in situ* a interface sensora. Essa configuração possibilitou o uso repetido da mesma sonda e favoreceu medições diretas em meios líquidos, com maior controle da variabilidade do sinal. Em conjunto, os resultados demonstram que uma resposta analítica confiável depende da integração entre material ativo, organização interfacial e configuração óptica. Assim, esta tese apresenta duas estratégias de engenharia de plataformas nanoestruturadas aplicadas ao sensoriamento biológico e químico em meios aquosos complexos.

THESIS ABSTRACT

The reliable detection of biological and chemical species in complex aqueous media remains a challenge in analytical science because matrix interference can compromise signal stability, reproducibility, and interpretation. This thesis addresses this problem through the development of two nanostructured optical platforms based on distinct transduction mechanisms: upconversion luminescence and surface-enhanced Raman scattering (SERS). The first platform was based on lanthanide-doped upconversion nanoparticles (UCNPs), functionalized and organized in Layer-by-Layer multilayer films for the detection of *Escherichia coli* in aqueous media. The planar architecture enabled the integration of the photophysical properties of UCNPs with a biological recognition interface. The results showed that the luminescent response depends not only on the emissive properties of the nanoparticles, but also on their functionalization, immobilization, and accessibility within the film, establishing a proof of concept for bacterial sensing. The second platform consisted of a fiber-integrated SERS probe functionalized with a hierarchical plasmonic architecture for the quantitative detection of small organic molecules in biologically complex liquids. The combination of nanostructuring and fiber integration enabled localized excitation and signal collection, reduced interference associated with fouling, and allowed *in situ* regeneration of the sensing interface. This configuration enabled repeated use of the same probe and supported direct measurements in liquid media with improved control of signal variability. Taken together, the results demonstrate that a reliable analytical response depends on the integration of the active material, interfacial organization, and optical configuration. This thesis therefore presents two nanostructured platform-engineering strategies for biological and chemical sensing in complex aqueous media.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2D	bidimensional
3D	tridimensional
3HD	arquitetura hierárquica tridimensional (three-dimensional hierarchical architecture)
Ab	antibody (anticorpo)
AFM	atomic force microscopy (microscopia de força atômica)
AuNP/AuNPs	gold nanoparticle(s) (nanopartícula(s) de ouro)
Cys	cysteine (cisteína)
DFT	density functional theory (teoria do funcional da densidade)
EDS/EDX	energy-dispersive X-ray spectroscopy (espectroscopia de raios X por dispersão de energia)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
FEM	finite element method (método dos elementos finitos)
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy (espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)
LbL	Layer-by-Layer
LOD	limit of detection (limite de detecção)
LOQ	limit of quantification (limite de quantificação)
LSPR	localized surface plasmon resonance (ressonância plasmônica de superfície localizada)
MESP	molecular electrostatic potential surface (superfície de potencial eletrostático molecular)
NIR	near-infrared (infravermelho próximo)
NR/NRs	nanorod(s) (nanobastão(ões))
PCA	principal component analysis (análise de componentes principais)
PBS	phosphate-buffered saline (tampão fosfato-salino)
PCR	polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PVP	polyvinylpyrrolidone (polivinilpirrolidona)
PVS	polyvinyl sulphate (poli(vinil sulfato))
RB	Rhodamine B (rodamina B)
ROS	reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)
SEM	scanning electron microscopy (microscopia eletrônica de varredura)
SERS	surface-enhanced Raman scattering (espalhamento Raman intensificado por superfície)
SiμP/SiμPs	silica microparticle(s) (micropartícula(s) de sílica)
SNR	signal-to-noise ratio (razão sinal/ruído)
TEM	transmission electron microscopy (microscopia eletrônica de transmissão)
UCNP/UCNPs	upconversion nanoparticle(s) (nanopartícula(s) de conversão ascendente)
UV	ultraviolet (ultravioleta)
XRD	X-ray diffraction (difração de raios X)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA TESE	27
1. MOTIVAÇÃO	28
2. DESAFIOS CIENTÍFICOS E LACUNA DE PESQUISA	30
3. ESCOPO E ORGANIZAÇÃO DA TESE	32
4. OBJETIVOS DA TESE	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos.....	33
Referencial teórico.....	35
1. SENSORES QUÍMICOS E BIOCENSORES: FUNCIONAMENTO E DESEMPENHO ANALÍTICO	36
1.1 ELEMENTOS FUNCIONAIS DE UM SISTEMA SENSOR.....	36
1.1.1 Interpretação e quantificação do sinal	38
1.1.2 Confiabilidade do sensor em condições reais.....	39
1.2 SENSORIAMENTO ÓPTICO: PRINCÍPIOS DE INTERAÇÃO, LEITURA E LIMITAÇÕES	40
1.2.1 Constituição de um sistema de sensoriamento óptico	40
1.2.2 Fenômenos ópticos empregados na transdução.....	41
1.2.3 Vantagens, interferências e fontes de variabilidade	42
1.3 NANOPARTÍCULAS COMO ELEMENTOS FUNCIONAIS EM SENSORES ÓPTICOS.....	43
1.3.1 Composição, geometria e propriedades ópticas	43
1.3.2 Química superficial, estabilidade, reconhecimento e organização espacial.....	44
1.4 SENSORIAMENTO LUMINESCENTE E NANOPARTÍCULAS DE CONVERSÃO ASCENDENTE	46
1.4.1 Fundamentos da luminescência aplicada ao sensoriamento.....	46
1.4.2 Potencial analítico e limitações da luminescência convencional	48
1.4.3 Nanopartículas de conversão ascendente: composição e propriedades ópticas	50
1.4.4 Mecanismos de conversão ascendente	51
1.4.5 UCNPs e desempenho analítico de sensores luminescentes	52
1.5 SENSORIAMENTO SERS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	54
1.5.1 Fundamentos da espectroscopia Raman.....	55
1.5.2 Potencial analítico e limitações do Raman convencional.....	56
1.5.3 Nanopartículas plasmônicas: composição e propriedades ópticas	58
1.5.4 Princípios da intensificação SERS	59
1.5.5 Nanopartículas de ouro e desempenho analítico de sensores SERS	61
1.6 ENGENHARIA E INTEGRAÇÃO DE PLATAFORMAS ÓPTICAS NANOESTRUTURADAS	63
1.6.1 Filmes Layer-by-Layer como arquitetura de imobilização	65
1.6.2 Fibras ópticas como suporte e componente do sistema de leitura.....	68
1.6.3 Arquitetura da plataforma, heterogeneidade e desempenho analítico.....	70
REFERÊNCIAS.....	73
2. LAYER-BY-LAYER ASSEMBLY OF NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ UCNP@CYSTEIN AND UCNP@CYS-Ab AS HYBRID BIO-OPTICAL SENSORS FOR E. coli BACTERIA.....	78
2.1 ABSTRACT.....	79

2.2 INTRODUCTION	80
2.3 EXPERIMENTAL SECTION	81
2.3.1 Materials	81
2.3.2 Synthesis of NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺ UCNPs	82
2.3.3 UCNP surface modification with cysteine (Cys) and antibody (Ab)	82
2.3.4 Layer-by-Layer assembly of nanostructured films	83
2.3.5 Luminescence measurements using UCNP@Cys and UCNP@Cys-Ab LbL films	84
2.3.6 Apparatus	85
2.4 RESULTS AND DISCUSSION	86
2.4.1 Characterization and luminescence properties of modified nanoparticles	86
2.4.2 Emission properties of LbL films and their use as an E. coli biosensor	92
2.5 CONCLUSION	96
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS	96
REFERENCES	96
2.7 SUPPORTING INFORMATION	100
3. A 3D-ENGINEERED FIBER-INTEGRATED SERS MATERIAL ARCHITECTURE ENABLING ON- PROBE CALIBRATION AND REGENERATION FOR QUANTITATIVE DETECTION IN BIOLOGICALLY COMPLEX LIQUIDS	103
3.1 ABSTRACT	104
3.2 INTRODUCTION	105
3.3 EXPERIMENTAL SECTION	110
3.3.1 Synthesis of ZnO seeds	110
3.3.2 Synthesis of AuNPs and ligand exchange with PVP	110
3.3.3 Fabrication of structured fiber-optic SERS probes	110
3.3.4 SERS Measurement and Self-Cleaning Evaluation	113
3.3.5 Numerical simulation of relative SERS enhancement factor	114
3.4 RESULTS	115
3.4.1 Fabrication of 3HD SERS Nanostructures on Fiber Tips	116
3.4.2 SERS Sensitivity Enhancement through Engineered 3HD Architectures	119
3.4.3 Structural Exclusion of Biofouling via Engineered 3HD Architectures	124
3.4.4 UV-Driven Photocatalytic Regeneration of 3HD SERS Probes for Long-Term Reusability	127
3.5 CONCLUSION	131
3.6 ACKNOWLEDGEMENT	131
3.7 DATA AVAILABILITY	131
3.8 CONTRIBUTION	132
3.9 CONFLICT OF INTEREST	132
REFERENCES	132
3.10 SUPPORTING INFORMATION	135
REFERENCES	143
4. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	144

4.1 CONCLUSÕES GERAIS	145
4.2 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	146

APRESENTAÇÃO DA TESE

1. MOTIVAÇÃO

A detecção de espécies químicas e biológicas é uma demanda central em áreas como saúde pública, diagnóstico clínico, segurança alimentar, monitoramento ambiental, controle de processos industriais e bioanálise. Em situações de contaminação por bactérias, pequenas moléculas ou outras substâncias nocivas, o intervalo entre a coleta da amostra, a análise e a tomada de decisão pode ser determinante. Portanto, não basta apenas identificar um contaminante; é necessário detectá-lo de forma rápida e mensurável, preferencialmente por meio de procedimentos simples e de fácil aplicação. Embora métodos laboratoriais convencionais apresentem elevada precisão e robustez, eles frequentemente dependem de infraestrutura especializada, equipamentos de alto custo, preparo prévio da amostra, operadores treinados e tempos de análise relativamente longos. Nesse contexto, o desenvolvimento de sensores constitui uma estratégia relevante para tornar as análises mais ágeis e acessíveis. Esses dispositivos podem ser empregados na detecção de patógenos, contaminantes e outras moléculas de interesse, reduzindo o tempo de resposta e possibilitando medições próximas ao local de coleta. Com isso, os sensores podem contribuir para o diagnóstico, o controle de qualidade e o monitoramento ambiental.

Entre as diferentes abordagens, os sensores ópticos baseados em nanomateriais oferecem possibilidades de transdução por mecanismos como a emissão luminescente e a intensificação do espalhamento Raman. Entretanto, as propriedades ópticas observadas em nanopartículas dispersas ou sob condições controladas nem sempre são preservadas após sua funcionalização, imobilização e integração em uma plataforma sensora. Nesse cenário, fatores como a química de superfície, a organização interfacial, a acessibilidade do analito e o acoplamento entre o material ativo e o sistema óptico passam a determinar a resposta analítica. Assim, esta tese foi motivada pela necessidade de compreender como as propriedades ópticas dos nanomateriais podem ser convertidas em respostas mensuráveis em plataformas funcionais. Para investigar essa questão, foram desenvolvidos dois

sistemas baseados em mecanismos distintos de transdução, orientados pelo mesmo problema científico: *como ajustar a química de superfície, a organização da interface e a arquitetura da plataforma às características do analito, do meio de análise e da configuração de leitura óptica?*

2. DESAFIOS CIENTÍFICOS E LACUNA DE PESQUISA

A integração de nanomateriais em sensores ópticos envolve desafios que não se limitam à obtenção de sinais intensos. Após a funcionalização, a imobilização e a incorporação em uma plataforma, a resposta óptica passa a depender da organização da interface, da acessibilidade do analito, da estabilidade dos componentes e do acoplamento com o sistema de leitura.

No primeiro sistema, o desafio consistiu em transformar nanopartículas de conversão ascendente, inicialmente dispersas em solução, em uma plataforma sólida para a detecção de *Escherichia coli*. Métodos convencionais de detecção bacteriana podem exigir cultivo, equipamentos especializados e profissionais treinados, o que limita análises mais rápidas e acessíveis. Embora nanopartículas de conversão ascendente conjugadas a biomoléculas já fossem utilizadas em sistemas em solução, ainda havia a necessidade de compreender como sua funcionalização com um elemento de reconhecimento biológico e sua organização em filmes poderiam produzir uma resposta óptica sensível. A lacuna abordada foi, portanto, a integração entre emissão luminescente, reconhecimento por anticorpos e imobilização em filmes multicamadas, buscando converter a interação com a bactéria em uma alteração mensurável do sinal.

No segundo sistema, o problema esteve relacionado à detecção quantitativa de pequenas moléculas em líquidos biologicamente complexos por espalhamento Raman intensificado por superfície. Apesar da elevada sensibilidade da técnica SERS, plataformas convencionais podem apresentar distribuição irregular das regiões de intensificação, variação entre substratos, adsorção persistente dos analitos, baixa possibilidade de reutilização e interferência causada por partículas e microrganismos. As sondas SERS baseadas em fibras ópticas favorecem análises compactas e por imersão direta, mas muitas configurações ainda possuem uma região sensora limitada e preservam parte das dificuldades encontradas em substratos planos. A lacuna, nesse caso, estava na ausência de uma arquitetura integrada que reunisse elevada densidade de regiões ativas, maior uniformidade de

leitura, regeneração da superfície, calibração na própria sonda e redução da interferência de espécies de maior tamanho.

Dessa forma, os dois estudos foram orientados por uma lacuna comum: a necessidade de desenvolver interfaces capazes de preservar e explorar as propriedades ópticas dos nanomateriais após sua incorporação em plataformas sensoras. Essa questão foi investigada em duas escalas de analito e por dois mecanismos de transdução: a detecção de uma espécie biológica por variações de luminescência e a detecção de pequenas moléculas pela intensificação do espalhamento Raman.

3. ESCOPO E ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese está organizada em quatro capítulos. O Capítulo 1 apresenta a fundamentação teórica sobre sensores ópticos, nanopartículas de conversão ascendente, SERS e estratégias de integração de nanomateriais em filmes multicamadas e fibras ópticas. Os Capítulos 2 e 3 apresentam, respectivamente, o desenvolvimento de uma plataforma luminescente baseada em filmes Layer-by-Layer para detecção bacteriana e de uma plataforma SERS hierárquica integrada à fibra óptica para detecção quantitativa de pequenas moléculas em líquidos biologicamente complexos. O Capítulo 4 reúne as conclusões gerais, discute as contribuições e limitações dos estudos e apresenta as perspectivas decorrentes do trabalho. A organização da tese é sintetizada na Figura 1.

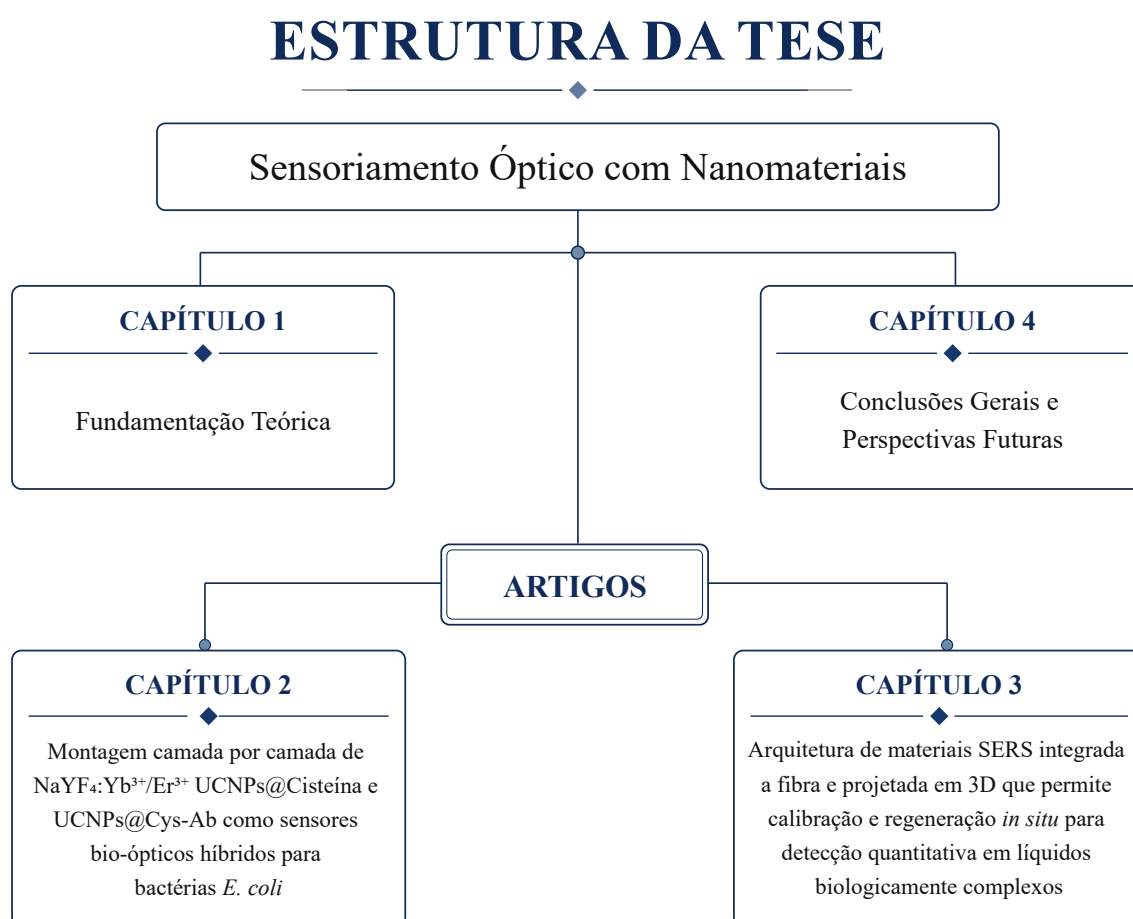


Figura 1. Representação esquemática da organização da tese. O Capítulo 1 apresenta a fundamentação teórica; os Capítulos 2 e 3 correspondem aos estudos experimentais baseados, respectivamente, em uma plataforma luminescente planar contendo UCNPs e em uma plataforma SERS hierárquica integrada à fibra óptica; e o Capítulo 4 reúne as conclusões gerais, limitações e perspectivas do trabalho.

4. OBJETIVOS DA TESE

4.1 Objetivo geral

Desenvolver e investigar plataformas sensoras ópticas baseadas em nanomateriais, avaliando como a funcionalização da superfície, a organização interfacial e a arquitetura dos materiais podem ser ajustadas para converter a interação com analitos químicos e biológicos em respostas ópticas mensuráveis.

4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de conversão ascendente de composição $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ e avaliar suas propriedades estruturais e luminescentes.
- Modificar a superfície dessas nanopartículas com cisteína e anticorpos anti-E. coli, de modo a incorporar uma interface de reconhecimento biológico.
- Imobilizar as nanopartículas funcionalizadas em filmes multicamadas e avaliar a influência da organização do material e da presença dos anticorpos na resposta óptica à E. coli.
- Investigar a variação da emissão luminescente dos filmes em função da concentração bacteriana e avaliar seu desempenho como plataforma bio-óptica.
- Desenvolver sondas SERS integradas a fibras ópticas com diferentes organizações superficiais, desde estruturas bidimensionais até uma arquitetura hierárquica tridimensional.
- Integrar micropartículas de sílica, nanobastões de ZnO e nanopartículas de ouro na extremidade da fibra, buscando aumentar a área ativa, a densidade de regiões de intensificação e a interação entre o analito e o material sensor.
- Avaliar a influência da arquitetura tridimensional e da química de superfície sobre a intensidade, a uniformidade e a estabilidade da resposta SERS.
- Investigar a detecção de pequenas moléculas por imersão direta da sonda em líquidos contendo microrganismos, considerando a interferência causada pela complexidade do meio.

- Avaliar a regeneração fotocatalítica da superfície sensora, sua reutilização em ciclos sucessivos e a possibilidade de realizar a calibração e a análise utilizando a mesma sonda.
- Relacionar, nos dois sistemas estudados, a composição dos materiais, a organização das interfaces e a configuração de leitura com o desempenho analítico das plataformas desenvolvidas.

CAPÍTULO 1



01

Referencial teórico

Sensores químicos e biossensores: funcionamento e desempenho analítico



1. SENSORES QUÍMICOS E BIOSSENSORES: FUNCIONAMENTO E DESEMPENHO ANALÍTICO

1.1 ELEMENTOS FUNCIONAIS DE UM SISTEMA SENSOR

Um sensor pode ser compreendido como um sistema que transforma uma informação difícil de perceber diretamente, como a presença de uma molécula em baixa concentração, em um sinal mensurável. Esse sinal pode ser elétrico, óptico, mecânico ou químico e deve permitir identificar se determinado analito está presente e, quando possível, estimar sua quantidade.¹ A entidade de interesse é denominada analito e pode ser uma molécula, um íon, uma partícula, uma célula ou outro alvo definido. Na prática, o analito está inserido em uma matriz, que compreende todos os componentes da amostra, como solventes, sais, macromoléculas, partículas e demais constituintes da amostra. A matriz modifica sua difusão, a disponibilidade para ligação, a estabilidade da interface e a propagação da luz.² O elemento de reconhecimento interage preferencialmente com o alvo; o transdutor converte esse evento em uma alteração mensurável; o sistema de aquisição registra a alteração; e o processamento relaciona o sinal à presença ou à quantidade do analito.³

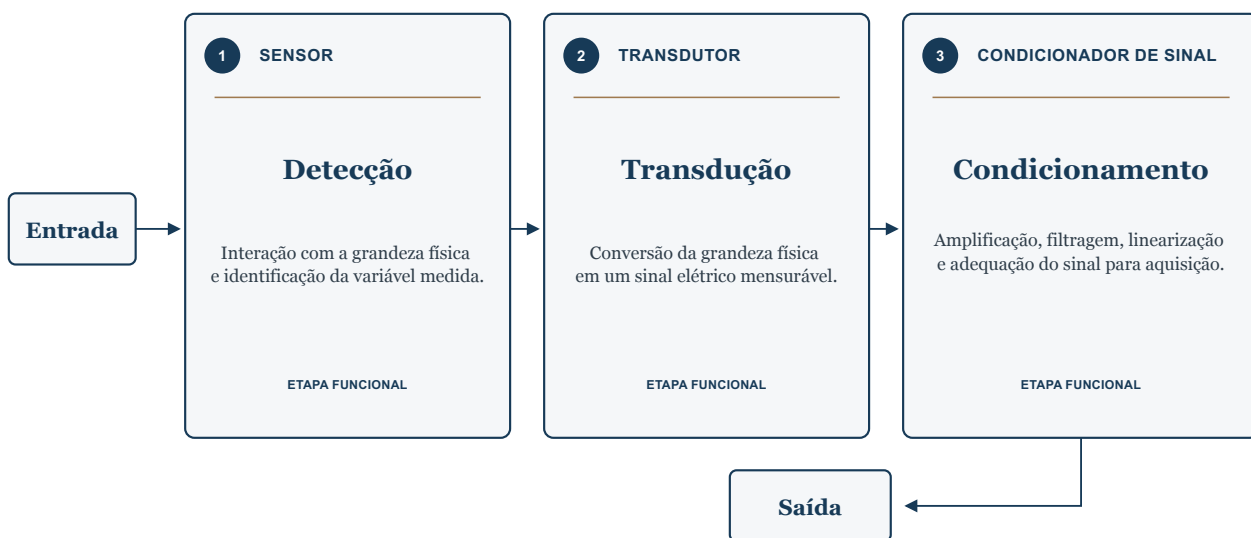
A natureza do reconhecimento diferencia sensores químicos e biossensores. Nos sensores químicos, o reconhecimento ocorre por meio de interações químicas ou físico-químicas entre o analito e o material sensor. Nos biossensores, essa etapa envolve componentes biológicos ou estruturas que reproduzem interações biológicas, como anticorpos, enzimas, ácidos nucleicos e aptâmeros.⁴ Apesar dessa diferença, ambos seguem a mesma sequência fundamental: o analito interage com uma região ativa do dispositivo, essa interação é convertida em uma alteração mensurável por um processo denominado transdução e, em seguida, o sinal é registrado e transformado em um resultado interpretável.⁵ Além disso, reconhecimento e transdução não podem ser tratados de forma isolada: composição e estabilidade do material, densidade e orientação dos ligantes, acessibilidade dos sítios

ativos e transporte do analito pela matriz determinam a magnitude, a seletividade e a reprodutibilidade da resposta.

Um exemplo simples ajuda a separar essas funções. Um anticorpo imobilizado pode reconhecer uma proteína específica, mas essa ligação sozinha não produz necessariamente um sinal. Para que exista um biossensor óptico, o evento de ligação precisa modificar uma grandeza observável, como intensidade de emissão, posição de uma banda, espalhamento ou índice de refração. O reconhecedor funciona como o componente que distingue o alvo; o transdutor funciona como o componente que torna essa distinção visível ao instrumento. Se o alvo for reconhecido, mas a alteração óptica for menor que o ruído, haverá reconhecimento químico sem desempenho analítico útil.

Cadeia funcional de um sistema de medição

Da interação com a grandeza física à obtenção de um sinal interpretável



Fluxo simplificado das etapas de detecção, transdução e condicionamento do sinal.

Figura 1.1. Representação esquemática dos principais componentes e etapas envolvidas no funcionamento de um sensor: entrada do analito ou estímulo, detecção pelo elemento sensor, transdução do evento de reconhecimento, processamento do sinal e geração de uma resposta interpretável. Adaptado da referencia.⁶

1.1.1 Interpretação e quantificação do sinal

Uma alteração no sinal após o contato do sensor com o analito não comprova, isoladamente, sua utilidade analítica. Antes de atribuir essa resposta à presença ou à concentração do alvo, é necessário caracterizar o sistema na ausência do analito. O sinal basal corresponde ao nível registrado antes de sua contribuição, enquanto o branco é uma amostra sem o alvo, mas submetida aos mesmos materiais, reagentes e procedimentos. Também devem ser considerados o ruído, associado a variações aleatórias, e a deriva, caracterizada por mudanças graduais do sinal ao longo do tempo. O desafio é semelhante ao de identificar uma voz fraca em um ambiente ruidoso: não basta registrar um som; é necessário demonstrar que ele se distingue do fundo, varia de forma previsível e pode ser reconhecido repetidamente.³

Após diferenciar a resposta do sinal de fundo, estabelece-se sua relação com a concentração por meio da calibração, realizada com amostras de valores conhecidos. A sensibilidade de calibração expressa quanto o sinal varia em função da concentração e, em uma relação linear, corresponde à inclinação da reta de calibração. Assim, um sinal intenso não implica necessariamente alta sensibilidade, pois respostas elevadas podem apresentar diferenças pequenas entre concentrações próximas. A avaliação deve considerar conjuntamente a variação do sinal, o ruído e a repetibilidade das medições.¹

A relação entre concentração e resposta pode deixar de ser linear em razão de fenômenos como saturação, limitações no transporte do analito ou alterações no material sensor. A faixa linear corresponde ao intervalo adequadamente descrito por uma reta, enquanto a faixa de trabalho abrange as concentrações nas quais o método apresenta desempenho aceitável, inclusive quando um modelo não linear validado é empregado.⁷ A calibração também permite estimar o limite de detecção (LOD), definido como o menor nível de analito distinguível do branco segundo um critério estatístico, e o limite de quantificação (LOQ), correspondente à menor concentração estimável com

precisão e incerteza adequadas. Portanto, detectar indica demonstrar a presença do analito, enquanto quantificar exige atribuir-lhe uma concentração confiável.⁸

1.1.2 Confiabilidade do sensor em condições reais

O desempenho observado em soluções controladas não garante resultados equivalentes em amostras reais. A seletividade representa a capacidade do método de responder ao analito na presença de outras substâncias e depende do sistema completo, incluindo o elemento de reconhecimento, o nanomaterial, o procedimento, a matriz e as condições de medição. Interferentes podem competir pelos locais de ligação, adsorver na superfície, modificar as condições químicas da amostra, gerar sinal próprio ou comprometer a estabilidade do sensor. Por isso, os ensaios devem incluir substâncias plausíveis para a aplicação, em concentrações próximas às encontradas nas matrizes de interesse.⁹

A confiabilidade também requer resultados consistentes e próximos de um valor de referência. A precisão expressa a concordância entre medições repetidas, enquanto a veracidade indica a proximidade entre a média dos resultados e o valor de referência.¹⁰ Um método pode apresentar resultados semelhantes entre si e, ainda assim, permanecer sistematicamente afastado do valor correto. A precisão pode ser avaliada como repetibilidade, sob as mesmas condições; precisão intermediária, com variações entre dias, operadores, equipamentos ou lotes no mesmo laboratório; e reprodutibilidade, em condições mais amplas. Em sensores nanoestruturados, essa análise deve considerar a variabilidade entre regiões do substrato, dispositivos e lotes de fabricação, e não apenas leituras repetidas em um mesmo ponto.¹¹ Outros parâmetros indicam se o desempenho pode ser mantido durante o uso. A robustez avalia a influência de pequenas variações experimentais, como mudanças de pH, temperatura ou tempo de incubação, enquanto a estabilidade verifica a conservação das propriedades do sensor durante o armazenamento e a utilização. O tempo de resposta, por sua vez, deve ser definido por um critério objetivo, como o período necessário para atingir uma fração estabelecida do sinal de equilíbrio, e não apenas pelo primeiro desvio detectável.¹²

Em conjunto, esses critérios demonstram que a utilidade analítica de um sensor depende de sua capacidade de distinguir e quantificar o analito com seletividade, consistência e estabilidade. Essa avaliação exige compreender como o sinal é gerado e convertido em uma medida.

1.2 SENSORIAMENTO ÓPTICO: PRINCÍPIOS DE INTERAÇÃO, LEITURA E LIMITAÇÕES

1.2.1 Constituição de um sistema de sensoriamento óptico

No sensoriamento óptico, a luz atua simultaneamente como sonda da amostra e como portadora da informação analítica. Uma fonte, como lâmpada, LED ou laser, fornece radiação com intensidade, faixa espectral e estabilidade adequadas à medição. Elementos ópticos conduzem e condicionam essa radiação até a amostra, a superfície funcionalizada ou o material sensor, onde a interação entre luz, material e analito pode modificar a intensidade, o espectro, a direção de propagação ou o tempo de decaimento da emissão.¹³

A radiação resultante é coletada por um sistema de detecção, que pode incluir fotodiodos, câmeras ou espectrômetros, e convertida em sinal elétrico. Lentes, filtros, fibras, fendas e polarizadores controlam a região iluminada e a fração de luz que alcança o detector. Entretanto, o sinal medido somente adquire significado analítico quando comparado a um branco, a uma referência ou a um modelo de calibração.¹⁴ A Figura 1.2 sintetiza essa sequência, desde a geração da luz até a obtenção da informação sobre presença, concentração ou composição do analito.

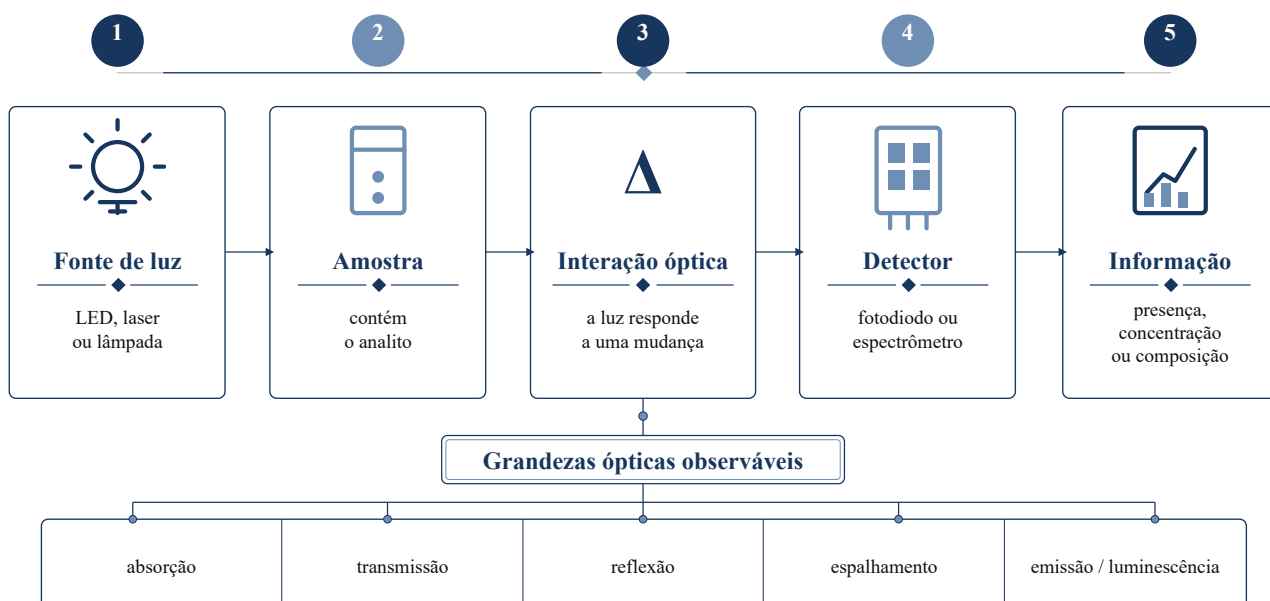


Figura 1.2. Constituição funcional de um sistema de sensoriamento óptico. A radiação emitida pela fonte atinge a amostra ou a região sensora, onde a interação com o analito modifica absorção, transmissão, reflexão, espalhamento ou emissão. O detector registra a radiação resultante, e o processamento converte o sinal em informação analítica qualitativa ou quantitativa.

A integração desses componentes permite medições locais ou remotas, em tempo real e com pequenos volumes de amostra, favorecendo aplicações em diagnóstico, bioanálise, alimentos, monitoramento ambiental e controle de processos. Essas vantagens dependem, contudo, da matriz, do comprimento de onda e da configuração instrumental. Além disso, a ausência de contato elétrico direto não garante uma análise não invasiva, pois a radiação pode aquecer, fotodegradar ou modificar a amostra.¹⁵

1.2.2 Fenômenos ópticos empregados na transdução

A transdução óptica ocorre quando a interação com o analito modifica uma propriedade mensurável da luz. Na absorção, parte da energia da radiação é transferida à matéria quando a energia dos fótons é compatível com uma transição molecular ou eletrônica. A transmissão corresponde à fração de luz que atravessa o sistema e resulta do balanço entre absorção, reflexão, espalhamento e

outras perdas. Por isso, uma redução da luz transmitida não deve ser atribuída automaticamente à absorção do analito.¹⁶

Na reflexão, a luz retorna de uma interface. Ela pode ser predominantemente especular, quando preserva uma direção definida, ou difusa, quando irregularidades e heterogeneidades redistribuem a radiação. No espalhamento, a luz também muda de direção, mas sem retornar necessariamente pela interface. Em processos elásticos, como o espalhamento Rayleigh, sua energia permanece praticamente inalterada; em processos inelásticos, como o Raman, ocorre troca de energia com os modos internos da matéria.¹⁷

Na emissão, o material previamente excitado retorna a um estado de menor energia liberando radiação. A resposta pode ser avaliada pela intensidade, pela posição ou forma das bandas, pela razão entre sinais ou pelo tempo de vida do estado excitado. A obtenção de um espectro completo fornece mais informações e facilita a identificação de interferências, enquanto a leitura em um único comprimento de onda é mais simples e rápida, porém mais dependente da estabilidade da fonte, do alinhamento e da escolha da região espectral.¹⁸

1.2.3 Vantagens, interferências e fontes de variabilidade

Sensores ópticos podem apresentar resposta rápida, elevada sensibilidade, multiplexação e compatibilidade com sistemas remotos ou miniaturizados. Essas características, entretanto, dependem da eficiência de excitação, da quantidade de luz coletada, da intensidade do fundo e da estabilidade do material sensor. Irradiâncias elevadas ou tempos prolongados de exposição também podem provocar aquecimento e fotodegradação, alterando a própria resposta que se pretende medir.¹⁹

As amostras reais introduzem interferências adicionais. Partículas e turbidez espalham a luz; espécies absorventes reduzem a potência disponível; biomoléculas e matéria orgânica podem emitir fluorescência; e a adsorção não específica pode modificar a interface sensora. Por essa razão, um branco contendo apenas solvente raramente representa uma matriz complexa, sendo necessários brancos de matriz e controles compatíveis com a aplicação.²⁰ Considere uma amostra turva que produz

menor intensidade no detector. Essa redução pode decorrer da absorção do analito, mas também do espalhamento por partículas, da absorção por outros constituintes ou de alterações no posicionamento da amostra. Sem referências adequadas e controle da geometria, processos distintos podem produzir a mesma resposta experimental. A leitura deve, portanto, ser interpretada como o resultado combinado de diferentes interações, e não como uma medida direta e exclusiva do analito.

A resposta óptica também pode variar com a intensidade da fonte, o alinhamento, a focalização, a distância de leitura, a abertura de coleta e a heterogeneidade da superfície. Esses fatores determinam o volume excitado e a quantidade de luz que chega ao detector, devendo ser controlados, registrados ou normalizados para que variações instrumentais não sejam confundidas com a presença do analito.¹⁷ Esse controle é essencial para explorar de forma confiável as propriedades ópticas de materiais nanoestruturados.

1.3 NANOPARTÍCULAS COMO ELEMENTOS FUNCIONAIS EM SENSORES ÓPTICOS

1.3.1 Composição, geometria e propriedades ópticas

Como discutido anteriormente, o desempenho analítico depende da relação entre sinal, fundo, matriz e variabilidade. Quando um material é reduzido à escala nanométrica, sua razão entre área superficial e volume aumenta, e suas propriedades eletrônicas, ópticas e interfaciais podem se modificar. Uma analogia geométrica ajuda a compreender esse efeito: ao dividir um mesmo volume de material em muitas partículas menores, a quantidade total de matéria permanece semelhante, mas a área exposta aumenta. Esse aspecto é especialmente relevante em sensores, porque muitos eventos de reconhecimento e transdução ocorrem na superfície ou em sua proximidade.²¹

Nesse regime, pequenas variações de composição, tamanho, forma ou ambiente local podem alterar a absorção, a emissão, o espalhamento e a distribuição do campo eletromagnético. As

nanopartículas podem atuar como emissores de luz, intensificadores de campo, suportes para elementos de reconhecimento ou interfaces que conectam o analito ao sistema de leitura.²² Seu comportamento, entretanto, não depende apenas da identidade química do material, mas também de fatores como fase cristalina, dopagem, defeitos estruturais e estado da superfície.

1.3.2 Química superficial, estabilidade, reconhecimento e organização espacial

As nanopartículas são geralmente sintetizadas na presença de ligantes que controlam sua formação, crescimento e estabilidade. Esses ligantes, porém, nem sempre são compatíveis com a matriz analítica.^{23,24} Partículas produzidas em solventes orgânicos, por exemplo, podem exigir troca de ligantes, encapsulamento ou revestimentos anfífilos para se dispersarem em água. A estabilidade coloidal resulta do equilíbrio entre forças atrativas e repulsivas: cargas superficiais promovem repulsão eletrostática, enquanto cadeias poliméricas formam barreiras estéricas que dificultam a aproximação entre as partículas.²⁴

Esse equilíbrio pode se modificar na presença de sais, proteínas e outras espécies da matriz. Os sais reduzem o alcance da repulsão eletrostática, enquanto biomoléculas podem adsorver na superfície e formar uma corona biomolecular, isto é, uma camada que passa a mediar a interação da nanopartícula com o meio.²⁵ Essa camada altera o tamanho hidrodinâmico, a carga aparente, a estabilidade e a acessibilidade dos ligantes. Assim, uma dispersão estável em água pura pode agregar ou apresentar comportamento diferente em tampões, meios de cultura ou fluidos biológicos.

A funcionalização da superfície permite introduzir anticorpos, aptâmeros, peptídeos, ácidos nucleicos, enzimas ou receptores sintéticos por adsorção ou ligação covalente. A simples presença dessas moléculas, contudo, não garante reconhecimento eficiente.²⁶ Sua densidade, orientação e mobilidade determinam quantos sítios permanecem acessíveis ao analito. Um recobrimento excessivo pode provocar impedimento estérico e ocultar regiões de ligação, enquanto uma cobertura insuficiente

reduz a capacidade de reconhecimento e favorece a adsorção não específica. A interface deve, portanto, equilibrar estabilidade, compatibilidade com a matriz, acessibilidade química e integração ao substrato.

Quando as nanopartículas são imobilizadas em filmes ou superfícies, sua posição passa a ser tão importante quanto sua composição. A densidade, a distribuição espacial, a orientação e o estado de agregação determinam tanto o acesso do analito quanto a participação do material na resposta óptica.²⁷ A região de maior interação com a luz pode estar localizada na superfície, em um volume focal ou em um campo evanescente, parcela do campo eletromagnético que se estende além de uma interface e diminui rapidamente com a distância. Partículas posicionadas fora dessa região contribuem pouco para o sinal, enquanto o excesso de material pode dificultar o transporte do analito e aumentar a heterogeneidade da resposta.

A organização espacial pode ser planejada para promover acoplamento entre partículas, formar regiões de campo intensificado ou controlar a distância entre emissores e espécies supressoras. Entretanto, agregação controlada e agregação aleatória não são equivalentes: a primeira pode produzir uma função óptica desejada, enquanto a segunda tende a gerar variabilidade e perda de reprodutibilidade.²⁸

Esta tese explora duas classes de nanomateriais que exemplificam essa relação entre superfície, posição e mecanismo óptico. As nanopartículas de conversão ascendente (UCNPs) atuam como emissores capazes de converter radiação de menor energia em emissão de maior energia, enquanto as nanopartículas de ouro (AuNPs) são empregadas na intensificação do espalhamento Raman por superfície (SERS). Embora esses sinais tenham origens físicas distintas, ambos dependem do controle da superfície, da organização espacial do nanomaterial, do acesso do analito e do acoplamento com os sistemas de excitação e coleta.

1.4 SENSORIAMENTO LUMINESCENTE E NANOPARTÍCULAS DE CONVERSÃO ASCENDENTE

O sensoriamento luminescente utiliza a luz emitida por um material como sinal analítico. Quando a interação com uma espécie química ou biológica altera essa emissão de forma mensurável e reprodutível, a resposta pode ser relacionada à presença, à concentração ou ao estado do analito. Essa relação, contudo, não depende apenas do material emissor.²⁹ O desempenho da plataforma resulta da combinação entre o comprimento de onda de excitação, o parâmetro óptico utilizado na leitura, o mecanismo responsável pela variação do sinal, a interface de reconhecimento e as propriedades da matriz analisada.

Nesta tese, o sensoriamento luminescente é realizado com nanopartículas de conversão ascendente, conhecidas como UCNPs (*upconversion nanoparticles*). Esses materiais combinam uma matriz inorgânica com íons lantanídeos e permitem produzir emissão em comprimentos de onda menores a partir de excitação no infravermelho próximo. Antes de discutir essa plataforma, é necessário estabelecer como a luminescência é gerada, quais grandezas podem ser empregadas como resposta analítica e por que os emissores convencionais apresentam limitações em amostras biológicas.

1.4.1 Fundamentos da luminescência aplicada ao sensoriamento

Luminescência é a emissão de radiação eletromagnética após a população de um estado excitado. No contexto deste trabalho, essa população é produzida pela absorção de luz; portanto, o fenômeno considerado é mais especificamente a fotoluminescência. Após a excitação, o sistema pode retornar a estados de menor energia por um processo radiativo, com emissão de um fóton, ou por processos não radiativos, nos quais a energia é dissipada por vibrações, calor e colisões ou transferida para outras espécies. A emissão observada resulta da competição entre esses caminhos de desativação³⁰.

Na fluorescência convencional, a absorção de um fóton conduz o material a um estado eletrônico excitado real. Antes da emissão, parte da energia costuma ser perdida por relaxações vibracionais e reorganizações do meio. Por isso, o fóton emitido geralmente possui menor energia e maior comprimento de onda que o fóton absorvido, diferença denominada deslocamento de Stokes. A eficiência do processo pode ser expressa pelo rendimento quântico de luminescência, definido, em termos gerais, pela razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos. Outro parâmetro fundamental é o tempo de vida do estado excitado, que corresponde ao intervalo característico durante o qual a população permanece nesse estado antes de se desativar.

Em um sensor, a emissão deve ser tratada como uma grandeza física mensurável, e não apenas como brilho visível. A resposta pode ser acompanhada pela intensidade de uma banda ou pela intensidade integrada do espectro, pela posição e pela forma das bandas, pela razão entre dois sinais espectrais ou pelo tempo de vida da luminescência.³¹ Cada parâmetro responde de maneira diferente às alterações do emissor e de seu ambiente; assim, a escolha da variável analítica deve ser compatível com o mecanismo proposto e com as características da amostra.

A interação com o analito pode aumentar, diminuir ou redistribuir a emissão. Em sensores do tipo *turn-on*, a presença do analito aumenta o sinal, por exemplo, ao remover uma espécie supressora, desfazer agregados pouco emissivos ou favorecer uma transferência de energia.³² Em respostas do tipo *turn-off*, ocorre redução da emissão. Essa redução pode envolver aumento de processos não radiativos, transferência de energia ou de elétrons, formação de complexos pouco emissivos, agregação ou alteração da superfície do material. Em sensores ratiométricos, uma banda responde ao analito enquanto outra funciona como referência; a razão entre elas pode diminuir a influência de flutuações instrumentais, desde que as bandas sejam bem definidas, suficientemente separadas e afetadas de modo distinto pelo processo de detecção.³³ Além de alterações de intensidade, o estímulo externo pode deslocar bandas, modificar a razão entre canais espectrais ou alterar a cinética de decaimento.

A intensidade medida também depende de fatores que não estão diretamente relacionados ao analito, como o número de centros emissores, a potência e a geometria de excitação, o alinhamento óptico, a eficiência de coleta, o volume efetivamente sondado e a estabilidade da dispersão. Sobreposição espectral, reabsorção, espalhamento, absorção pela matriz, variações do índice de refração e diferenças entre os caminhos ópticos das bandas podem modificar o sinal mesmo quando a composição química permanece inalterada.³⁴

Consequentemente, uma resposta baseada em intensidade requer condições de aquisição reprodutíveis, brancos adequados e controles que permitam distinguir mudanças fotofísicas de efeitos instrumentais, ópticos ou coloidais. Quando possível, medidas ratiométricas ou resolvidas no tempo podem reduzir parte dessas interferências, mas também exigem validação, pois nenhuma forma de leitura elimina automaticamente os efeitos da matriz.

1.4.2 Potencial analítico e limitações da luminescência convencional

O sensoriamento luminescente pode alcançar elevada sensibilidade porque pequenas alterações na população dos estados excitados podem produzir mudanças detectáveis na emissão. A técnica também oferece diferentes modalidades de leitura, permite combinar o transdutor óptico com reconhecedores químicos ou biológicos e pode ser adaptada a medidas pontuais, imagens, ensaios em solução e plataformas integradas a superfícies ou fibras ópticas.³⁵ Essas vantagens, entretanto, dependem da estabilidade do emissor e da capacidade de distinguir sua resposta das contribuições da própria amostra.

Uma das principais dificuldades em matrizes biológicas é a autofluorescência. Moléculas naturalmente presentes em células, tecidos e fluidos, como NADH, flavinas, aminoácidos aromáticos, pigmentos e outros componentes celulares, podem absorver radiação no ultravioleta ou no visível e emitir luz.³⁶ Esse sinal de fundo pode se sobrepor à emissão da sonda, reduzir a razão sinal/ruído e dificultar a detecção de pequenas quantidades do analito. Além disso, a composição e a intensidade da

autofluorescência variam entre amostras, indivíduos, tecidos e condições experimentais, aumentando a incerteza das medidas.

Entre os materiais empregados em sensores luminescentes destacam-se os fluoróforos orgânicos, como fluoresceína, rodamina e cianinas. Esses compostos apresentam elevada diversidade química, resposta rápida e, em muitos casos, emissão intensa. Suas propriedades ópticas, contudo, podem variar com o pH, a polaridade, a concentração de oxigênio, a viscosidade e o estado de agregação. Outro aspecto relevante é o fotobranqueamento, processo irreversível de degradação fotoquímica provocado pela exposição à luz. A diminuição progressiva da emissão decorrente desse processo pode ser confundida com uma resposta ao analito se a estabilidade da sonda não for avaliada nas mesmas condições de aquisição utilizadas no ensaio.

Os pontos quânticos semicondutores também apresentam propriedades atrativas, como bandas de absorção amplas, elevada intensidade e emissão ajustável em função do tamanho e da composição.³⁷ Seu desempenho depende, porém, da estrutura do núcleo e da casca, do grau de passivação e da química superficial. Defeitos, oxidação e interações com o meio podem criar vias não radiativas e reduzir a emissão. Determinadas composições ainda apresentam limitações de toxicidade e biocompatibilidade, que dependem da liberação de espécies do material, do revestimento, do tamanho, da concentração e das condições de exposição.

Esses exemplos mostram que o desempenho de um sensor não é determinado apenas pela intensidade inicial do luminóforo. Estabilidade fotoquímica, reprodutibilidade, sensibilidade às condições do meio, compatibilidade com a matriz e região espectral de excitação são igualmente importantes. Em amostras biológicas, a utilização de comprimentos de onda que reduzam a excitação dos componentes naturais da amostra pode melhorar a separação entre o sinal da sonda e o fundo. Nesse contexto, materiais dopados com íons lantanídeos e capazes de conversão ascendente constituem uma alternativa particularmente relevante.

1.4.3 Nanopartículas de conversão ascendente: composição e propriedades ópticas

As propriedades ópticas dos lantanídeos estão relacionadas à sua estrutura eletrônica. Íons como Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Ho^{3+} e Nd^{3+} possuem elétrons 4f parcialmente protegidos pelas camadas 5s e 5p. Essa blindagem reduz a influência direta do ambiente externo sobre muitas transições 4f–4f e contribui para a formação de níveis de energia relativamente bem definidos.³⁸ Como consequência, os lantanídeos apresentam bandas de emissão estreitas, posições espectrais características e tempos de vida frequentemente mais longos que os de muitos fluoróforos orgânicos.

As transições 4f–4f são, em grande parte, proibidas pelas regras de seleção de paridade, o que contribui tanto para os tempos de vida prolongados dos estados excitados quanto para a absorção direta relativamente fraca de muitos íons lantanídeos.³⁹ Por essa razão, os sistemas de conversão ascendente geralmente distribuem as funções de absorção e emissão entre diferentes dopantes, incorporados em uma matriz inorgânica hospedeira. Essa matriz fornece a estrutura cristalina que acomoda os íons e influencia parâmetros como a distância entre eles, a simetria local, a energia de fônons, a estabilidade estrutural e a migração da energia excitada. Matrizes com baixa energia de fônons são particularmente favoráveis, pois reduzem a probabilidade de desativação multifonônica, processo no qual a energia eletrônica é dissipada por meio da emissão sucessiva de vibrações da rede cristalina.

Fluoretos são amplamente empregados como matrizes hospedeiras por apresentarem energias vibracionais relativamente baixas. Entre eles, o NaYF_4 é particularmente relevante. Sua composição e sua fase cristalina influenciam a eficiência da conversão ascendente; por isso, a identificação estrutural do material deve ser considerada na interpretação dos resultados.⁴⁰ Além da matriz, tamanho de partícula, cristalinidade, concentração de dopantes e arquitetura do material controlam a probabilidade de migração, transferência e perda de energia.

Os dopantes podem exercer funções distintas. O sensibilizador é responsável por absorver a radiação de excitação e transferir energia; o ativador recebe essa energia e apresenta as transições emissivas utilizadas na leitura. Essa divisão compensa, em parte, a baixa absorção direta de muitos

ativadores. Em arquiteturas mais complexas, outros íons podem atuar como mediadores de transferência ou ampliar a faixa de excitação, mas a inclusão de novos dopantes também introduz caminhos adicionais de migração e desativação.

No sistema $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ utilizado nesta tese, o NaYF_4 atua como matriz hospedeira, o Yb^{3+} como sensibilizador e o Er^{3+} como ativador. O Yb^{3+} apresenta uma banda de absorção adequada à excitação próxima de 980 nm e, em comparação com a excitação direta do Er^{3+} nessa região, capta a radiação com maior eficiência. A energia absorvida é transferida ao Er^{3+} , que pode emitir principalmente nas regiões verde e vermelha do espectro. O detalhamento dos níveis de energia e das transições específicas do sistema é retomado no Capítulo 2, na Figura 2.5.

1.4.4 Mecanismos de conversão ascendente

As nanopartículas de conversão ascendente exploram os níveis intermediários dos íons lantanídeos para produzir emissão anti-Stokes. Diferentemente da fluorescência convencional, na qual a absorção de um fóton de maior energia é seguida pela emissão de um fóton de menor energia, na conversão ascendente dois ou mais fótons de menor energia contribuem, em etapas sucessivas, para a população de um estado emissivo de maior energia. O sistema não cria energia: ele a acumula temporariamente em estados intermediários reais.⁴¹

A analogia de uma escada auxilia a visualização do processo. Em vez de atingir o nível emissivo em um único salto, o sistema percorre sucessivos degraus de energia. Para que isso ocorra, o estado intermediário deve permanecer populado por tempo suficiente para que um novo evento de absorção ou transferência aconteça antes da desativação. Os tempos de vida relativamente longos dos níveis 4f favorecem essa sequência.

Entre os mecanismos mais relevantes estão a absorção de estado excitado, ou ESA (*excited-state absorption*), e a conversão ascendente por transferência de energia, ou ETU (*energy-transfer upconversion*). Na ESA, o mesmo íon absorve o primeiro fóton e alcança um estado intermediário real; antes de retornar ao estado fundamental, ele absorve outro fóton e atinge um nível de maior energia, a

partir do qual ocorre a emissão. Na ETU, a absorção e a emissão são distribuídas entre íons diferentes. Um sensibilizador absorve a radiação de excitação e transfere energia para um ativador. Eventos sucessivos de transferência elevam o ativador a estados de maior energia até que uma transição radiativa produza a emissão. Em sistemas $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ excitados próximo de 980 nm, a ETU costuma desempenhar papel central, pois o Yb^{3+} absorve a radiação e transfere energia ao Er^{3+} .⁴²

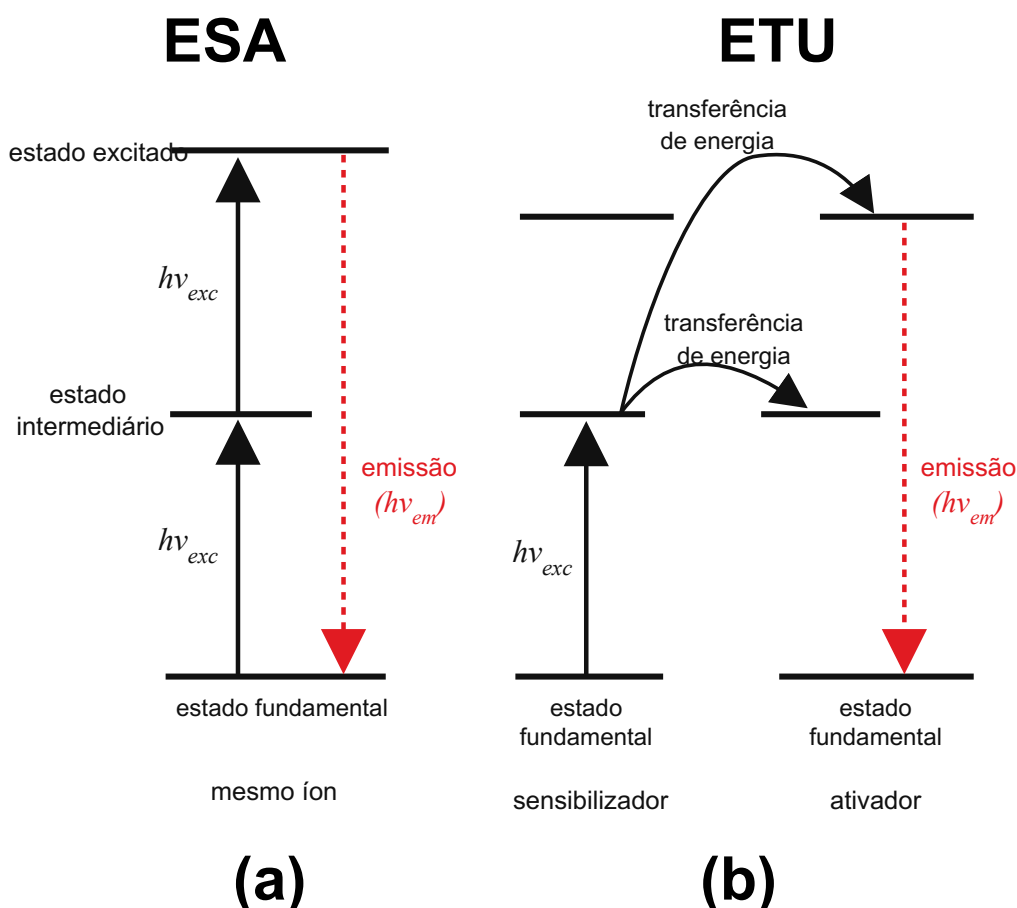


Figura 1.3. Representação genérica de dois mecanismos de conversão ascendente. (a) Na absorção de estado excitado (ESA), o mesmo íon absorve fótons sucessivos por meio de um estado intermediário real. (b) Na conversão ascendente por transferência de energia (ETU), um sensibilizador absorve a excitação e transfere energia, em etapas, a um ativador, que emite um fóton de maior energia. Os níveis são esquemáticos e não correspondem a um par específico de íons.

1.4.5 UCNPs e desempenho analítico de sensores luminescentes

Para aplicações em matrizes biológicas, as principais vantagens analíticas das UCNPs decorrem da possibilidade de excitação no infravermelho próximo, das bandas de emissão estreitas,

dos tempos de vida relativamente longos e da elevada resistência ao fotobranqueamento.⁴³ A excitação no infravermelho próximo pode reduzir a autofluorescência produzida por componentes celulares sob radiação ultravioleta ou visível, diminuindo o fundo óptico e favorecendo o aumento da razão sinal/ruído. As bandas estreitas facilitam a separação de diferentes canais de emissão, enquanto os tempos de vida prolongados possibilitam medidas resolvidas no tempo, nas quais a aquisição é realizada após o decaimento de sinais de fundo mais rápidos. Esses benefícios, entretanto, dependem do comprimento de onda de excitação, da irradiância, da composição da amostra e da estratégia de detecção.⁴⁴

A fotoestabilidade das UCNPs favorece aquisições repetidas ou prolongadas, mas não garante a constância do sinal analítico. Como discutido nas seções anteriores, a intensidade de emissão depende das propriedades estruturais e superficiais das nanopartículas; durante a análise, porém, também pode ser modificada por agregação, sedimentação, alterações no revestimento, variações da potência ou da geometria de excitação e mudanças nas propriedades ópticas da dispersão.⁴⁵ Em sistemas excitados próximo de 980 nm, a absorção da radiação pela água também pode provocar aquecimento local, especialmente sob irradiâncias elevadas. Portanto, uma alteração na intensidade não deve ser atribuída automaticamente à presença do analito sem que essas fontes de variação sejam controladas.

A interface superficial exerce papel central na transformação da resposta óptica das UCNPs em uma resposta analítica seletiva. O revestimento deve manter a estabilidade coloidal das partículas e, ao mesmo tempo, disponibilizar grupos funcionais para a imobilização de moléculas de reconhecimento.²³ O reconhecedor pode favorecer a interação com o analito, mas não elimina completamente a adsorção não específica, o bloqueio da superfície ou a competição entre espécies. Em matrizes complexas, proteínas, sais, células e matéria orgânica podem alterar a dispersão das partículas, dificultar o transporte do analito até a interface funcionalizada e produzir variações de intensidade que não decorrem exclusivamente do evento de reconhecimento.

Por essa razão, o desempenho de um sensor baseado em UCNPs não deve ser avaliado apenas pela intensidade máxima de emissão. Também devem ser considerados a razão sinal/ruído, a seletividade, a estabilidade temporal, a repetibilidade, a reprodutibilidade entre lotes, a resposta a interferentes e o comportamento na matriz real. A conversão das propriedades ópticas das UCNPs em uma resposta analítica confiável depende do controle integrado das condições de excitação, da estabilidade da dispersão, da funcionalização superficial, da interface de reconhecimento e das interações com os componentes da amostra.

1.5 SENSORIAMENTO SERS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Além das nanopartículas de conversão ascendente, esta tese emprega nanopartículas de ouro em uma segunda estratégia de sensoriamento óptico, baseada no espalhamento Raman intensificado por superfície, ou SERS (*surface-enhanced Raman scattering*). As duas plataformas utilizam nanomateriais para converter uma interação química ou biológica em um sinal óptico, mas a origem da informação é diferente. Como discutido no tópico anterior, o sensoriamento luminescente acompanha a emissão produzida após a população de estados excitados reais. Na espectroscopia Raman, a resposta surge do espalhamento inelástico da luz e está relacionada aos movimentos vibracionais da espécie analisada.⁴⁵

Essa diferença determina o papel dos nanomateriais em cada sistema. Nas UCNPs, a nanopartícula é o próprio emissor e a resposta analítica é obtida por alterações de intensidade, razão entre bandas ou tempo de vida. No SERS, a nanoestrutura metálica intensifica o campo eletromagnético próximo à superfície, permitindo registrar com maior intensidade o espectro vibracional do analito ou de uma molécula repórter. Assim, enquanto a plataforma luminescente fornece principalmente uma resposta do transdutor, o Raman pode oferecer uma assinatura molecular associada à composição e à estrutura química. Para construir essa relação de forma progressiva, são apresentados a seguir os fundamentos do Raman, as limitações da técnica convencional, as

propriedades das nanopartículas plasmônicas, os mecanismos de intensificação e suas consequências para o desempenho analítico.

1.5.1 Fundamentos da espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman se baseia na interação da luz com os movimentos vibracionais das moléculas. De forma didática, uma molécula pode ser representada como um conjunto de átomos conectados por ligações que se comportam como molas. Essas ligações não permanecem estáticas: elas podem se alongar, se comprimir, se dobrar ou se torcer segundo modos específicos. A frequência e a forma desses movimentos dependem das massas atômicas, da força das ligações, da geometria e da simetria molecular.⁴⁵ Por isso, estruturas químicas diferentes produzem conjuntos característicos de bandas, e o espectro Raman é frequentemente descrito como uma impressão digital molecular.

Quando a luz incide sobre uma molécula, a maior parte dos fótons é espalhada elasticamente e conserva a energia da radiação incidente.⁴⁶ Esse processo é denominado espalhamento Rayleigh. Apenas uma pequena fração dos fótons troca energia com as vibrações moleculares e é espalhada com energia ligeiramente diferente. A diferença entre as energias incidente e espalhada é expressa normalmente como deslocamento Raman, em cm^{-1} , e corresponde à energia de um modo vibracional. Quando o fóton transfere energia para a molécula, ocorre o espalhamento Raman Stokes; quando recebe energia de uma molécula que já se encontra vibracionalmente excitada, ocorre o Raman anti-Stokes.¹⁶ Como, à temperatura ambiente, a maior parte das moléculas ocupa o nível vibracional fundamental, as bandas Stokes geralmente são mais intensas.

O termo anti-Stokes já foi empregado na Seção 1.4.4 para descrever a emissão das UCNPs. Entretanto, o uso da mesma denominação não implica o mesmo mecanismo físico. Na conversão ascendente, dois ou mais eventos sucessivos de absorção ou transferência populam estados eletrônicos reais antes da emissão de um fóton mais energético. No Raman anti-Stokes, por sua vez, a molécula já se encontra em um nível vibracional excitado e transfere parte dessa energia ao fóton durante o espalhamento inelástico. A interação ocorre por meio de um estado virtual transitório, sem a população

duradoura de um estado eletrônico emissivo. Na fluorescência convencional, discutida na Seção 1.4.1, também há população de um estado eletrônico real, mas a emissão geralmente ocorre com menor energia que a radiação absorvida devido às relaxações internas. A Figura 1.4 destaca as diferenças entre emissão luminescente e espalhamento Raman.

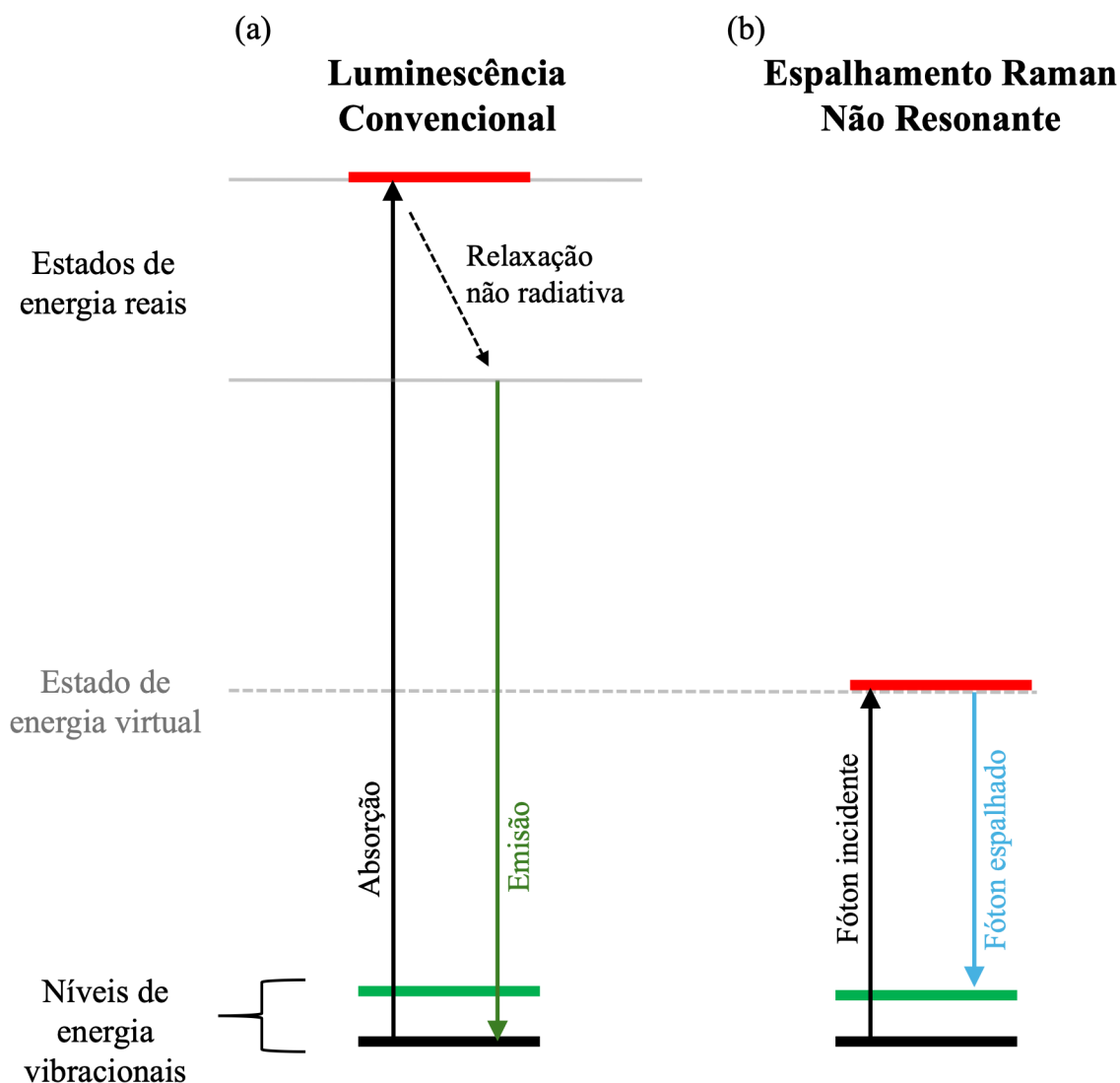


Figura 1.4. Comparação esquemática entre luminescência convencional e espalhamento Raman não ressonante. Na luminescência, a absorção popula um estado eletrônico real e a emissão ocorre após a permanência temporária nesse estado e possíveis relaxações não radiativas. No Raman, a interação ocorre por meio de um estado virtual transitório e resulta no espalhamento de um fóton com energia modificada pela vibração molecular.

Para que um modo vibracional seja observado no espectro Raman, a vibração deve modificar a polarizabilidade molecular, isto é, a facilidade com que o campo elétrico da luz deforma a

distribuição eletrônica da molécula.⁴⁷ Em uma descrição mais formal, essa resposta é representada por um tensor de polarizabilidade. Assim, não basta que os átomos vibrem: o movimento precisa alterar a maneira como a nuvem eletrônica responde ao campo incidente. Modos que não produzem essa variação são ausentes ou apresentam intensidade muito baixa nas condições consideradas.

1.5.2 Potencial analítico e limitações do Raman convencional

A principal vantagem analítica da espectroscopia Raman é sua elevada especificidade espectral.⁴⁸ Como as bandas estão relacionadas aos modos vibracionais, o espectro pode fornecer informações sobre ligações químicas, grupos funcionais, conformação, composição e organização estrutural. Isso favorece a diferenciação de compostos semelhantes e a análise de múltiplos componentes, desde que as bandas características possam ser separadas ou tratadas por métodos estatísticos apropriados. A técnica também pode ser empregada sem marcadores externos, pois a informação pode ser obtida diretamente das vibrações do analito. Entretanto, análise sem marcador não significa ausência de preparo: matrizes complexas podem exigir separação, concentração, seleção criteriosa de bandas ou modelos multivariados.

Outra vantagem é a compatibilidade com meios aquosos. Em muitas regiões espectrais, a contribuição Raman da água é menos dominante que sua forte absorção no infravermelho médio, o que favorece o estudo de soluções, fluidos biológicos, meios de cultura e amostras ambientais.⁴⁹ A água, contudo, não é opticamente inerte. Ela pode contribuir para o espectro, modificar a focalização, influenciar equilíbrios químicos e alterar a adsorção das espécies em uma superfície. Portanto, essa vantagem depende da faixa espectral, da concentração dos componentes e da geometria da amostra.

Apesar da riqueza de informação, o Raman espontâneo apresenta uma limitação fundamental: a baixa probabilidade do espalhamento inelástico. Apenas uma pequena parcela dos fótons incidentes gera sinal Raman, o que corresponde a uma seção de choque reduzida. Em baixas concentrações, pequenos volumes ou matrizes com muitos interferentes, a intensidade pode ser insuficiente para uma detecção confiável.⁵⁰ Em condições comparáveis, a geração de sinal é geralmente menos eficiente que

em muitas sondas luminescentes, nas quais a absorção real de energia antecede a emissão. Essa comparação, retomada do tópico anterior, explica por que o Raman oferece grande conteúdo estrutural, mas frequentemente exige estratégias de intensificação para atingir baixos níveis de concentração.

O aumento do tempo de aquisição ou da potência do laser pode melhorar a razão sinal/ruído, mas introduz compromissos experimentais. Tempos longos diminuem a velocidade da análise e podem aumentar a contribuição de fundo ou a deriva instrumental. Potências elevadas podem aquecer, degradar ou modificar a amostra, especialmente em sistemas biológicos ou em superfícies absorventes. Além disso, a fluorescência da matriz, do substrato ou de contaminantes pode produzir um fundo muito mais intenso que as bandas Raman. A autofluorescência, discutida anteriormente como limitação do sensoramento luminescente, assume aqui outro papel: em vez de ser a resposta medida, ela se torna uma interferência que pode mascarar o espalhamento vibracional.

Essas limitações não são resolvidas simplesmente pelo uso de maior potência ou de tempos mais longos. Uma alternativa é posicionar as moléculas próximas a nanoestruturas metálicas capazes de intensificar o campo óptico local. Essa estratégia origina o espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS): a informação continua sendo vibracional, mas a eficiência de excitação e de emissão Raman é aumentada pelo ambiente plasmônico.

1.5.3 Nanopartículas plasmônicas: composição e propriedades ópticas

Ouro e prata são os metais mais utilizados em substratos SERS porque seus elétrons de condução interagem fortemente com a luz nas regiões visível e do infravermelho próximo. A prata pode proporcionar intensificações elevadas em determinadas faixas espectrais, enquanto o ouro é frequentemente escolhido por apresentar maior resistência à oxidação e uma química superficial bem estabelecida. A seleção do metal deve considerar o comprimento de onda de excitação, as perdas ópticas, a estabilidade química, a compatibilidade com a matriz e as exigências de funcionalização.⁵¹

Em uma nanopartícula metálica, o campo elétrico da luz pode induzir a oscilação coletiva dos elétrons de condução. Quando essa oscilação fica confinada à nanoestrutura, ocorre a ressonância

plasmônica de superfície localizada, ou LSPR (*localized surface plasmon resonance*).¹⁵ A posição, a largura e a intensidade da ressonância dependem da composição, do tamanho, da forma, da distribuição de tamanhos, do índice de refração do meio e do grau de acoplamento entre partículas. Quando a excitação se aproxima da condição de ressonância, o campo eletromagnético nas proximidades da superfície pode se tornar muito mais intenso que o campo incidente.⁵²

O tamanho e a forma controlam ainda a contribuição relativa de absorção e espalhamento. Partículas maiores tendem a espalhar mais luz, mas podem apresentar maior amortecimento radiativo e modos multipolares. Estruturas anisotrópicas, como nanobastões e nanoestrelas, possuem modos plasmônicos adicionais e regiões de alta curvatura capazes de concentrar o campo. Distribuições amplas de tamanho e forma alargam a ressonância e aumentam a heterogeneidade entre diferentes regiões do substrato.⁵³ Partículas esféricas apresentam uma geometria mais simples e podem produzir respostas reprodutíveis quando a organização e a distância interpartícula são controladas.

A proximidade entre partículas modifica suas propriedades ópticas por acoplamento plasmônico. Esse efeito pode deslocar e alargar a ressonância e concentrar o campo nas regiões entre as nanoestruturas. A agregação pode, portanto, ser utilizada de forma intencional, mas não deve ser tratada como sinônimo de melhor desempenho. Agregados aleatórios apresentam diferentes números de partículas, geometrias e distâncias, favorecendo sedimentação e respostas pouco reprodutíveis.

1.5.4 Princípios da intensificação SERS

A principal contribuição para a intensificação SERS em substratos convencionais é eletromagnética e atua em duas etapas complementares.⁵⁴ Primeiro, o campo local amplificado aumenta a interação da radiação incidente com a molécula. Em seguida, o ambiente plasmônico também modifica e intensifica a radiação Raman espalhada. Em uma aproximação amplamente empregada, o fator eletromagnético pode variar aproximadamente com a quarta potência da amplitude do campo local. Assim, um aumento de dez vezes no campo pode corresponder, em condições idealizadas, a uma intensificação da ordem de dez mil vezes. Essa relação é apenas uma aproximação:

o resultado real depende das frequências de excitação e espalhamento, da geometria, das perdas do metal, da posição e da orientação molecular e da eficiência de coleta.⁵⁵

Além da contribuição eletromagnética, interações químicas entre a molécula e o metal podem modificar o sinal.⁵⁶ A adsorção pode alterar a polarizabilidade molecular, favorecer estados de transferência de carga ou aproximar uma transição eletrônica da condição de ressonância com o laser. A contribuição química costuma ser menor que a eletromagnética em muitos substratos, mas pode ser decisiva para determinadas combinações de molécula, metal e comprimento de onda. A orientação da espécie adsorvida também controla quais componentes do tensor de polarizabilidade se acoplam mais eficientemente ao campo.

As regiões nas quais o campo é mais concentrado são denominadas *hotspots*. Elas se formam principalmente em lacunas nanométricas entre partículas próximas, mas também podem ocorrer em pontas, bordas, rugosidades e junções entre nanoestruturas.⁵⁷ Em um dímero, por exemplo, a polarização da luz pode favorecer o acoplamento e concentrar o campo no espaço entre as duas partículas. Pequenas variações de distância, orientação ou geometria produzem grandes diferenças de intensidade. Por isso, uma molécula localizada em um *hotspot* pode contribuir muito mais para o sinal que outra presente no mesmo volume, mas afastada da superfície.

A forte dependência da distância explica simultaneamente a elevada sensibilidade e a dificuldade quantitativa do SERS.⁵⁸ Quando as partículas estão muito separadas, o acoplamento é fraco. Quando a agregação é descontrolada, podem surgir regiões muito intensas, porém heterogêneas, instáveis ou inacessíveis ao analito. Camadas de ligantes, polímeros, óxidos ou contaminantes também modificam a distância efetiva entre a molécula e o metal e influenciam sua adsorção. Assim, a maior intensificação local não garante o melhor sensor; os *hotspots* precisam ser numerosos, estáveis, acessíveis e distribuídos de maneira suficientemente reprodutível.⁵⁷

Proximidade geométrica, portanto, não é sinônimo de interação efetiva. Uma molécula pode estar próxima do metal, mas separada por uma camada que impede transferência de carga ou reduz o

campo disponível; também pode adsorver em uma orientação que favorece apenas alguns modos vibracionais. O perfil SERS resulta da combinação entre campo eletromagnético, química superficial, orientação molecular e condições de excitação. Assim como observado para as UCNPs, as propriedades ópticas do nanomaterial isolado não asseguram o desempenho da plataforma: a engenharia da interface é parte do mecanismo de transdução.

1.5.5 Nanopartículas de ouro e desempenho analítico de sensores SERS

As nanopartículas de ouro, ou AuNPs, são particularmente relevantes em sensores SERS porque combinam resposta plasmônica, estabilidade química e possibilidades amplas de modificação superficial. Grupos contendo enxofre, polímeros, anticorpos, aptâmeros e outras biomoléculas podem ser utilizados para controlar dispersão, reconhecimento e imobilização.⁵⁹ A prata pode proporcionar maior intensificação em determinadas condições, mas o ouro costuma oferecer maior resistência à oxidação e maior flexibilidade de funcionalização. Essa escolha representa um compromisso entre intensidade, estabilidade e compatibilidade com a aplicação. Em sistemas biológicos, a compatibilidade depende também do tamanho, do revestimento, da concentração e das condições de exposição.⁶⁰

O controle da síntese e da organização das AuNPs determina a posição da LSPR, a distribuição de distâncias e a formação de *hotspots*. A agregação pode ser empregada intencionalmente para criar lacunas nanométricas, desde que seja limitada e reprodutível.⁶¹ O objetivo analítico não é maximizar o número de agregados nem buscar apenas a menor distância possível, mas produzir uma população de regiões intensas e acessíveis, compatível com o transporte do analito e com a química de reconhecimento. Esse controle deve abranger as partículas em solução, sua organização no suporte e sua estabilidade durante a análise.

Em matrizes complexas, proteínas, sais, matéria orgânica e outras espécies podem competir por sítios de adsorção, modificar a agregação das AuNPs, bloquear *hotspots* ou produzir bandas e fundos interferentes.⁶² Nesses casos, a preparação da amostra e a limpeza da interface podem ser tão

importantes quanto a intensificação óptica. A avaliação de interferentes deve considerar não apenas a sobreposição espectral, mas também alterações no transporte do analito, na estabilidade coloidal, no acesso à superfície e no equilíbrio de adsorção.

A especificidade espectral do Raman e a seletividade do sensor são conceitos relacionados, mas distintos. Uma molécula pode apresentar bandas características e, ainda assim, não alcançar a superfície intensificadora. Ao mesmo tempo, um interferente pode adsorver preferencialmente e dominar o espectro. A seletividade pode ser aumentada por reconhecedores superficiais, etapas de separação, ajuste das condições de adsorção ou uso de nanotags.⁶³ Como já ressaltado no tópico de UCNPs, a presença de um elemento de reconhecimento não elimina automaticamente adsorção não específica, competição entre espécies ou efeitos da matriz.

Na detecção direta, a intensidade SERS reflete principalmente a população de moléculas adsorvidas ou posicionadas em *hotspots* acessíveis, e não necessariamente a concentração presente no volume. Equilíbrio e cinética de adsorção, transporte de massa, competição, saturação da superfície e tempo de incubação podem tornar não linear a relação entre concentração e sinal. Curvas de calibração devem, portanto, reproduzir a matriz, o preparo da amostra, o tempo de contato e as condições de aquisição empregadas nas análises reais.⁶⁴ Uma calibração obtida em solução simples pode não representar adequadamente amostras ambientais, alimentares ou biológicas.

Nesta tese, as AuNPs atuam como elementos ópticos ativos responsáveis por intensificar o espalhamento Raman em condições nas quais o sinal convencional seria insuficiente. A superfície funcionalizada e a arquitetura da fibra determinam quais moléculas alcançam as regiões plasmônicas, como os *hotspots* são formados e quais sinais são efetivamente coletados. O desempenho da plataforma deve ser otimizado por critérios conjuntos: intensificação suficiente, acesso do analito, seletividade interfacial, estabilidade espectral e variabilidade compatível com o uso quantitativo.

As duas plataformas discutidas neste capítulo conduzem à mesma conclusão analítica. Nas UCNPs, maximizar a intensidade de emissão não garante uma resposta estável ou seletiva; no SERS,

maximizar a intensificação local também não assegura reprodutibilidade ou quantificação confiável. Em ambos os casos, as propriedades ópticas somente se tornam uma resposta analítica robusta quando síntese, organização das partículas, química de superfície, reconhecimento, transporte do analito, efeitos da matriz e aquisição são controlados em conjunto. A diferença está na natureza do sinal: a plataforma luminescente acompanha a modulação da emissão do transdutor, enquanto o SERS registra a resposta vibracional das espécies que alcançam as regiões intensificadoras.

1.6 ENGENHARIA E INTEGRAÇÃO DE PLATAFORMAS ÓPTICAS NANOESTRUTURADAS

Os tópicos anteriores apresentaram dois mecanismos de transdução empregados nesta tese: a luminescência de nanopartículas de conversão ascendente e a intensificação do espalhamento Raman por nanoestruturas metálicas. Entretanto, as propriedades ópticas de um nanomaterial isolado não determinam, por si só, o desempenho de um sensor. Para produzir uma resposta analítica confiável, o material deve ser incorporado a uma arquitetura que controle sua interação com o analito e com o campo óptico utilizado na medida.

Nesta tese, o termo plataforma óptica nanoestruturada designa o sistema formado pela integração entre o nanomaterial opticamente ativo, sua química superficial, o elemento de reconhecimento, a forma de imobilização, o substrato e a configuração de excitação e coleta. Portanto, a plataforma não corresponde apenas à nanopartícula nem ao suporte físico. Sua função analítica resulta da conexão entre o reconhecimento do analito, o transporte até a região ativa, a transdução da interação química ou biológica e a aquisição do sinal óptico. O substrato fornece sustentação física aos componentes e pode ser constituído, por exemplo, por vidro, polímeros, membranas ou fibras. Em alguns sistemas, ele atua apenas como suporte; em outros, também desempenha uma função óptica, como conduzir, confinar ou modificar a propagação da luz. A arquitetura, por sua vez, descreve como

os nanomateriais e os elementos de reconhecimento são distribuídos sobre ou dentro desse substrato e como essa organização define a região efetivamente interrogada pelo sistema de leitura.

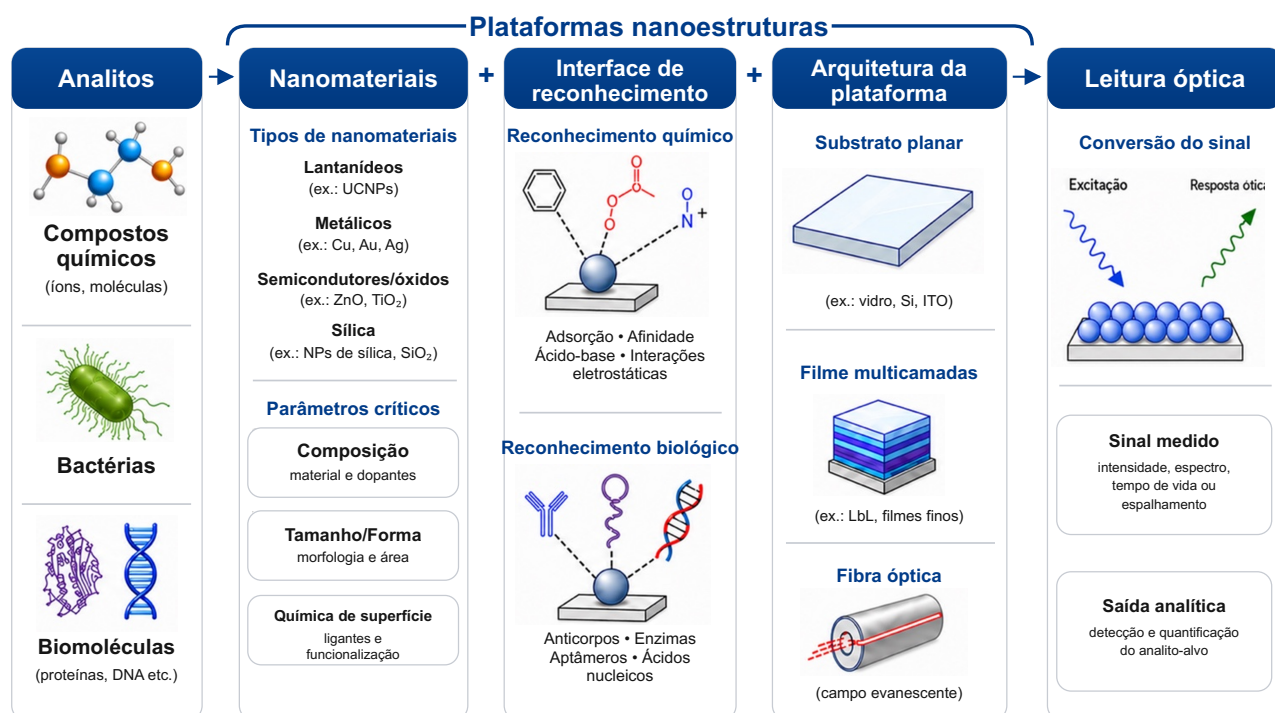


Figura 1.5. Construção conceitual de uma plataforma óptica nanoestruturada. O analito interage com uma interface formada pelo nanomaterial, sua composição e geometria, a química superficial e a estratégia de reconhecimento. Esses componentes são organizados em uma arquitetura e em um substrato definidos, que determinam a região de excitação, a coleta e a resposta óptica final.

Plataformas de sensoriamento também podem ser formadas por nanopartículas dispersas em solução. Sistemas coloidais funcionalizados podem reconhecer analitos e produzir alterações de intensidade, tempo de vida, posição espectral ou espalhamento. A imobilização em uma superfície, entretanto, pode facilitar a manipulação, a integração a dispositivos e, em alguns casos, a reutilização. Essas vantagens não são automáticas, pois superfícies imobilizadas também podem apresentar limitações de transporte de massa, perda de acessibilidade ao analito e heterogeneidade espacial.⁶⁵

O foco desta tese recai sobre plataformas sólidas nas quais nanopartículas de conversão ascendente, UCNPs, ou nanopartículas de ouro, AuNPs, são organizadas em filmes ou integradas a

fibras ópticas. Em ambos os casos, o projeto deve garantir que o analito alcance a região ativa, que a interface permaneça estável durante a análise e que o sinal seja gerado em uma região eficientemente excitada e coletada. A seguir, são discutidas duas estratégias utilizadas para alcançar esses objetivos: a montagem de filmes Layer-by-Layer e a funcionalização de fibras ópticas.

1.6.1 Filmes Layer-by-Layer como arquitetura de imobilização

A montagem Layer-by-Layer (LbL) é uma estratégia de construção sequencial de filmes nanoestruturados sobre substratos sólidos. Em sua forma clássica, o substrato é alternadamente exposto a soluções contendo espécies capazes de estabelecer interações complementares. A atração eletrostática é uma das formas mais utilizadas de deposição, embora ligações de hidrogênio, interações de coordenação, reconhecimento molecular e reações covalentes também possam ser empregadas. Entre as etapas de deposição, lavagens removem o material fracamente adsorvido e reduzem a transferência de uma solução para a etapa seguinte. A repetição do processo permite modificar progressivamente a espessura, a composição, a carga superficial e a funcionalidade do filme, embora o grau de controle dependa dos materiais e das condições de montagem.⁶⁶

Como ilustrado na Figura 1.6, a montagem LbL pode ser aplicada a substratos com diferentes formas e dimensões, incluindo superfícies planares, fibras, membranas e partículas. Polímeros, nanopartículas, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios podem ser incorporados em diferentes sequências, tornando possível reunir materiais com funções complementares em uma mesma interface.

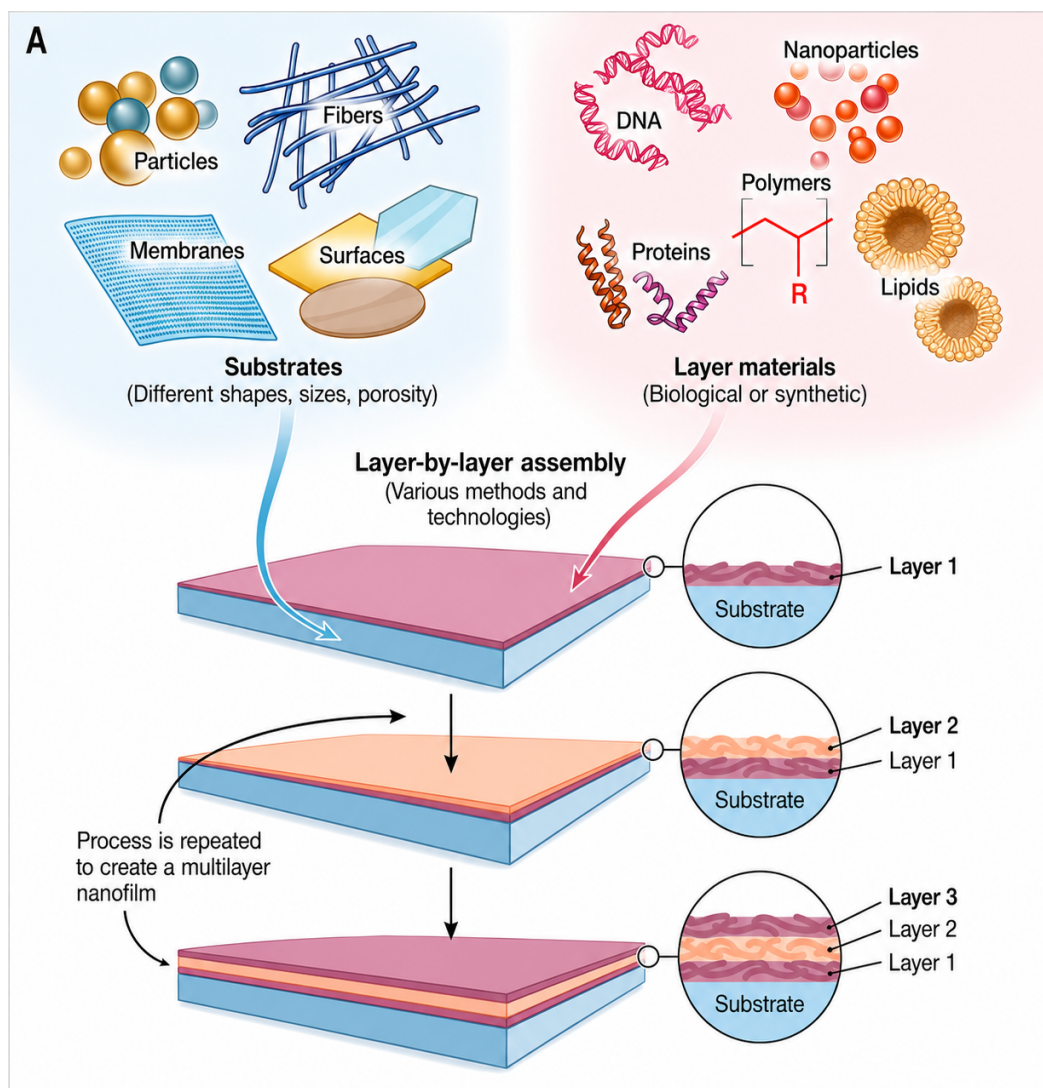


Figura 1.6. Representação esquemática da montagem Layer-by-Layer de filmes nanoestruturados. Diferentes tipos de substratos, como partículas, fibras, membranas e superfícies planares, podem ser recobertos sequencialmente com materiais biológicos ou sintéticos, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, polímeros, lipídios e nanopartículas. A repetição das etapas de deposição promove a formação progressiva de um filme multicamadas com composição e espessura controláveis. Reproduzida da referência.⁶⁶

Os polímeros são frequentemente utilizados porque favorecem a adesão ao substrato, o controle da carga interfacial e a incorporação de nanopartículas ou grupos funcionais. A principal vantagem da montagem LbL, portanto, não está simplesmente na formação de um número elevado de camadas, mas na possibilidade de definir a sequência e a localização relativa dos componentes que participam do reconhecimento e da transdução.⁶⁷

Em plataformas luminescentes contendo UCNPs, a deposição sucessiva pode controlar a quantidade e a distribuição das nanopartículas imobilizadas na região de leitura. Dentro de uma faixa adequada de carregamento, o aumento do número de centros emissores pode elevar a intensidade inicial e facilitar o acompanhamento das alterações produzidas pela interação com o analito. A matriz polimérica também pode reduzir o desprendimento das partículas e contribuir para a estabilidade mecânica e química da interface. Esse comportamento, contudo, não implica que a emissão aumente indefinidamente com o número de camadas. Deposições excessivas podem promover agregação, dificultar a difusão do analito e posicionar parte das nanopartículas fora da região eficientemente excitada ou coletada. Por esse motivo, a arquitetura deve ser otimizada considerando simultaneamente a quantidade de material, sua distribuição espacial e sua acessibilidade.⁶⁸

A montagem LbL também pode ser empregada em sistemas SERS, mas os critérios de projeto são diferentes daqueles aplicados às plataformas luminescentes. Como discutido anteriormente, a intensificação Raman ocorre predominantemente nas proximidades das superfícies metálicas e, de forma mais intensa, nas regiões de elevado campo local denominadas hotspots. Assim, o aumento do número de camadas ou da quantidade total de AuNPs não garante maior intensificação.

Camadas poliméricas espessas podem afastar o analito da superfície metálica, bloquear sítios de adsorção ou produzir sinais espectrais interferentes.⁶⁶ Por outro lado, camadas suficientemente finas e controladas podem auxiliar na estabilização das nanopartículas, na modulação das distâncias interpartículas e na introdução de grupos seletivos. A utilização de LbL em SERS é, portanto, possível, mas exige controle rigoroso da espessura dos espaçadores, da exposição da superfície metálica e da formação reprodutível dos nanogaps.

Desse modo, enquanto plataformas luminescentes podem se beneficiar do aumento controlado do número de UCNPs presentes na região de leitura, plataformas SERS devem priorizar a formação

de regiões de intensificação acessíveis ao analito. Em ambos os casos, a quantidade de nanomaterial não deve ser considerada isoladamente da organização espacial da interface.

1.6.2 Fibras ópticas como suporte e componente do sistema de leitura

As fibras ópticas constituem uma alternativa às superfícies planares porque podem atuar simultaneamente como suporte físico e como elemento de condução da luz. Dependendo da geometria da plataforma, os nanomateriais podem ser imobilizados na face terminal, na superfície lateral, em uma região afinada ou em outra estrutura modificada da fibra. A excitação é conduzida até a interface sensora por modos guiados e, em determinadas configurações laterais, pode interagir com o material por meio do campo evanescente.⁶⁹

Parte do sinal gerado na interface pode retornar pela própria fibra ou ser coletada por um caminho óptico separado. Essa integração favorece a construção de sondas compactas e permite medições locais, remotas ou in situ, particularmente em meios líquidos, ambientes confinados e regiões de difícil acesso.⁷⁰ A eficiência dessa configuração depende da área funcionalizada, do acoplamento da luz, da sobreposição entre o campo óptico e o material ativo e da eficiência de coleta do sinal.

Em plataformas luminescentes contendo UCNPs, a adequação da fibra depende da geometria utilizada. Em configurações baseadas no campo evanescente, apenas as nanopartículas localizadas suficientemente próximas da superfície participam de maneira significativa da excitação. Além disso, como a emissão por conversão ascendente apresenta dependência não linear com a irradiância, valores reduzidos de potência local podem limitar a intensidade observada. Nesses casos, o simples aumento da quantidade de UCNPs depositadas não assegura maior luminescência, especialmente quando parte do material permanece fora da região opticamente interrogada.

Arquiteturas planares podem ser mais favoráveis quando se deseja iluminar uma área ampla, controlar a distribuição das UCNPs ou acomodar elementos de reconhecimento de maior dimensão. Isso não significa que fibras sejam inadequadas para sistemas luminescentes, mas que sua utilização

deve considerar a eficiência de acoplamento, a potência disponível na região sensora e a posição das nanopartículas em relação ao campo óptico.

Para plataformas SERS, a funcionalização da face terminal da fibra apresenta vantagens específicas. A luz de excitação pode ser direcionada até as nanoestruturas plasmônicas, enquanto parte do espalhamento Raman é coletada pela mesma fibra e conduzida ao espectrômetro. A fibra passa, assim, a integrar a configuração de excitação e coleta, em vez de atuar somente como suporte. Essa geometria permite desenvolver sondas destinadas à análise direta em soluções e reduz a necessidade de posicionar externamente o sistema óptico sobre cada região da amostra.^{71,72}

A Figura 1.7 apresenta uma configuração desse tipo, na qual a face da fibra contém nanoestruturas plasmônicas que interagem com o analito. O sinal Raman produzido na região funcionalizada é coletado e conduzido ao espectrômetro. Em aplicações práticas, devem ser consideradas também as perdas de acoplamento, a contribuição espectral da própria fibra e a possível geração de sinais em regiões que não pertencem à interface sensora.⁶¹

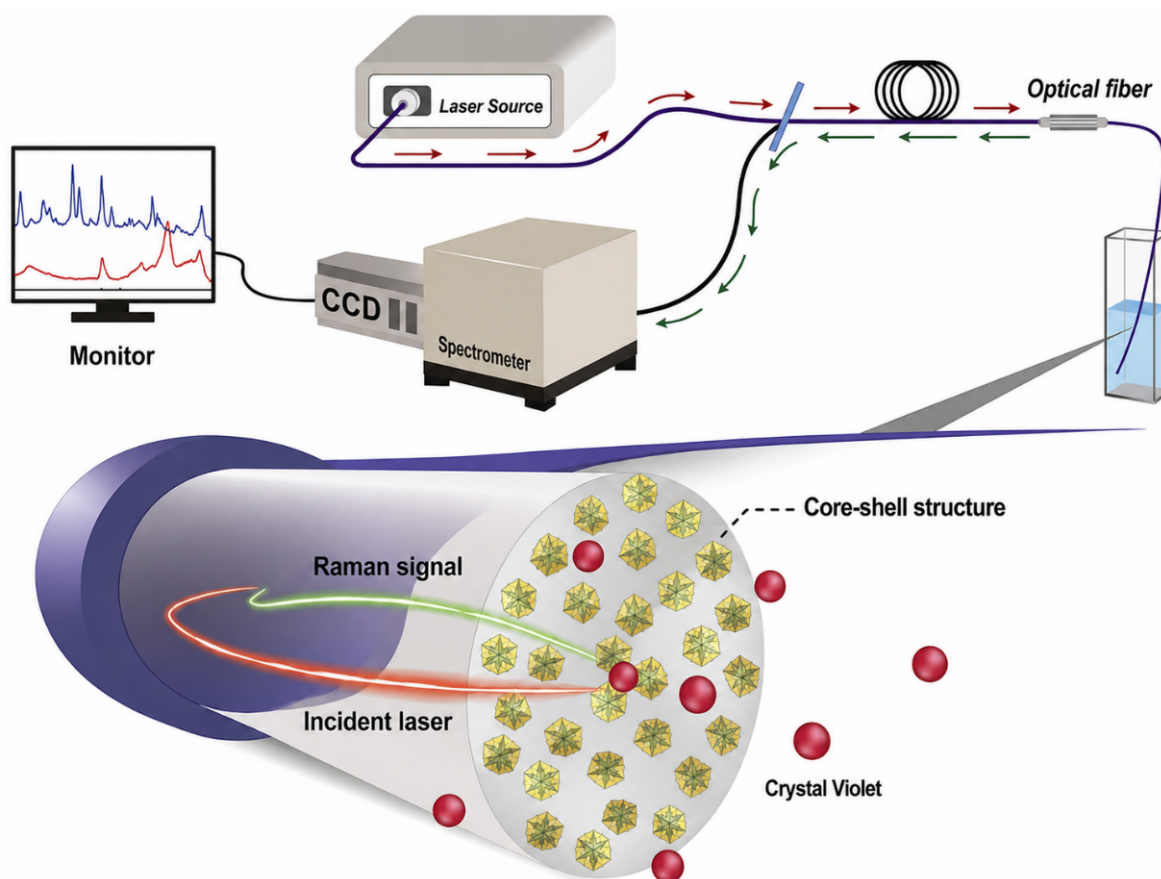


Figura 1.7. Esquema de uma plataforma sensora baseada em fibra óptica funcionalizada. A fibra conduz a luz até a região sensora, onde nanomateriais imobilizados interagem com o analito e geram uma resposta óptica coletada pelo sistema de detecção. Reproduzida da referência.⁶¹

A integração de nanomateriais em fibras deve considerar, portanto, não apenas a quantidade depositada, mas seu posicionamento em relação ao campo óptico, a acessibilidade da superfície ao analito e a eficiência com que o sinal produzido retorna ao sistema de detecção. Esses parâmetros distinguem uma fibra apenas recoberta por nanomateriais de uma plataforma na qual a fibra participa efetivamente do processo de transdução e leitura.

1.6.3 Arquitetura da plataforma, heterogeneidade e desempenho analítico

Filmes LbL e fibras ópticas representam estratégias distintas de integração. Nos filmes, a deposição sequencial favorece a organização de diferentes componentes em uma interface predominantemente planar. Nas fibras, o substrato também participa da condução da excitação e da coleta do sinal, permitindo a construção de dispositivos com geometria de sonda. A escolha entre essas

configurações depende do mecanismo óptico, das dimensões e propriedades do analito, das condições de medida e da forma como a plataforma será utilizada.⁷³

Independentemente da geometria, a distribuição não uniforme dos nanomateriais pode produzir regiões com respostas diferentes dentro de uma mesma plataforma. Essa questão é particularmente crítica em SERS, pois pequenas alterações no tamanho das partículas, na distância entre elas e na acessibilidade dos hotspots podem gerar grandes variações de intensidade. Mesmo quando a concentração nominal do analito é constante, espectros adquiridos em pontos distintos podem apresentar respostas significativamente diferentes.

Por essa razão, a caracterização de um substrato SERS não deve se basear em uma única aquisição local. Medidas em múltiplos pontos, mapeamentos Raman e análises de diferentes substratos e lotes permitem separar a variabilidade espacial da variabilidade de fabricação. A média ou a mediana de várias aquisições pode fornecer uma estimativa mais representativa da resposta global, mas não deve substituir a apresentação da dispersão dos resultados. Quando poucos hotspots dominam o sinal, uma média elevada pode ocultar o fato de que grande parte da superfície apresenta resposta reduzida. A Figura 1.8 ilustra essa relação. Regiões com diferentes concentrações locais de analito e nanopartículas produzem espectros com intensidades distintas. A resposta agregada é mais representativa do que uma única medida, mas sua interpretação deve ser acompanhada por parâmetros que descrevam a distribuição dos valores e a repetibilidade entre regiões.

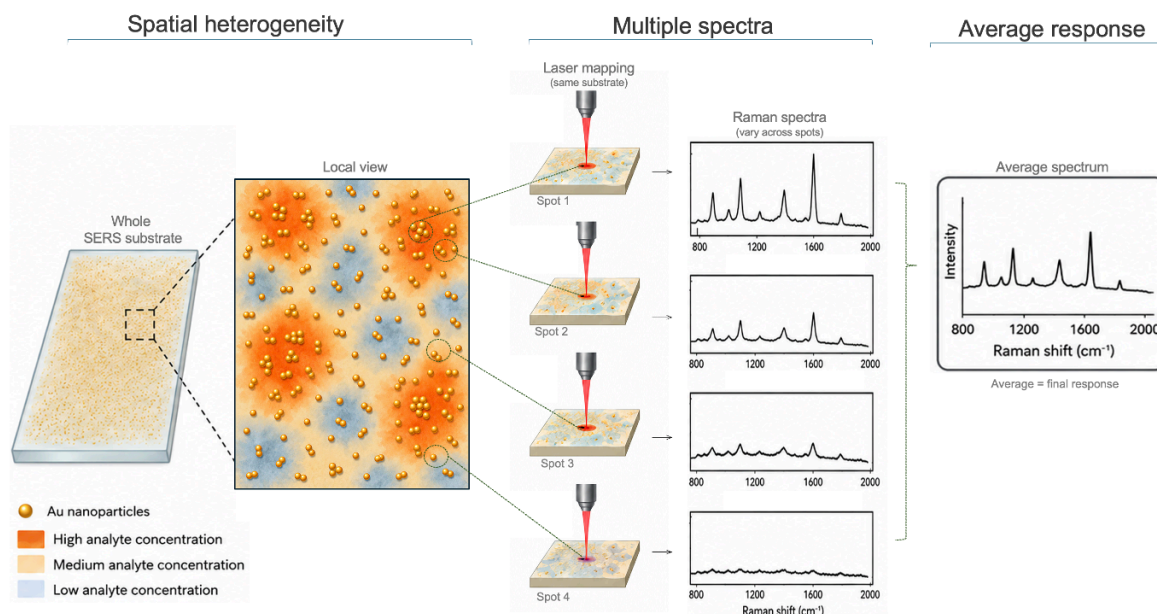


Figura 1.8. Representação da heterogeneidade espacial de um substrato SERS e da aquisição de espectros em múltiplos pontos. Diferenças na distribuição das nanopartículas, na concentração local do analito e na densidade de hotspots produzem respostas espectrais distintas ao longo da superfície. A combinação de várias aquisições fornece uma resposta global mais representativa, mas deve ser acompanhada pela análise da distribuição e da variabilidade dos resultados.

A heterogeneidade não é exclusiva do SERS. Em plataformas luminescentes, diferenças na densidade de UCNPs, na espessura do filme, na agregação das partículas ou na distribuição dos elementos de reconhecimento também podem alterar a intensidade observada. Entretanto, o efeito tende a ser particularmente pronunciado em SERS porque a resposta pode ser dominada por um número relativamente pequeno de regiões de campo intensificado.

Dessa forma, o desempenho de uma plataforma não deve ser avaliado apenas pela maior intensidade óptica obtida. Uma arquitetura analiticamente adequada deve combinar intensidade suficiente com estabilidade, acessibilidade ao analito, seletividade e reprodutibilidade. Também deve permitir que a região responsável pelo reconhecimento coincida, tanto quanto possível, com a região efetivamente excitada e observada pelo sistema óptico.

Os estudos apresentados nos capítulos seguintes aplicam esses princípios a dois mecanismos de transdução distintos. No primeiro, filmes LbL são utilizados para organizar UCNPs e elementos de reconhecimento em uma plataforma luminescente destinada à detecção bacteriana. No segundo,

nanoestruturas plasmônicas são integradas à face de uma fibra óptica para obtenção de sinais SERS diretamente em meios líquidos complexos.

Apesar das diferenças de composição, geometria e mecanismo óptico, os dois sistemas partem do mesmo princípio: as propriedades das nanopartículas somente se convertem em desempenho analítico quando sua superfície, sua organização espacial e sua interação com o campo óptico são adequadamente controladas. A engenharia da plataforma estabelece, portanto, a conexão entre os fundamentos apresentados neste capítulo e os dispositivos experimentais desenvolvidos nos capítulos seguintes.

REFERÊNCIAS

1. Patel, B. C., Sinha, G. R. & Goel, N. Introduction to sensors. in *Advances in Modern Sensors: Physics, Design, Simulation and Applications* 1–43 (Institute of Physics Publishing, 2020). doi:10.1088/978-0-7503-2707-7ch1.
2. McDonagh, C., Burke, C. S. & MacCraith, B. D. Optical chemical sensors. *Chemical Reviews* vol. 108 400–422 Preprint at <https://doi.org/10.1021/cr068102g> (2008).
3. Elsherif, M. *et al.* Optical Fiber Sensors: Working Principle, Applications, and Limitations. *Adv. Photonics Res.* **3**, (2022).
4. Singh, A. K., Mittal, S., Das, M., Saharia, A. & Tiwari, M. Optical biosensors: a decade in review. *Alexandria Engineering Journal* vol. 67 673–691 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.12.040> (2023).
5. Borisov, S. M. & Wolfbeis, O. S. Optical biosensors. *Chemical Reviews* vol. 108 423–461 Preprint at <https://doi.org/10.1021/cr068105t> (2008).
6. Rajagopalan, S., Chellamuthu, G., Kambhampati, S. B. S. & Chodavarapu, M. N. S. Understanding the Basics of Sensor Technology. in *Biomaterials in Orthopaedics & Trauma* 377–391 (Springer Nature Singapore, Singapore, 2025). doi:10.1007/978-981-96-3017-2_22.
7. Mocan, T. *et al.* Development of nanoparticle-based optical sensors for pathogenic bacterial detection. *Journal of Nanobiotechnology* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0260-y> (2017).
8. Caroleo, F. *et al.* Advances in Optical Sensors for Persistent Organic Pollutant Environmental Monitoring. *Sensors* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.3390/s22072649> (2022).
9. Gu, Y. *et al.* Chemical antifouling strategies in sensors for food analysis: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **22**, 4074–4106 (2023).
10. Madan, A., Toro, A. U., Saini, R., Akange, E. T. & Rahimi, M. Advanced nano-biosensors with multiscale applications: A comprehensive review. *Sens. Biosensing Res.* 100965 (2026) doi:10.1016/j.sbsr.2026.100965.
11. *Optical Nanoantennas for Sensors, Microscopy and Spectroscopy.* <https://escholarship.org/uc/item/8m65m82r> (2016).
12. Kaushik, S., Tiwari, U. K., Pal, S. S. & Sinha, R. K. Rapid detection of Escherichia coli using fiber optic surface plasmon resonance immunosensor based on biofunctionalized Molybdenum disulfide (MoS₂) nanosheets. *Biosens. Bioelectron.* **126**, 501–509 (2019).
13. Jampasa, S. *et al.* Recent advances and trends in the applications of nanomaterials in optical sensing platforms. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 180 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117914> (2024).
14. Xu, W. *et al.* Optical fiber sensor based on upconversion luminescence for synchronous temperature and curvature sensing. *Opt. Express* **30**, 33136 (2022).

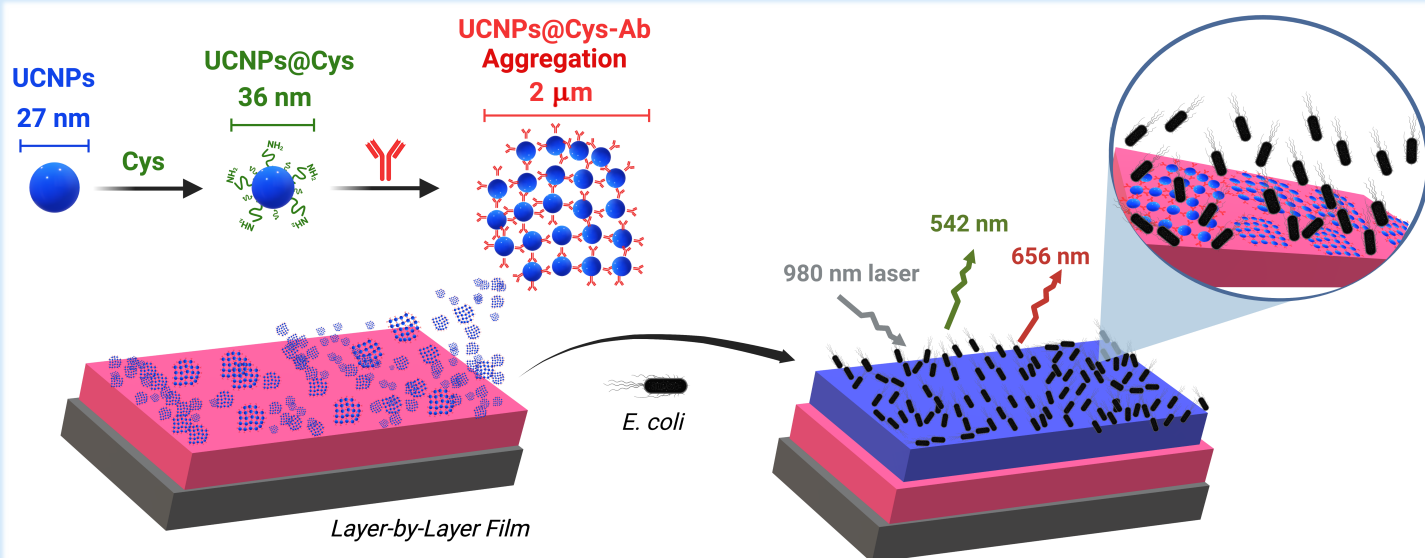
15. Chen, J. *et al.* Optimization and application of reflective LSPR optical fiber biosensors based on silver nanoparticles. *Sensors (Switzerland)* **15**, 12205–12217 (2015).
16. Zong, C. *et al.* Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges. *Chemical Reviews* vol. 118 4946–4980 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00668> (2018).
17. Demchenko, A. P. *Introduction to Fluorescence Sensing*.
18. Demchenko, A. P. *Introduction to Fluorescence Sensing: Volume 2: Target Recognition and Imaging. Introduction to Fluorescence Sensing: Volume 2: Target Recognition and Imaging* (Springer International Publishing, 2023). doi:10.1007/978-3-031-19089-6.
19. Steinegger, A., Wolfbeis, O. S. & Borisov, S. M. Optical Sensing and Imaging of pH Values: Spectroscopies, Materials, and Applications. *Chemical Reviews* vol. 120 12357–12489 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00451> (2020).
20. Wang, R., Qiao, S., He, Y. & Ma, Y. Highly sensitive laser spectroscopy sensing based on a novel four-prong quartz tuning fork. *Opto-Electronic Advances* **8**, (2025).
21. Liu, Y. *et al.* Nanoparticle-mediated targeting chimeras transform targeted protein degradation. *Nat. Nanotechnol.* <https://doi.org/10.1038/s41565-025-02081-1> (2026) doi:10.1038/s41565-025-02081-1.
22. Liu, Y. *et al.* A strategy for accurate detection of glucose in human serum and whole blood based on an upconversion nanoparticles-polydopamine nanosystem. *Nano Res.* **11**, 3164–3174 (2018).
23. Wang, M., Abbineni, G., Clevenger, A., Mao, C. & Xu, S. Upconversion nanoparticles: Synthesis, surface modification and biological applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* vol. 7 710–729 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.02.013> (2011).
24. *Colloidal Lanthanide Nanoparticles: Doping, Epitaxy, and Photon Management*. <https://escholarship.org/uc/item/399100sr>.
25. Koul, B., Poonia, A. K., Yadav, D. & Jin, J. O. Microbe-mediated biosynthesis of nanoparticles: Applications and future prospects. *Biomolecules* **11**, (2021).
26. Tian, F., Bonnier, F., Casey, A., Shanahan, A. E. & Byrne, H. J. Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: Effect of particle shape. *Analytical Methods* **6**, 9116–9123 (2014).
27. Han, Y. *et al.* Effect of oxidation on surface-enhanced raman scattering activity of silver nanoparticles: A quantitative correlation. *Anal. Chem.* **83**, 5873–5880 (2011).
28. Bao, G. & Jin, D. Nanoparticles give mice infrared vision. *Nat. Photonics* **13**, 304–305 (2019).
29. Gonçalves, I. M. *et al.* Phonon-assisted NIR-to-visible upconversion in single β -NaYF₄ microcrystals codoped with Er³⁺ and Yb³⁺ for microthermometry applications: Experiment and theory. *J. Lumin.* **231**, (2021).
30. Kim, S. *et al.* Near-infrared long lifetime upconversion nanoparticles for ultrasensitive microRNA detection via time-gated luminescence resonance energy transfer. *Nature Communications* **16**, (2025).
31. Jayaraman, S. *et al.* Enhanced luminescence and charge separation in polythiophene-grafted, gold nanoparticle-decorated, 1-D ZnO nanorods. *RSC Adv.* <https://doi.org/10.1039/c3ra45953e> (2014) doi:10.1039/c3ra45953e.
32. Ding, X. *et al.* MIL-101-Induced Nano-Optical Sensor for Ultra-Sensitive 2 Detection of Enrofloxacin in Aquatic Products Using 3 Fluorescence Turn-on Mechanism via Upconversion 4 Nanoparticles.
33. Nigoghossian, K., Messaddeq, Y., Boudreau, D. & Ribeiro, S. J. L. UV and Temperature-Sensing Based on NaGdF₄:Yb³⁺:Er³⁺@SiO₂-Eu(tta)₃. *ACS Omega* **2**, 2065–2071 (2017).
34. Ng, S. M. Carbon dots as optical nanoprobe for biosensors. in *Nanobiosensors for Biomolecular Targeting* 269–300 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813900-4.00012-9.
35. Wang, X., Jiang, Y., Tissot, A. & Serre, C. Luminescent sensing platforms based on lanthanide metal-organic frameworks: Current strategies and perspectives. *Coordination Chemistry Reviews* vol. 497 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215454> (2023).
36. Zhang, J., Li, B., Zhang, L. & Jiang, H. An optical sensor for Cu(II) detection with upconverting luminescent nanoparticles as an excitation source. *Chemical Communications* **48**, 4860–4862 (2012).
37. Yang, Z. *et al.* Mixed-quantum-dot solar cells. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
38. Cheng, X., Tu, D., Zheng, W. & Chen, X. Energy transfer designing in lanthanide-doped upconversion nanoparticles. *Chemical Communications* **56**, 15118–15132 (2020).
39. Wang, J. *et al.* Spectral engineering of lanthanide-doped upconversion nanoparticles and their biosensing applications. *Materials Chemistry Frontiers* vol. 5 1743–1770 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d0qm00910e> (2021).

40. Torresan, M. F. & Wolosiuk, A. Critical Aspects on the Chemical Stability of NaYF₄-Based Upconverting Nanoparticles for Biomedical Applications. *ACS Applied Bio Materials* vol. 4 1191–1210 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01562> (2021).
41. He, Y.-H. & Yu, X. Review on the application of upconversion nanomaterials in heavy metal detection. *Food and Health* **6**, 11 (2024).
42. Liu, C., Wang, Z., Wang, X. & Li, Z. Surface modification of hydrophobic NaYF₄:Yb,Er upconversion nanophosphors and their applications for immunoassay. *Sci. China Chem.* **54**, 1292–1297 (2011).
43. Yao, Y. *et al.* Fast detection of E. coli with a novel fluorescent biosensor based on a FRET system between UCNPs and GO@Fe₃O₄ in urine specimens. *Analytical Methods* **13**, 2209–2214 (2021).
44. *Enhanced Light-Matter Interactions for Biosensing*. <https://escholarship.org/uc/item/8h4862pz>.
45. Qu, A. *et al.* SERS- and luminescence-active Au-Au-UCNP trimers for attomolar detection of two cancer biomarkers. *Nanoscale* **9**, 3865–3872 (2017).
46. Chen, S. *et al.* SERS-active substrate assembled by Ag NW-embedded porous polystyrene fibers †. *RSC Adv.* <https://doi.org/10.1039/d0ra01454k> (2020) doi:10.1039/d0ra01454k.
47. Huang, Z., Peng, J., Xu, L. & Liu, P. Development and Application of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Nanomaterials* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nano14171417> (2024).
48. Chang, J. & Yuanxia, Y. Principle and research progress of surface-enhanced Raman scattering (SERS) laser spectroscopy technology combination. *Guangdian Gongcheng/Opto-Electronic Engineering* vol. 52 Preprint at <https://doi.org/10.12086/oee.2025.250225> (2025).
49. De Luca, A. C., Dholakia, K. & Mazilu, M. Modulated raman spectroscopy for enhanced cancer diagnosis at the cellular level. *Sensors (Switzerland)* **15**, 13680–13704 (2015).
50. Kirubha, E. & Palanisamy, P. K. Green synthesis, characterization of Au-Ag core-shell nanoparticles using gripe water and their applications in nonlinear optics and surface enhanced Raman studies. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **5**, (2014).
51. Lin, X. M., Cui, Y., Xu, Y. H., Ren, B. & Tian, Z. Q. Surface-enhanced raman spectroscopy: Substrate-related issues. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1729–1745 (2009).
52. Sadani, K., Nag, P. & Mukherji, S. LSPR based optical fiber sensor with chitosan capped gold nanoparticles on BSA for trace detection of Hg (II) in water, soil and food samples. *Biosens. Bioelectron.* **134**, 90–96 (2019).
53. Oliveira, M. J. *et al.* Office paper decorated with silver nanostars-an alternative cost effective platform for trace analyte detection by SERS. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
54. Chantaraklud, A., Rattanabut, C., Bamrungsap, S. & Bora, T. Light-driven in situ deposited Au nanoparticles on ZnO substrate with ultrasensitive SERS enhancement for molecular detection. *Microchimica Acta* **192**, (2025).
55. Yue, X. *et al.* SERS Performance Factor: A Convenient Parameter for the Enhancement Evaluation of SERS Substrates. *Anal. Chem.* **96**, 17517–17525 (2024).
56. Pham, T. B. *et al.* Synthesis and deposition of silver nanostructures on the silica microsphere by a laser-assisted photochemical method for sers applications. *Photonics Lett. Pol.* **12**, 97–99 (2020).
57. Hardy, M. & Goldberg Oppenheimer, P. ‘When is a hotspot a good nanospot’ - review of analytical and hotspot-dominated surface enhanced Raman spectroscopy nanoplatfroms. *Nanoscale* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d3nr05332f> (2024).
58. Olvera-Aripez, J. *et al.* Biosynthesis of gold nanoparticles by fungi and its potential in SERS. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **47**, 1585–1593 (2024).
59. Zhu, A., Ali, S., Xu, Y., Ouyang, Q. & Chen, Q. A SERS aptasensor based on AuNPs functionalized PDMS film for selective and sensitive detection of Staphylococcus aureus. *Biosens. Bioelectron.* **172**, (2021).
60. Luo, J., Sun, J., Chen, H., Zhao, C. & Ye, M. A Review of High-Sensitivity SERS-Active Photonic Crystal Fiber Sensors for Chemical and Biological Detection. *Sensors* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.3390/s25226982> (2025).
61. Le, T. Van, Vo, T. B. N., Gwon, Y. J., Lee, H. K. & Lee, S. W. Fiber-Optic Sensing System Using Polyhedral Plasmonic Nanostructures as SERS-Active Substrates. *ACS Appl. Nano Mater.* **7**, 21114–21123 (2024).
62. *A 3D-Engineered Fiber-Integrated SERS Material Architecture Enabling On-Probe Calibration and Regeneration for Quantitative Detection in Biologically Complex.*
63. Kim, S. *et al.* Plasmon-induced immobilization of xanthene chemosensors toward repurposing as SERS nanotags. *Surfaces and Interfaces* **44**, (2024).

64. Zheng, D. *et al.* Direct Nucleation of Hierarchical Nanostructures on Plasmonic Fiber Optics Enables Enhanced SERS Performance. *Advanced Science* **12**, (2025).
65. *Fiber Optic Based Platforms for Chemical and Nanomechanical Sensing*. <https://escholarship.org/uc/item/5rh5b8tq>.
66. Richardson, J. J., Björnmalm, M. & Caruso, F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. *Science (1979)*. **348**, (2015).
67. De Acha, N., Elosua, C., Matias, I. & Arregui, F. J. Luminescence-based optical sensors fabricated by means of the layer-by-layer nano-assembly technique. *Sensors (Switzerland)* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/s17122826> (2017).
68. Ramin, B. B. S. *et al.* Layer-by-layer assembly of NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ UCNPs@Cystein and UCNPs@Cys-Ab as hybrid bio-optical sensors for E. coli bacteria. *J. Lumin.* **271**, (2024).
69. Arcas, A. da S., Dutra, F. da S., Allil, R. C. S. B. & Werneck, M. M. Surface plasmon resonance and bending loss-based U-shaped plastic optical fiber biosensors. *Sensors (Switzerland)* **18**, (2018).
70. Pan, L. *et al.* Upconversion-luminescent optical fiber probe for in situ tyrosinase monitoring. *Sens. Actuators B Chem.* **358**, (2022).
71. Kim, J. A. *et al.* Fiber-Optic SERS Probes Fabricated Using Two-Photon Polymerization For Rapid Detection of Bacteria. *Adv. Opt. Mater.* **8**, 1901934 (2020).
72. Xia, M., Zhang, P., Leung, C. & Xie, Y. H. SERS optical fiber probe with plasmonic end-facet. *Journal of Raman Spectroscopy* **48**, 211–216 (2017).
73. Nguyen, T. T., Trinh, K. T. L., Yoon, W. J., Lee, N. Y. & Ju, H. Integration of a microfluidic polymerase chain reaction device and surface plasmon resonance fiber sensor into an inline all-in-one platform for pathogenic bacteria detection. *Sens. Actuators B Chem.* **242**, 1–8 (2017).

LAYER-BY-LAYER ASSEMBLY OF NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ UCNP@CYSTEIN AND UCNP@CYS-Ab AS HYBRID BIO-OPTICAL SENSORS FOR E. coli BACTERIA

Artigo publicado em
Journal of Luminescence · Volume 271 · 2024
DOI: 10.1016/j.jlumin.2024.120590



CAPÍTULO 2

2. LAYER-BY-LAYER ASSEMBLY OF NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ UCNP@CYSTEIN AND UCNP@CYS-Ab AS HYBRID BIO-OPTICAL SENSORS FOR *E. coli* BACTERIA

Beatriz B. S. Ramin,^a Willy G. Santos,^{a,b} Elenice Deffune,^c Marli L. de Moraes,^d and Sidney J. L. Ribeiro ^a

^a São Paulo State University, Institute of Chemistry, Araraquara, SP, 14800-060, Brazil

^b Federal University of ABC – UFABC, Av. dos Estados 5001 – Santo André – SP, 09210-170, Brazil

^c São Paulo State University, Medical School Botucatu, SP, 18618687, Brazil

^d Federal University of São Paulo, Institute of Science and Technology, São José dos Campos, SP, 12247-014, Brazil

2.1 ABSTRACT

An innovative bio-optical Layer-by-Layer sensor was developed for the detection of *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria. This groundbreaking sensor utilizes upconversion $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ nanoparticles (UCNPs) that have been modified with cysteine (UCNPs@Cys) and *E. coli* antibodies (UCNPs@Cys-Ab). The optical sensing system employed Layer-by-Layer (LbL) films of UCNPs, harnessing the emission of rare earth nanoparticles to detect the presence or absence of *E. coli*. The incorporation of Ab into the UCNPs@Cys nanoparticle was confirmed through SEM-EDS imaging, resulting in the formation of aggregated UCNPs@Cys-Ab microparticles with an approximate diameter of 2 μm . To further analyze the sensing capability, Principal Component Analysis (PCA) was employed to examine the differences between the UCNPs@Cys and UCNPs@Cys-Ab sensors. The results indicated that the incorporation of antibodies to the optical system significantly enhanced sensor sensitivity. This improvement was evident in the expanded detection range, which spanned from 2×10^3 to 10^6 CFU/mL, and the remarkably low limit of detection (LOD) value of 34 CFU/mL. These findings highlight the extensive potential of the UCNPs@Cys-Ab as a sensor. Furthermore, it was demonstrated the sensor's enhanced sensitivity and broad detection range make it an invaluable tool for ensuring the well-being of communities by enabling effective management of potential *E. coli* contamination.

KEYWORDS: Biosensor; *Escherichia coli*; Upconversion nanoparticles; Layer-by-Layer (LbL) films.

2.2 INTRODUCTION

The development of efficient methodologies to identify and quantify foodborne pathogenic bacteria is an urgent need for public health and food safety. For example, pathogenic bacterial infection has millions of people worldwide in 2022 ¹. Furthermore, foodborne infections have increased greatly due to the consumption of food contaminated with foodborne pathogens which can be harmful to health.² Among these pathogens, *Escherichia coli* (*E. coli*) is considered to be one of the most consumed foodborne illnesses.³

Several detection strategies for *E. coli* have been developed approaches for detecting *E. coli* mainly include standard colony counting and culture methods ⁴, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ⁵, molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR) ⁶. However, there are many limitations related to these methods, such the use of sophisticated instruments, time-consuming culture procedures, and the need for professional staff ⁷. These disadvantages have limited the application of these techniques in the detection of food pathogens.

New strategies for the detection of specific bacteria have been revolutionized with the development of up-conversion nanoparticles (UCNPs) based on Yb/Er lanthanide ions. These UCNPs offer a promising and innovative photophysical nanomaterial option due to their emission in the visible spectra range and their ability to be excited within the biological window region (600 – 1200 nm). Moreover, because of their unique properties and capabilities, the utilization of UCNP based on Yb/Er lanthanide ions has garnered considerable attention in various fields such as biological sensing ^{8–13}, diagnosis ^{14–19} and treatment techniques.^{20–26}

The nanoparticle may have excellent biocompatibility ²⁷ when a biomolecule such as amino-acid, antibody or other biological macromolecule is incorporated in the surface of the nanoparticle core, allowing its use for a wide range of bio-photophysical properties: (i) greater depth of penetration of light through biological tissue, (ii) good signal-to-noise ratio due to the absence of autofluorescence in the sample, (iii) good chemical and physical stability ^{28,29} and (iv) low toxicity.³⁰

Sensors based on UCNPs conjugated to antibody (Ab) are being successfully developed to detect bacteria with high specificity and sensitivity ^{31–35}. The use of solution-based sensors based on UCNPs has proven to be successful in improving the speed and sensitivity of pathogenic bacteria detection ^{3,31,36}. In the literature, a well-known photophysical properties of lanthanide system is the observation of emission quenching induced by water molecules interactions, which the quenching process is promoted by thermal pathways caused by the overtone vibrational transitions of H₂O molecules, leading to serious depopulation of those emitting states in lanthanide ions such as Yb³⁺ and Er³⁺ ³⁷, and consequently decreases the sensitivity of the sensor operating in aqueous media. It is important to highlight that our sensor was developed as a film, setting it apart from solution-based sensors. Additionally, the use of a film requires less material compared to a solution-based sensor, making it a more economical and sustainable option for the detection of biological agents.

In this study, the fabrication of an advanced optical sensor utilizing the layer-by-layer (LBL) assembly technique was investigated. The sensor was based on NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ upconverting nanoparticles (UCNPs) modified with Cystein and E. coli antibody (Ab) with aim of developing a highly efficient optical sensor specifically designed for the detection of E. coli bacteria. This was based on the hypothesized that the emission of Lanthanide UCNPs could be effectively quenched by bacterial fragments, and the incorporation of the antibody would enhance the sensor's sensitivity and enable precise recognition of the bacteria.

2.3 EXPERIMENTAL SECTION

2.3.1 Materials

Rare earth oxides (Y₂O₃ 99.9%, Yb₂O₃ 99.9% and Er₂O₃ 99.9%) were purchased from REEtec. Nitric acid (HNO₃) and were purchased from Qhemis (Brazil). Ethanol was purchased from Exodo Cientifica (Brazil). Cystein (98 %), sodium fluoride (NaF), sodium citrate (Na₃C₆H₅O₇) and polyvinyl sulphate (PVS) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). The disodium salt of

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was obtained from Merck. All the chemicals were used as received.

The monoclonal IgG antibody (Ab) was produced using the hybridoma technology method ³⁸. Extract of inactivated *E. coli* bacteria was obtained in the cellular engineering laboratory of São Paulo State University - UNESP/Botucatu. The Ab were diluted in PBS buffer at pH 7.4 (0.005 mg/mL) and *E. coli* bacteria in concentrations in the range 2×10^3 to 10^6 CFU/mL.

2.3.2 Synthesis of NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ UCNP

Initially, rare earth nitrate (RE(NO₃)₃) were prepared by dissolving the corresponding oxides (1.41 g Y₂O₃, 2.46 g Yb₂O₃ and 0.05 g Er₂O₃) separately in 65% HNO₃ and evaporating the solution by heating. Deionized water was added to the stock solutions of (RE(NO₃)₃) separately and titrated with EDTA solution ³⁹. The NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ UCNP were synthesized according to the hydrothermal method described in the literature ⁴⁰. Initially, Y(NO₃)₃·6H₂O (1.66 mmol), Yb(NO₃)₃·5H₂O (0.46 mmol) and Er(NO₃)₃·5H₂O (0.08 mmol) were added to a 50 ml beaker. Sodium citrate (353 mg) was mixed into the solution under vigorous stirring at room temperature for 30 min. In the citrate solution, 3 mL of water, 22 mL of ethanol and 150 mg of CTAB were mixed under stirring. Sodium fluoride (672 mg dissolved in distilled water) was added dropwise to the solution under magnetic stirring at room temperature for 2 h to form crystal nuclei. Then, 1.5 ml of nitric acid was added, and the resulting solution was transferred to a 100 ml Teflon-coated autoclave and incubated at 180°C for 8h. The resulting particles were obtained by centrifugation, washed with water and ethanol (1:1 v/v%), and redispersed in distilled water.

2.3.3 UCNP surface modification with cysteine (Cys) and antibody (Ab)

To prepare UCNP@Cys, 100 mg of Cys was added in 15 ml of distilled water, then 1 mL of the dispersed UCNP (76 mg mL⁻¹) solution was added dropwise, allowing the mixture to react at 25°C for 24h. The end product (UCNP@Cys) was collected by centrifugation, washed with ethanolic

solution (1:1 v/v% pure water/ethanol). Afterward, the UCNPs@Cys were dispersed in pure water to be utilized in fluorescence spectroscopy for further analysis.

To prepare UCNPs@Cys-Ab, the UCNPs@Cys particles were dispersed in PBS buffer solution (pH = 7.4), and 0.005 mg/mL of antibody (Ab) was added, allowing the mixture to stand overnight. Fig. 2.1a shows the schematic representation of UCNPs surfaces modification, as well as the incorporation of Cys and Ab on the NPs surface.

2.3.4 Layer-by-Layer assembly of nanostructured films

The films were assembled using the Layer-by-Layer (LbL) self-assembly technique, using polyvinyl sulphate (PVS) as immobilization matrix for the nanoparticles. The LbL films were mounted on quartz plates by immersing the substrate in the PVS solution for 10 min. After this adsorption time, the quartz plate was washed with pure water to remove weakly adsorbed molecules, and then the quartz surface was dried with compressed air. The plate was immersed in the solution of UCNPs for 30 minutes and then the substrate was washed and dried. This procedure was repeated “n” times until obtaining a film with “n” layers.

Fig. 2.1b shows the physical scheme of the (UCNP@Cys)_n and (UCNP@Cys-Ab)_n LbL films, where “n” represents the number of layers, and their performance was monitored through fluorescence spectroscopy.

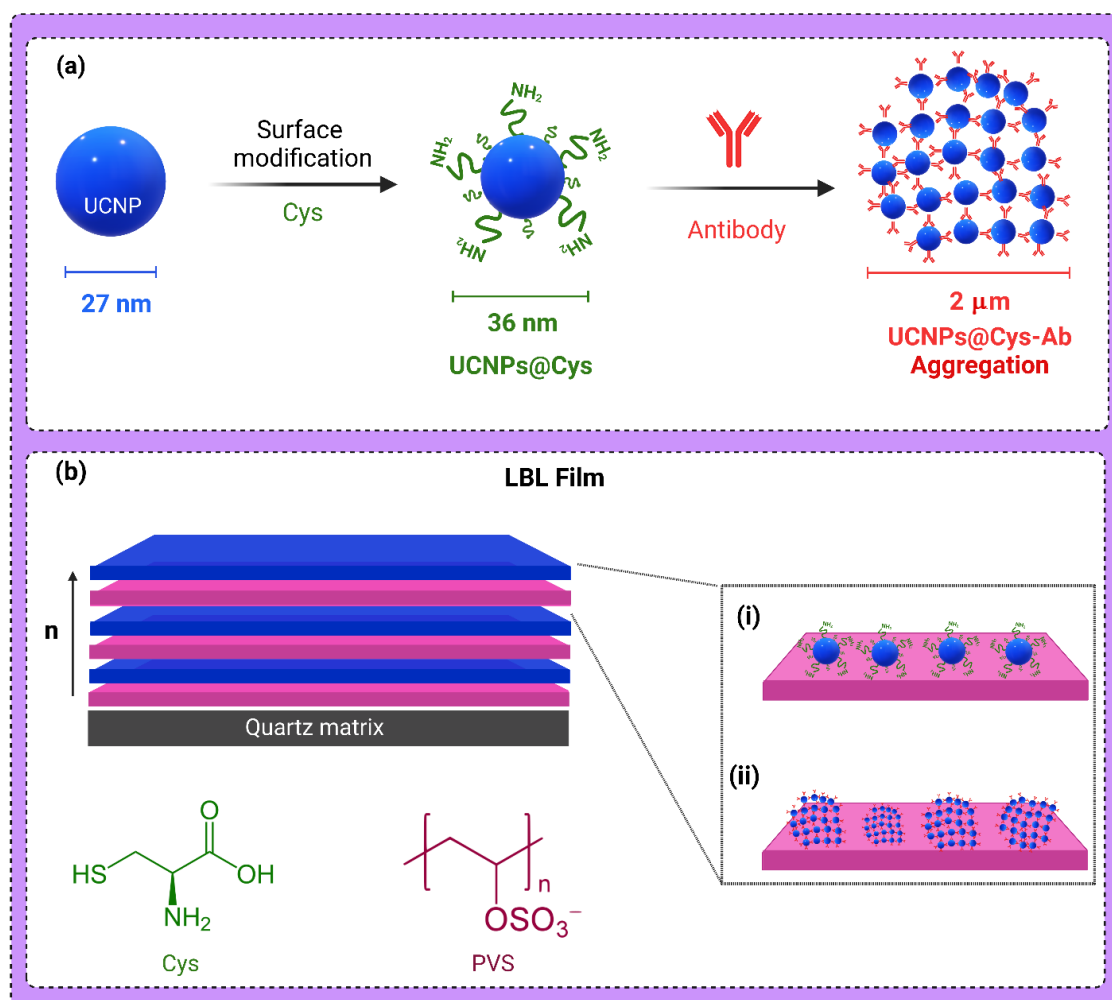


Figure 2.1. (a) Scheme of UCNP-Cys-Ab preparation using cysteine and E. Coli antibody as end-chemical agent. (b) Schematic representation of the LbL film montage using PVS as immobilization substrate.

2.3.5 Luminescence measurements using UCNP@Cys and UCNP@Cys-Ab LbL films

Luminescence measurements of LbL films were performed in the absence and presence of different concentrations of E. coli, using 6 layers of PVS/UCNP@Cys or PVS/UCNP@Cys-Ab. After 10 min of the antigen adsorption time, the biosensor was washed with buffer solution (PBS at pH = 7.4) to remove excess bacteria. The LbL films were then dried to perform the luminescence measurements, using a laser apparatus at 980 nm ($\sim 1000 \text{ mW cm}^{-2}$) as excitation source and emission spectral range of 500 – 700 nm.

2.3.6 Apparatus

TEM and SEM-EDX imaging. Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis of the samples supported on holey carbon-coated copper grids was done using FEI TECNAI (G²F20) transmission electron microscope operated at an accelerating voltage of 200 kV. Energy Scattering X-Ray Spectroscopy (SEM-EDX) was performed using field emission microscope (SEM-FEG) JSM 7200F (Japan Electron Optics Ltd.).

Powder X-ray spectroscopy. Powder X-ray diffractograms of the samples were acquired with a D8 Advance X-ray diffractometer (Bruker) operated at 30 mA and 30kV employing Ni-filtered Cu K α X-ray radiation (λ = 1.54186 Å).

Fourier transform infrared (FTIR). FTIR spectra of the samples were recorded from 4000–400 cm⁻¹ on a Thermo Scientific Nicolet iS5 FTIR spectrometer using pressed KBr tablet.

DFT calculation. Density functional theory (DFT) calculations were performed with the Gaussian 09 (G09) program package, employing the functional B3LYP. The basis set 6-31+(d, p) was used to optimize the gas phase singlet geometries. The MESP map was generated and used to identify the reactivity site of Cystein against chemical attack of acid groups from antibody.

Fluorescence spectroscopy. The photoluminescence spectra of the UCNPs were acquired using a Horiba Jobin Yvon spectrofluorometer (model fluorolog-3 FL3-122) equipped with a photomultiplier tube (model R 928 P, Spex) sensitive between 500 to 700 nm. A laser diode coupled with an optical fiber (200 Nm diameter) was utilized as the excitation source at 980 nm (1000 W/cm⁻²).

Luminescence measurements of LbL films were performed in the absence and presence of different concentrations of E. coli, using 6 layers of UCNP@Cys or UCNP@Cys-Ab. After 10 min of the antibody adsorption time, the biosensor was washed with buffer solution (PBS at pH = 7.4) to remove E. coli in excess. Afterwards, the LbL films were dried to perform the luminescence

measurements, using a laser apparatus at 980 nm ($\sim 1000 \text{ mW cm}^{-2}$) as excitation source and emission spectra range of 500 – 700 nm.

Zeta Potential measurements. The surface charge of the samples was examined using a zeta potential analyzer (Zetasizer nano, United Kingdom).

AFM. Film was analyzed by AFM using Bruker/Dimension Icon AFM equipment. The scanning model was the ScanAsyst with silicon nitride probe, ScanAsyst-Air, frequency of 70 kHz and the spring constant of 0.4 N/m.

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

2.4.1 Characterization and luminescence properties of modified nanoparticles

A slightly cloudy suspension is visually noticeable during the chemical preparation of UCNPs and UCNPs@Cys, indicating the presence of suspended nanoparticles in the solution. The existence of nanoparticles was verified through Transmission Electron Microscopy (TEM) images, as shown in Figure 2.2.

Incorporating cysteine (Cys) molecules into the surface of UCNPs leads to a notable increase in the mean size of the nanoparticles. This size increase is clearly observed in Fig. 2.2b and 2.2d, where the UCNPs and UCNPs@Cys exhibit mean sizes of 27 nm and 36 nm, respectively, indicating that Cys modified the surface of the nanoparticles. The TEM images of UCNPs and UCNPs@Cys (Fig. 2.2a and 2.2b) further confirm the tendency of both nanoparticle systems to form clusters or aggregates.

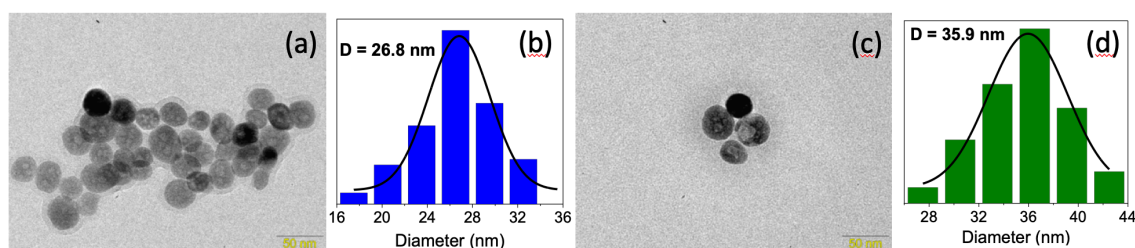


Figure 2.2. Transmission electron microscopy (TEM) images and nanoparticle size histogram of (a, b) UCNPs and (c, d) UCNPs@Cys.

Figure 2.3a and 2.3b display XRD patterns and FTIR spectra of UCNPs and UCNPs@Cys nanoparticles, respectively. The XRD patterns indicate that all investigated nanoparticles present a mixture of two different phases, α and β -NaYF₄ phases (JCPDS n° 27-0688 and 16-0334), with a predominant presence of the α -NaYF₄ phase. Figure 2.3b exhibits distinctive vibrational peaks associated with Cys, showcasing key molecular characteristics. These include the asymmetric stretching of (C=O, acid group) at approximately 1630 cm⁻¹ and the symmetric stretching of (C=O, acid group) at around 1400 cm⁻¹. Additionally, the bending vibration of (N-H) is observed at 1550 cm⁻¹, while a broad band corresponding to the stretching of (N-H) and (C-H) groups is located in the 3000 - 3500 cm⁻¹ range. Furthermore, a weak band attributed to the (S-H) group of Cys can be identified at 2550 cm⁻¹.

The FTIR spectrum of UCNPs@Cys (Fig. 2.3b) exhibits nearly identical vibrational bands for RCOO⁻, -CH, and -NH₂ groups compared to the spectrum of Cysteine. However, the absence of the (S-H) band in the UCNPs@Cys spectrum provides compelling evidence of strong covalent metal-sulfur bonding. This finding strongly supports the surface binding of cysteine with UCNPs through the -SH linkage, which is consistent with previous studies on metal-cysteine systems ^{41,42}.

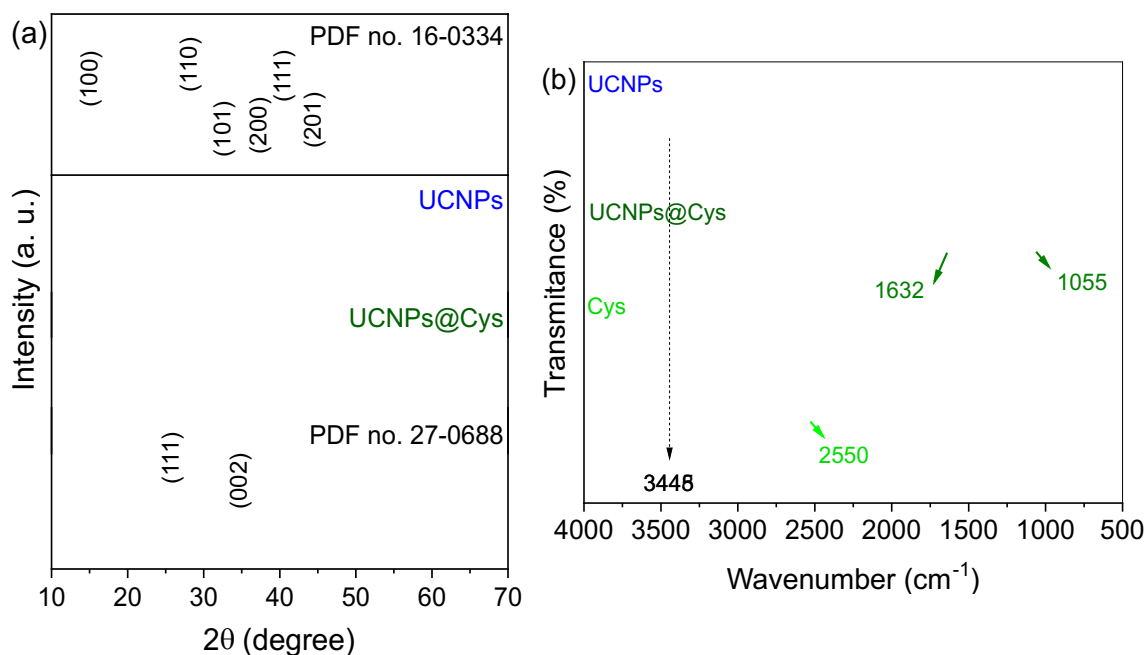


Figure 2.3. (a) XRD patterns of the UCNPs and UCNPs@Cys. The diffractograms on the top and bottom represent the standard diffraction patterns of β -NaYF₄ and α -NaYF₄. (b) FTIR spectrum of UCNPs before and after modification with cysteine.

DFT calculations of the protonated cysteine molecule allowed for the generation of the molecular electrostatic potential surface (MESP). The MESP analysis revealed a prominent region with negative electrostatic potential concentrated in the thiol-group of the cysteine molecule, as illustrated in the left structure of Fig. 2.4. This observation serves as a significant indicator of a preferential center of interaction between cysteine and the surface of the UCNPs.

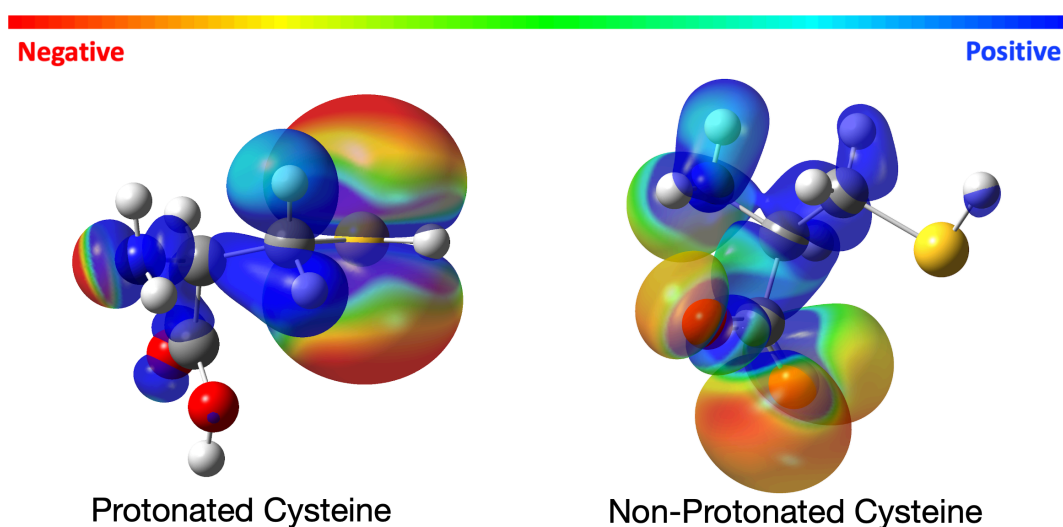


Figure 2.4. Molecule electrostatic potential (MESP) plot for the protonated (left structure) and non-protonated (right structure) cysteine molecule.

The MESP surface of non-protonated cysteine (shown in the right structure of Fig. 2.4) differs from that of protonated cysteine. In the non-protonated form, the anionic cysteine possesses a different negatively charged group ($-\text{COO}^-$) that can interact with the positive charges present on the surface of the UCNPs (as depicted in the right structure of Figure 2.4). As a result, depending on the pH employed during the preparation of UCNPs@Cys, the cysteine molecule may interact with the nanoparticle surface via the thiol ($-\text{SH}$), carboxyl ($-\text{COO}^-$), or both groups.

To assess the impact of the immobilized cysteine structure on the emission characteristics of UCNPs@Cys, fluorescence spectra of UCNPs and UCNPs@Cys were analyzed in an aqueous solution. Figure 2.5a, 2.5b, and 2.5c provide a visual depiction of the emissive nanoparticle, the energy transfer mechanism occurring between Erbium and Ytterbium ions within the NP material, and the fluorescence spectra of UCNPs and UCNPs@Cys nanoparticles, respectively.

As depicted in Figure 2.5a and 2.5b, the Yb^{3+} ion absorbs photons into NIR region at 980 nm leading to the population of the higher energy state ($^2\text{F}_{5/2}$) due to the $^2\text{F}_{7/2} \rightarrow ^2\text{F}_{5/2}$ transition. Thereafter, this excited state transfers its energy to the emitter Er^{3+} ion, populating the higher energy levels of the Er^{3+} through subsequently upconverted absorption processes. The excited state of Er^{3+} ion then returns to its lowest energy state, emitting upconverted photons at wavelengths of 523 nm (see scheme in Fig. 2.5b), which are respectively attributed to $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ and $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ transitions.⁴⁰

As a result of the photophysical process described above, both UCNPs and UCNPs@Cys exhibit three emission bands under NIR excitation at 980 nm, as illustrated in Figure 2.5c. The fluorescence spectra profile of the UCNPs is similar to that of the UCNPs@Cys, and bright green light is observed from both nanoparticles solutions during irradiation at 980 nm. See photo in Fig. 2.5c (figure insert) depicting the UCNPs@Cys solution.

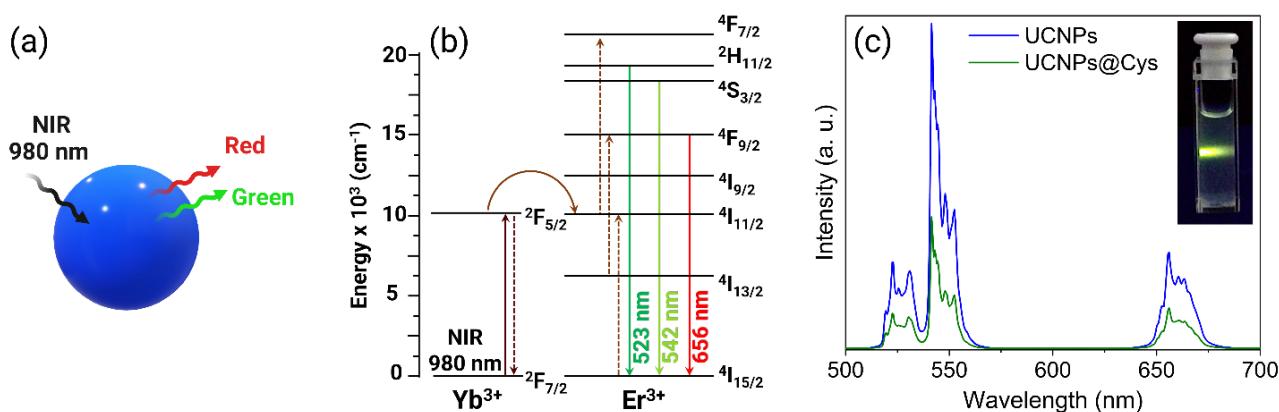


Figure 2.5. (a) Scheme of nanoparticle excitation and emission. (b) Energy transfer mechanism in the NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ UCNPs system. (c) Emission spectra for the UCNPs (black line), UCNPs@Cys (red line) during excitation at 980 nm, using a laser source of 1 W/cm². Fig. 2.5c insert: photo of the emissive UCNPs@Cys in aqueous solution.

In contrast to the emission spectra of the non-modified UCNPs, the emission bands of UCNPs@Cys exhibit low values of emission intensity. This photophysical result may be attributed to an effective non-radiative pathway induced by phonon processes of the metal, coupled with the vibrational processes of the cysteine, which promote the excited state deactivation of Er³⁺ ions as also reported by Zuwu Wei and colleagues for metal-water interactions.⁴³

Aggregation between nanoparticles and IgG antibody units can lead to the formation of microparticles through various mechanisms, such as crosslinking. Crosslinking involves the formation of covalent bonds between molecules, resulting in the creation of a larger structure. In the context of our nanoparticles and antibody systems, it is hypothesized that crosslinking may occur between the functional groups on the nanoparticle surface and the amino acid residues of the antibody.⁴⁴ This crosslinking process may lead to the formation of larger and more stable aggregates or microparticles.

45,46

As prove of the hypothesis above, Figure 2.6a illustrates the presence of isolated nanoparticles of UCNPs@Cys. However, when antibody was added into the UCNps@Cys system, a micro-system was observed to UCNps@Cys-Ab (see Fig. 2.6b).

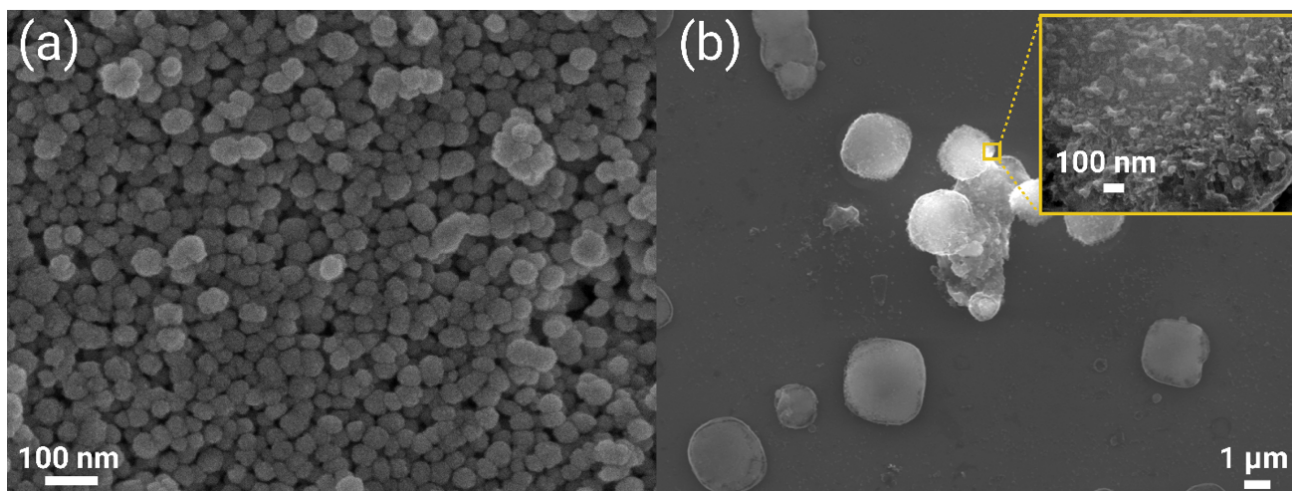


Figure 2.6. TEM images of (a) UCNPs@Cys with size scale of 100 nm and (b) UCNPs@Cys-Ab with size scale of 1 μ m. Fig. 2.6b insert: zoom TEM images of UCNPs@Cys-Ab with size scale of 100nm (Fig. S2.1).

Indeed, the scanning electron microscopy (SEM) images of the UCNPs@Cys-Ab system provide evidence that the aggregation process leads to an increase in particle size to approximately 2 μ m, as depicted in Figure 2.7a.

Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis revealed the presence of fluor (F) and sodium (Na) atoms originating from $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$, indicating the presence of the earth rare units (Figure 2.7b and 2.7c). Furthermore, the analysis detected the presence of cysteine units, as evidenced by the Sulfur atoms in pink color. The antibody presence was confirmed by carbon (red color) and oxygen atoms (green color), as observed in Figure 2.7f. Dedicated images specifically focusing on carbon and oxygen atoms are displayed in Figure 2.7d and 2.7e, respectively.

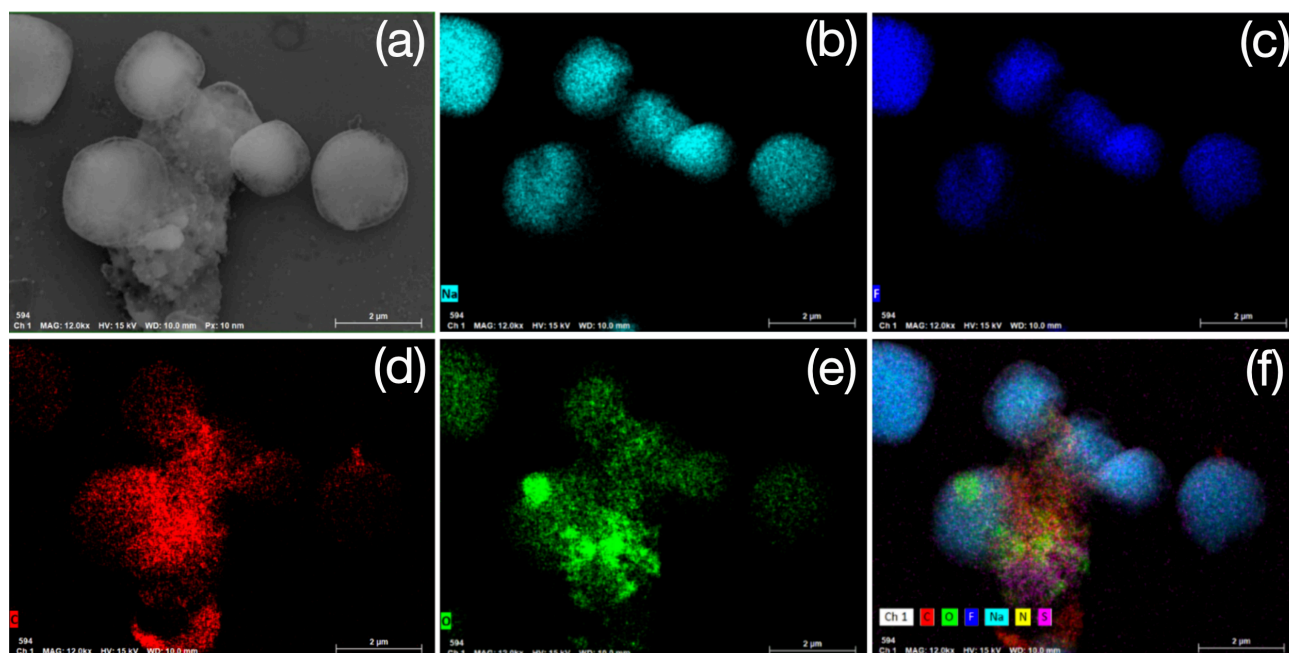


Figure 2.7. MEV images of micro-particles of UCNPs@Cys-Ab. Atom colors: C-atom (red), O-atom (green), F-atom (deep blue), Na-atom (pale blue), N-atom (yellow) and S-atom (pink).

The presence of antibody residues in the microparticle system was also analyzed using zeta potential technique. The mean values for the zeta potential were +36 mV and +24 mV for the isolated UCNPs and UCNPs@Cys systems, respectively. These high positive values of the zeta potential generate a repulsive electrostatic force between nanoparticles, which is a crucial property for preventing agglomeration in suspension.

In contrast with UCNPs and UCNPs@Cys systems, the presence of antibody units on the particle system (UCNPs@Cys-Ab) significantly changes the charge value on the particle surface, resulting in a negative value of -7 mV. When the ζ -potential is so low, the aggregation process becomes more likely, as confirmed in Figure 2.6b. See Figure A2 in the Supplementary Information for all zeta potential values.

2.4.2 Emission properties of LbL films and their use as an *E. coli* biosensor

The luminescent properties of LbL films were investigated by varying the number of layers from 1 to 8, as depicted in Figure 2.8. The impact of the number of layers on the luminescence behavior was analyzed by studying the emission spectra of the films.

When excited with near-infrared (NIR) light at 980 nm, the film demonstrated robust green emission centered around 542 nm, as illustrated in Figure 8. The fluorescence intensity of the UCNPs@Cys-Ab LbL film was found to be higher than that of the UCNPs@Cys LbL film, suggesting the successful immobilization of the antibody on the nanoparticle surface.

The intensity values of the LbL films of UCNPs@Cys or UCNPs@Cys-Ab system display exponential growth after 3-layer, as seen in the inset of Figure 2.8 (intensity versus number of layers). However, beyond the 6-layer point, the emission behavior deviates from the expected linear trend for an emissive material. Instead, a quasi-linear decrease is observed in the emission spectra of the UCNPs@Cys-Ab film, indicating the potential loss of a significant portion of the LbL film due to dissolution or desorption effects. For the AFM image of a 6-layer LbL film of UCNPs@Cys-Ab, please refer to Supplementary Fig. A3.

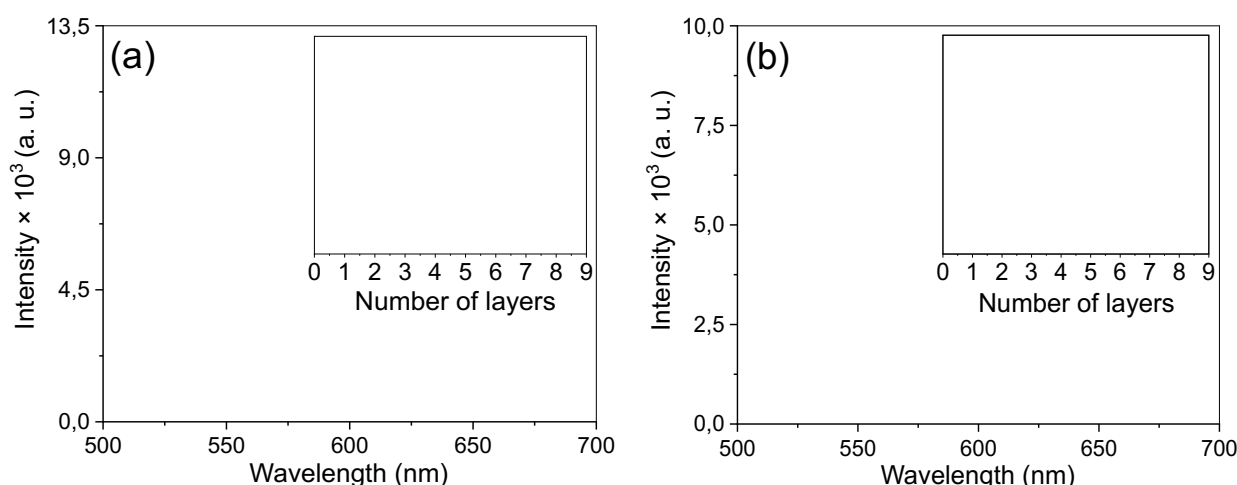


Figure 2.8. Emission spectra of LbL films of (a) UCNPs@Cys and (b) UCNPs@Cys-Ab, varying the number of layers. Graph insert: intensity at 656 nm varying the number of layers. $\lambda_{exc} = 980$ nm.

In order to assess the potential use of LbL films of UCNPs and UCNPs@Cys for *E. coli* bacteria detection, the particle emission was investigated in the presence and absence of bacteria fragment. LbL films comprising 6-layers of UCNPs or UCNPs@Cys were prepared and exposed to varying concentrations of *E. coli* fragment ranging from 2×10^3 to 10^6 CFU/mL. The emission results reveals that the insertion of bacteria fragment resulted in a decrease in the emission intensity of the film, as

illustrated in Figure 2.9a, confirming the occurrence of antibody-bacteria recognition. The elevated value observed for the intensity in UCNPs@Cys-Ab (red color bars) indicates that this particular particle system exhibits improved sensitivity compared to the UCNPs@Cys system (green color bar). This suggests that the presence of antibodies within the particle system makes an effective contribution to the recognition of *E. coli* bacteria.

The Bio-optical sensibility of the LBL sensor was evaluated at different bacteria fragment content. Figure 2.9b shows the linear optical sensor response at 656 nm for both UCNPs@Cys and UCNPs@Cys-Ab systems

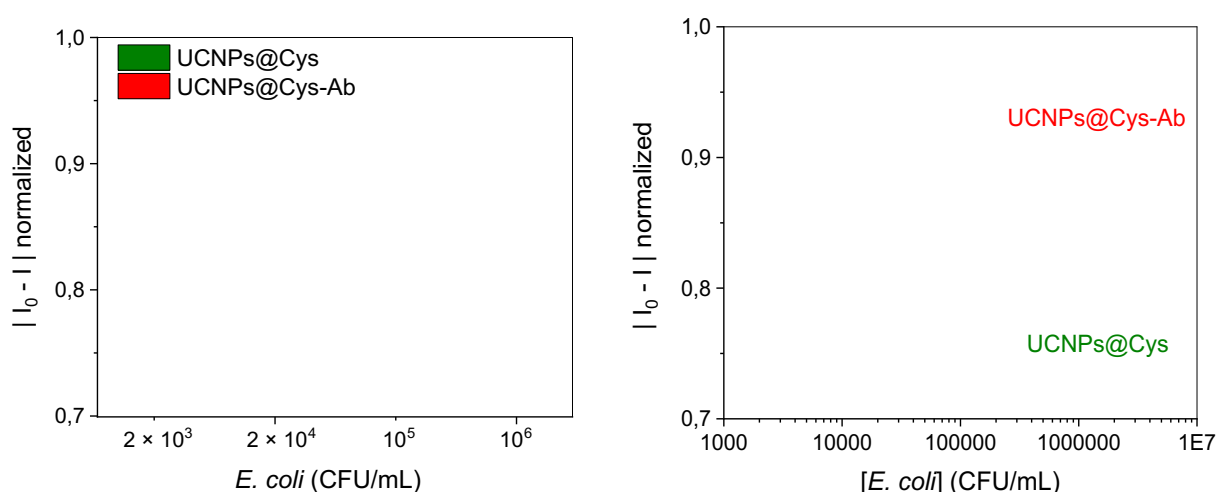


Figure 2.9. Bio-optical sensor response at 656 nm as a function of the concentration of the bacteria fragment. (a) histogram and (b) reformulated Stern-Volmer plot for UCNPs@Cys and UCNPs@Cys-Ab systems.

For UCNPs@Cys and UCNPs@Cys-Ab systems, the detection of limit (LOD) was calculated, using the equation $LOD = 3S/\text{slope}$ previously reported in the literature.⁴⁷ The value of S corresponds to the y-intercept of the linear regression. For both systems, the LbL systems showed low LOD values when compared to other values from literature(see Table 2.1). In fact, low LOD values indicate a high sensitivity of the UCNPs-based LbL systems to detect low content of analyte (*E. coli* bacteria), which makes LbL films comparable to other biosensors usually employed in *E. coli* bacteria quantification (refer to Table 2.1).

Note that, the biosensor reported here, UCNPs are immobilized in nanostructured films on a solid surface, consequently the amount of material used is much smaller when compared to free nanoparticles in solution, making it a cheaper, more effective and promising system for the biosensor application.

Table 2.1. Comparison performance of biosensors in detecting *E. coli* using UCNPs

Material	Linear range (CFU/mL)	LOD (CFU/mL)	Reference
Guanidine-UCNPs	$10^3 - 10^8$	790	48
GO@Fe ₃ O ₄ -UCNPs	$10^3 - 10^7$	467	49
Polymyxin B-UCNPs	$10^1 - 10^9$	36	50
Alendronic acid-UCNPs Nile Blue	$10^2 - 10^6$	33	51
NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺ UCNPs@Cys LbL films	$10^3 - 10^6$	66	This work
NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺ UCNPs@Cys-Ab LbL films	$10^3 - 10^6$	34	This work

The impact of antibody units on the optical-particle system was assessed using Principal Component Analysis (PCA). This statistical technique enables effective discrimination between the two particle systems used in this work in terms of bio-optical sensing. By analyzing the emissive results on the PCA graph, samples that exhibit similarities within each particle system were grouped together.

52,53

By analysis of the PCA graph in Figure 2.10, two different regions of data were observed (see green and red data points), which is useful to explain the observed emissive behaviors of each particle system being investigated.

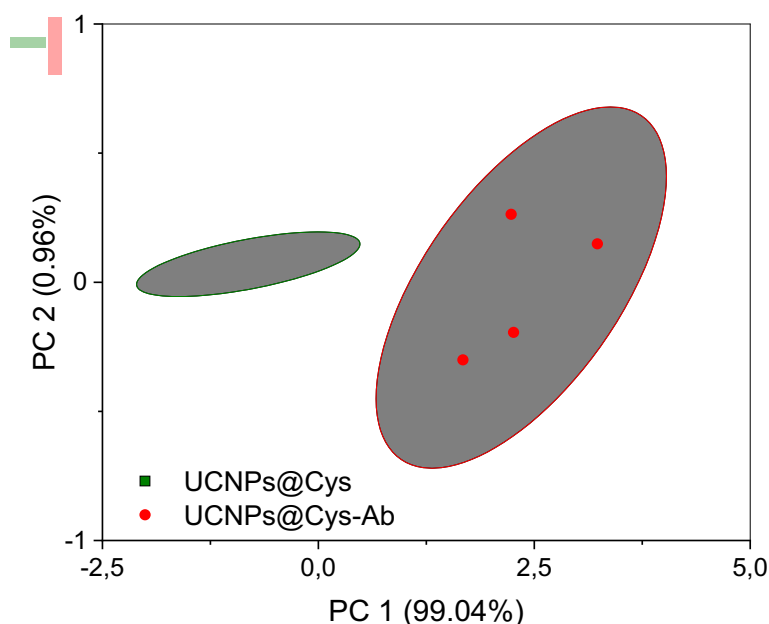


Figure 2.10. Principal Component Analysis - PCA for LbL films of UCNPs@Cys (green color) and UCNPs@Cys-Ab (red color).

As expected by analysis of the PCA graph, two different regions of data were identified by different disposal of each data points (green and red data points), indicating that PCA may be useful to separate and explain the sensibility of each optical sensor being investigated.

To further elaborate on the significance of these findings, it is important to note that the enhanced sensitivity observed in the UCNPs@Cys-Ab system is a result of the specific binding capabilities of the antibodies present. Antibodies, being highly specific to their target antigens, play a crucial role in the recognition and targeting of bacteria. In this case, the presence of antibodies in the particle system facilitates the efficient detection and identification of *E. coli* bacteria.

2.5 CONCLUSION

In summary, a Layer-by-Layer (LbL) bio-optical sensor was developed for the detection of *E. coli* bacteria using NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ upconversion nanoparticles (UCNPs) modified with cysteine and anti-*E. coli*. The study involved the modification of the UCNPs surface with cysteine to form UCNPs@Cys system, followed by the incorporation of anti-*E. coli* antibody (Ab) to form a second

hybrid system denoted as UCNPs@Cys-Ab system. The use of LbL film to immobilize UCNPs@Cys-Ab led to the formation of photophysical systems with high fluorescence sensitivity to antibody-E. coli recognition. The results also demonstrate that the LbL film of UCNPs@Cys-Ab was able to detect from 2×10^3 to 10^6 CFU/mL, presenting low value of LOD (34 CFU/mL).

The presence of antibodies within the particle system effectively contributes to the recognition of E. coli bacteria, offering enhanced sensitivity for the detection and identification of bacterial pathogens. These results hold great potential for advancing diagnostic techniques and biosensing applications, paving the way for more accurate and efficient disease detection in the future.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (proc. 2019/15227-7 and 2020/14009-3). W.G.S. acknowledges to MCTI – SISFóton program for the DTI- A fellowship (382715/2022-5).

REFERENCES

1. Z., Chengcheng. Engineering Sensor Arrays Using Aggregation-Induced Emission Luminogens for Pathogen Identification, *Adv Funct Mater.* (2018).
2. M. Rubab, H.M. Shahbaz, A.N. Olaimat, D.H. Oh, Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food, *Biosens Bioelectron.* 105 (2018) 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.023>.
3. P. Wang, A. Wang, M.M. Hassan, Q. Ouyang, H. Li, Q. Chen, A highly sensitive upconversion nanoparticles-WS2 nanosheet sensing platform for *Escherichia coli* detection, *Sens Actuators B Chem.* 320 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128434>.
4. E. Voitoux, V. Lafarge, C. Collette, B. Lombard, Applicability of the draft standard method for the detection of *Escherichia coli* O157 in dairy products, n.d. www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.
5. N. Kim, I.-S. Park, Application of a flow-type antibody sensor to the detection of *Escherichia coli* in various foods, n.d. www.elsevier.com/locate/bios.
6. D. Lawal, C. Burgess, E. McCabe, P. Whyte, G. Duffy, Development of a quantitative real time PCR assay to detect and enumerate *Escherichia coli* O157 and O26 serogroups in bovine recto-anal swabs, *J Microbiol Methods.* 114 (2015) 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.04.005>.
7. A. Zhu, S. Ali, Y. Xu, Q. Ouyang, Q. Chen, A SERS aptasensor based on AuNPs functionalized PDMS film for selective and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*, *Biosens Bioelectron.* 172 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112806>.
8. B. Zhang, H. Li, W. Pan, Q. Chen, Q. Ouyang, J. Zhao, Dual-Color Upconversion Nanoparticles (UCNPs)-Based Fluorescent Immunoassay Probes for Sensitive Sensing Foodborne Pathogens, *Food Anal Methods.* 10 (2017) 2036–2045. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0758-1>.

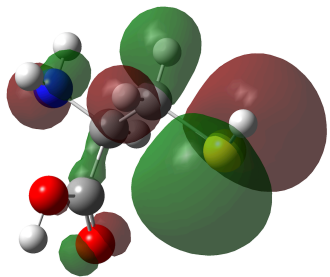
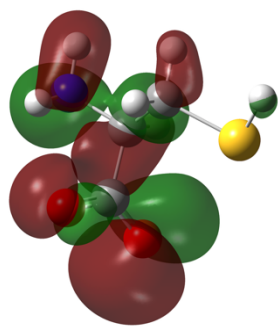
9. L. Ling, L. Ruiyi, W. Guangli, G. Zhiguo, L. Zaijun, Graphene quantum dots-NaYF₄:Yb,Er hybrid with significant enhancement of upconversion emission for fluorescent detection of carcinoembryonic antigen with exonuclease III-aided target recycling amplification, *Sens Actuators B Chem.* 285 (2019) 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.082>.
10. W. Tang, R. Mi, L. Wang, H. Chen, Quantitative image analysis for sensing HIV DNAs based on NaGdF₄:Yb,Er@NaYF₄ upconversion luminescent probe and magnetic beads, *Sens Actuators B Chem.* 340 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129969>.
11. Y. Liu, D. Tu, W. Zheng, L. Lu, W. You, S. Zhou, P. Huang, R. Li, X. Chen, A strategy for accurate detection of glucose in human serum and whole blood based on an upconversion nanoparticles-polydopamine nanosystem, *Nano Res.* 11 (2018) 3164–3174. <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1721-1>.
12. T. Näreoja, T. Deguchi, S. Christ, R. Peltomaa, N. Prabhakar, E. Fazeli, N. Perälä, J.M. Rosenholm, R. Arppe, T. Soukka, M. Schäferling, Ratiometric Sensing and Imaging of Intracellular pH Using Polyethylenimine-Coated Photon Upconversion Nanoprobes, *Anal Chem.* 89 (2017) 1501–1508. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03223>.
13. X. Liu, S.Q. Zhang, X. Wei, T. Yang, M.L. Chen, J.H. Wang, A novel “modularized” optical sensor for pH monitoring in biological matrixes, *Biosens Bioelectron.* 109 (2018) 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.052>.
14. Y. Dai, X. Kang, D. Yang, X. Li, X. Zhang, C. Li, Z. Hou, Z. Cheng, P. Ma, J. Lin, Platinum (IV) pro-drug conjugated NaYF₄: Yb³⁺/Er³⁺ nanoparticles for targeted drug delivery and up-conversion cell imaging, *Adv Healthc Mater.* 2 (2013) 562–567. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200234>.
15. H.T. Phuong, T.T. Huong, L.T. Vinh, H.T. Khuyen, D.T. Thao, N.T. Huong, P.T. Lien, L.Q. Minh, Synthesis and characterization of NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺@silica-N=folic acid nanocomplex for bioimaginable detecting MCF-7 breast cancer cells, *Journal of Rare Earths.* 37 (2019) 1183–1187. <https://doi.org/10.1016/j.jre.2019.01.005>.
16. Y. Gong, Y. Zheng, B. Jin, M. You, J. Wang, X.J. Li, M. Lin, F. Xu, F. Li, A portable and universal upconversion nanoparticle-based lateral flow assay platform for point-of-care testing, *Talanta.* 201 (2019) 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.105>.
17. Q. Lu, L. Xie, S. Yin, F. Chen, C. Wu, M. Liu, H. Li, Y. Zhang, Ultrasensitive detection of microRNA-10b through target-triggered catalytic hairpin assembly and upconversion nanoparticles-based luminescence resonance energy transfer, *Talanta.* 253 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124032>.
18. S. Xu, Y. Yu, Y. Gao, Y. Zhang, X. Li, J. Zhang, Y. Wang, B. Chen, Mesoporous silica coating NaYF₄:Yb,Er@NaYF₄ upconversion nanoparticles loaded with ruthenium(II) complex nanoparticles: Fluorometric sensing and cellular imaging of temperature by upconversion and of oxygen by downconversion, *Microchimica Acta.* 185 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2965-5>.
19. T. Thu Huong, H. Thi Phuong, L. Thi Vinh, H. Thi Khuyen, D. Thi Thao, L. Dac Tuyen, T. Kim Anh, L. Quoc Minh, Upconversion NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@silica-TPGS Bio-Nano Complexes: Synthesis, Characterization, and in Vitro Tests for Labeling Cancer Cells, *Journal of Physical Chemistry B.* 125 (2021) 9768–9775. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c05472>.
20. Q. Lu, L. Xie, S. Yin, F. Chen, C. Wu, M. Liu, H. Li, Y. Zhang, Ultrasensitive detection of microRNA-10b through target-triggered catalytic hairpin assembly and upconversion nanoparticles-based luminescence resonance energy transfer, *Talanta.* 253 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124032>.
21. K.L. Reddy, P.K. Sharma, A. Singh, A. Kumar, K.R. Shankar, Y. Singh, N. Garg, V. Krishnan, Amine-functionalized, porous silica-coated NaYF₄:Yb/Er upconversion nanophosphors for efficient delivery of doxorubicin and curcumin, *Materials Science and Engineering C.* 96 (2019) 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.007>.
22. P. Mukherjee, S. Tripathy, M.G. Matsabisa, S.K. Sahu, Development of upconversion-NMOFs nanocomposite conjugated with gold nanoparticles for NIR light-triggered combinational chemo-photothermal therapy, *J Photochem Photobiol A Chem.* 437 (2023) 114426. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2022.114426>.
23. T. Zhao, Y. Li, X. Zhang, H. Lyu, Z. Xie, A strategy for the accurate detection of glucose in human serum based on the IFE effect of up-transformed nanoparticles, *Microchemical Journal.* 186 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108363>.
24. Y. Wang, Y. Li, Z. Zhang, L. Wang, D. Wang, B.Z. Tang, Triple-Jump Photodynamic Theranostics: MnO₂ Combined Upconversion Nanoplatfoms Involving a Type-I Photosensitizer with Aggregation-Induced Emission Characteristics for Potent Cancer Treatment, *Advanced Materials.* 33 (2021). <https://doi.org/10.1002/adma.202103748>.
25. S. Zha, F. Yang, Z. Ma, H. Wu, D. Zhang, D. Li, Multifunctional upconversion nanocomposite for multi-purpose cancer theranostics, *Mater Des.* 226 (2023) 111682. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.111682>.
26. [L. Cheng, K. Yang, Y. Li, J. Chen, C. Wang, M. Shao, S.T. Lee, Z. Liu, Facile preparation of multifunctional upconversion nanoprobes for multimodal imaging and dual-targeted photothermal therapy, *Angewandte Chemie - International Edition.* 50 (2011) 7385–7390. <https://doi.org/10.1002/anie.201101447>.

27. Q. Wang, T. Liang, J. Wu, Z. Li, Z. Liu, Dye-Sensitized Rare Earth-Doped Nanoparticles with Boosted NIR-IIb Emission for Dynamic Imaging of Vascular Network-Related Disorders, *ACS Appl Mater Interfaces*. 13 (2021) 29303–29312. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c04612>.
28. L. Ruan, Y. Zhang, NIR-excitable heterostructured upconversion perovskite nanodots with improved stability, *Nat Commun*. 12 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20551-z>.
29. B. Yang, H. Chen, Z. Zheng, G. Li, Application of upconversion rare earth fluorescent nanoparticles in biomedical drug delivery system, *J Lumin*. 223 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117226>.
30. F. Wang, X. Liu, Multicolor tuning of lanthanide-doped nanoparticles by single wavelength excitation, *Acc Chem Res*. 47 (2014) 1378–1385. <https://doi.org/10.1021/ar5000067>.
31. B. Jin, S. Wang, M. Lin, Y. Jin, S. Zhang, X. Cui, Y. Gong, A. Li, F. Xu, T.J. Lu, Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection, *Biosens Bioelectron*. 90 (2017) 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.029>.
32. P. Zhao, Y. Wu, Y. Zhu, X. Yang, X. Jiang, J. Xiao, Y. Zhang, C. Li, Upconversion fluorescent strip sensor for rapid determination of *Vibrio anguillarum*, *Nanoscale*. 6 (2014) 3804–3809. <https://doi.org/10.1039/c3nr06549a>.
33. V. Poláchová, M. Pastucha, Z. Mikušová, M.J. Mickert, A. Hlaváček, H.H. Gorris, P. Skládal, Z. Farka, Click-conjugated photon-upconversion nanoparticles in an immunoassay for honeybee pathogen *Melissococcus plutonius*, *Nanoscale*. 11 (2019) 8343–8351. <https://doi.org/10.1039/c9nr01246j>.
34. G. Hu, W. Sheng, Y. Zhang, J. Wang, X. Wu, S. Wang, Upconversion Nanoparticles and Monodispersed Magnetic Polystyrene Microsphere Based Fluorescence Immunoassay for the Detection of Sulfaquinoxaline in Animal-Derived Foods, *J Agric Food Chem*. 64 (2016) 3908–3915. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01497>.
35. W. Pan, J. Zhao, Q. Chen, Fabricating Upconversion Fluorescent Probes for Rapidly Sensing Foodborne Pathogens, *J Agric Food Chem*. 63 (2015) 8068–8074. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02331>.
36. R. Liu, S.A. Haruna, S. Ali, J. Xu, Y. Zhang, P. Lü, H. Li, Q. Chen, A sensitive and accurate fluorescent genosensor for *Staphylococcus aureus* detection, *Sens Actuators B Chem*. 355 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131311>.
37. B. Huang, J. Bergstrand, S. Duan, Q. Zhan, J. Widengren, H. Ågren, H. Liu, Overtone Vibrational Transition-Induced Lanthanide Excited-State Quenching in Yb³⁺/Er³⁺-Doped Upconversion Nanocrystals, *ACS Nano*. 12 (2018) 10572–10575. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.8b05095>.
38. G. Kohler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*. 256 (1975).
39. S. Ullah, C. Hazra, E.P. Ferreira-Neto, T.C. Silva, U.P. Rodrigues-Filho, S.J.L. Ribeiro, Microwave-assisted synthesis of NaYF₄:Yb³⁺/Tm³⁺ upconversion particles with tailored morphology and phase for the design of UV/NIR-active NaYF₄:Yb³⁺/Tm³⁺@TiO₂ core@shell photocatalysts, *CrystEngComm*. 19 (2017) 3465–3475. <https://doi.org/10.1039/c7ce00809k>.
40. R. Rafique, S.H. Baek, C.Y. Park, S.J. Chang, A.R. Gul, S. Ha, T.P. Nguyen, H. Oh, S. Ham, M. Arshad, H. Lee, T.J. Park, Morphological evolution of upconversion nanoparticles and their biomedical signal generation, *Sci Rep*. 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35513-1>.
41. A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 1767 (2007) 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>.
42. G. Qingquan, M. Xinfu, X. Yu, T. Wei, Z. Hui, Green synthesis and formation mechanism of Ag nanoflowers using L-cysteine and the assessment of Ag nanoflowers as SERS substrates, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 530 (2017) 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.072>.
43. [Z. Wei, L. Sun, J. Liu, J.Z. Zhang, H. Yang, Y. Yang, L. Shi, Cysteine modified rare-earth up-converting nanoparticles for invitro and invivo bioimaging, *Biomaterials*. 35 (2014) 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.110>.
44. A.C. Marques, P.J. Costa, S. Velho, M.H. Amaral, Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies, *Journal of Controlled Release*. 320 (2020) 180–200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.035>.
45. Z. Farka, M.J. Mickert, A. Hlaváček, P. Skládal, H.H. Gorris, Single molecule upconversion-linked immunosorbent assay with extended dynamic range for the sensitive detection of diagnostic biomarkers, *Anal Chem*. 89 (2017) 11825–11830. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03542>.
46. S. Lahtinen, M. Baldtzer Liisberg, K. Raiko, S. Krause, T. Soukka, T. Vösch, Thulium- And Erbium-Doped Nanoparticles with Poly(acrylic acid) Coating for Upconversion Cross-Correlation Spectroscopy-based Sandwich Immunoassays in Plasma, *ACS Appl Nano Mater*. 4 (2021) 432–440. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c02770>.

47. A. Shrivastava, V. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientists*. 2 (2011) 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.
48. M. Yin, C. Wu, H. Li, Z. Jia, Q. Deng, S. Wang, Y. Zhang, Simultaneous Sensing of Seven Pathogenic Bacteria by Guanidine-Functionalized Upconversion Fluorescent Nanoparticles, *ACS Omega*. 4 (2019) 8953–8959. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00775>.
49. Y. Yao, G. Xie, X. Zhang, J. Yuan, Y. Hou, H. Chen, Fast detection of *E. coli* with a novel fluorescent biosensor based on a FRET system between UCNPs and GO@Fe₃O₄ in urine specimens, *Analytical Methods*. 13 (2021) 2209–2214. <https://doi.org/10.1039/d1ay00320h>.
50. Y. Qiao, H. Geng, N. Jiang, X. Zhu, C. Li, Q. Cai, Polymyxin B–modified upconversion nanoparticles for selective detection of Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *J Chem Res*. 44 (2020) 756–761. <https://doi.org/10.1177/1747519820911266>.
51. Y. Song, M. Chen, L. Han, Z. Yan, L. Pan, K. Tu, A novel ADA-coated UCNPs@NB sensing platform combined with nucleic acid amplification for rapid detection of *Escherichia coli*, *Anal Chim Acta*. 1239 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340751>.
52. M. Yaghoubi, F. Rahimi, B. Negahdari, A.H. Rezayan, A. Shafiekhani, A lectin-coupled porous silicon-based biosensor: label-free optical detection of bacteria in a real-time mode, *Sci Rep*. 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72457-x>.
53. A.L.Y. Yokomichi, V. da C. Rodrigues, A. Moroz, M. Bertanha, S.J.L. Ribeiro, E. Deffune, M.L. Moraes, Detection of factor VIII and D-dimer biomarkers for venous thromboembolism diagnosis using electrochemistry immunosensor, *Talanta*. 219 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121241>.

2.7 SUPPORTING INFORMATION

Table S2.1. DFT calculation.

Molecule: Protonated Cysteine				Molecule: Non-Protonated Cysteine			
 Orbital contour – HOMO b3lyp/6-31+g(d,p) iefpcm,solvent = water Charge = 0 Multiplicity = 1				 Orbital contour – HOMO b3lyp/6-31+g(d,p) iefpcm,solvent = water Charge = -1 Multiplicity = 1			
C	0.1921	1.10419	1.2574	C	0.90538	0.91317	0.31549
H	1.2621	1.10249	1.25838	H	0.71075	0.89979	1.38991
H	-0.16296	2.11357	1.25643	H	1.31081	1.88797	0.03615
C	-0.32354	0.37986	2.51481	C	-0.40729	0.69203	-0.46084
H	-1.39354	0.3819	2.51402	H	-0.19744	0.6483	-1.53258
S	-0.40124	0.2651	-0.19596	S	2.15113	-0.4005	-0.08498
H	-0.32133	1.06821	-1.22782	H	2.99658	-0.12215	0.92546
O	0.22784	-1.56289	3.8588	O	-1.40948	-0.70517	1.19036
H	0.52758	-2.47489	3.85826	C	-1.06833	-0.64036	-0.1111
C	0.18703	-1.07303	2.51594	O	-1.28825	-1.53985	-0.89997
O	-0.68531	-1.9166	1.75942	N	-1.39689	1.75364	-0.24203
N	0.16689	1.07252	3.71506	H	-1.53203	1.92359	0.75236
H	0.65544	1.90218	3.44489	H	-1.07435	2.6226	-0.66028
H	-0.60747	1.31681	4.29874				

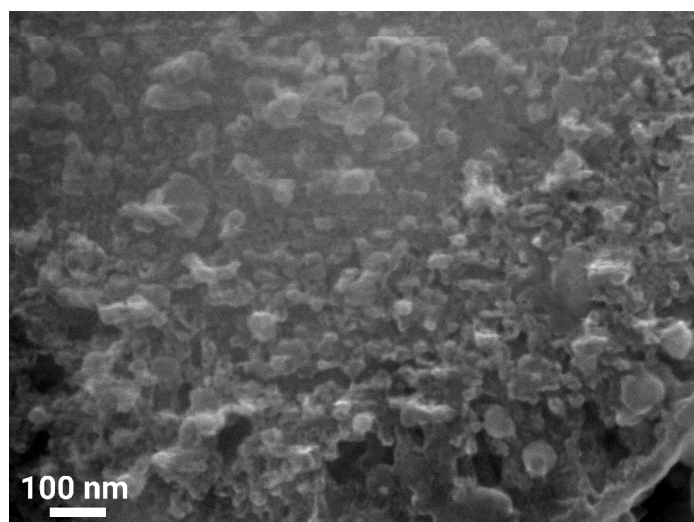


Figure S2.1. TEM images of UCNPs@Cys-Ab with size scale of 100nm.

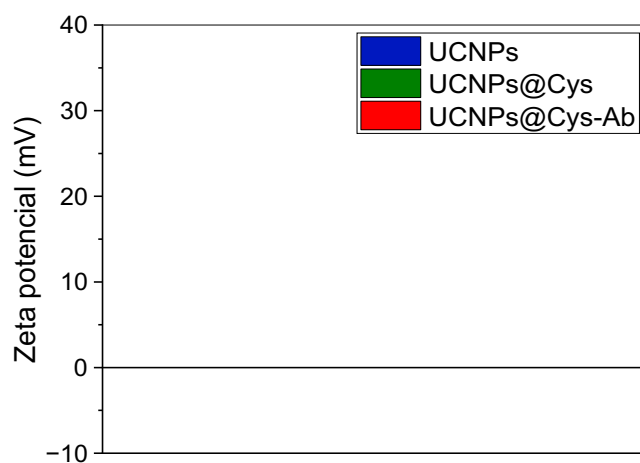


Figure S2.2. Zeta potential values of UCNPs, UCNPs@Cys and UCNPs@Cys-Ab.

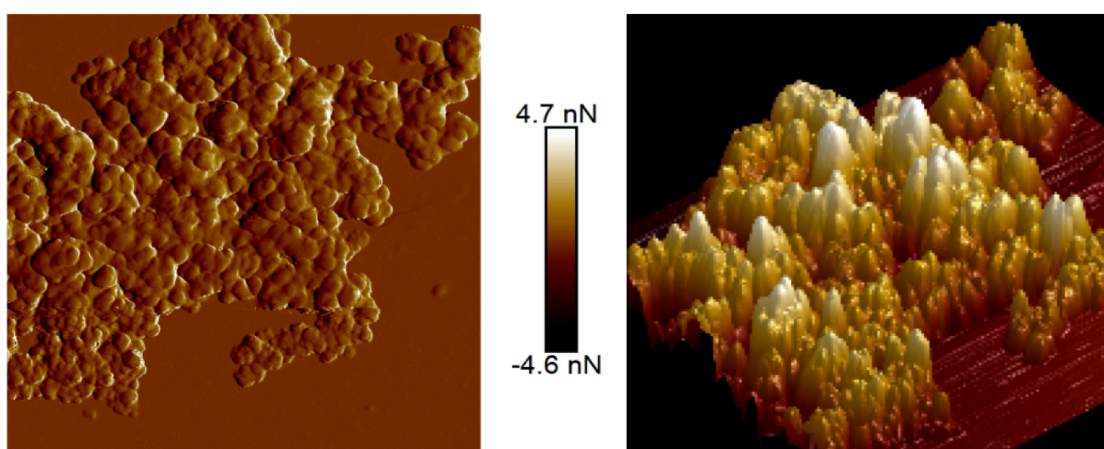


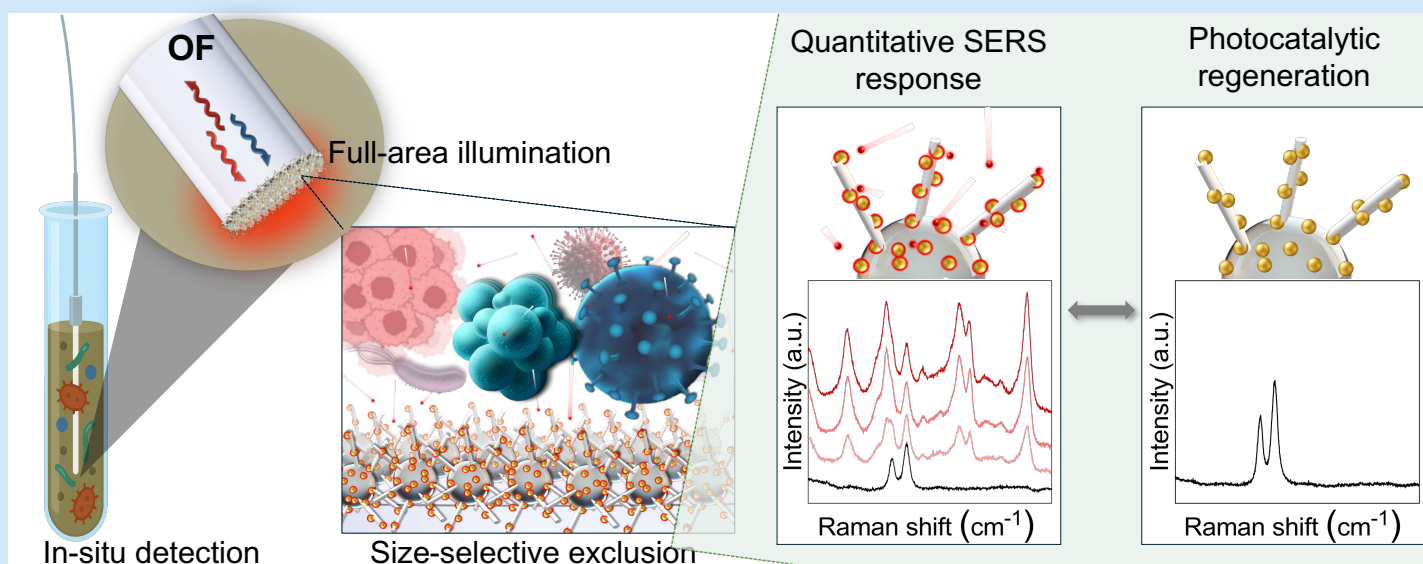
Figure S2.3. AFM image showing the surface morphology (left) as well as the 3D view (right) of 6-layer LbL film of UCNPs@Cys-Ab.

A 3D-ENGINEERED FIBER-INTEGRATED SERS MATERIAL ARCHITECTURE ENABLING ON-PROBE CALIBRATION AND REGENERATION FOR QUANTITATIVE DETECTION IN BIOLOGICALLY COMPLEX LIQUIDS

Artigo publicado em

Chemical Engineering Journal · Volume 542 · 2026

DOI: 10.1016/j.cej.2026.178068



CAPÍTULO 3

3. A 3D-ENGINEERED FIBER-INTEGRATED SERS MATERIAL ARCHITECTURE ENABLING ON-PROBE CALIBRATION AND REGENERATION FOR QUANTITATIVE DETECTION IN BIOLOGICALLY COMPLEX LIQUIDS

Beatriz Bianca Schulz Ramin^{1,2}, Sanggon Kim^{2,3*}, Yves De Koninck³, Sidney Jose Lima Ribeiro^{1*}, and Younes Messaddeq^{2*}

1 São Paulo State University, Institute of Chemistry, Araraquara, SP, 14800-060, Brazil

2 Center for Optics, Photonics and Lasers (COPL), Department of Physics, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

3 CERVO Brain Research Centre, Quebec Mental Health Institute, Department of Psychiatry and Neuroscience, Université Laval, Québec, QC G1E 1T2, Canada

3.1 ABSTRACT

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) enables rapid, label-free molecular identification, yet quantitative sensing in biologically complex liquids is often limited by fouling, signal heterogeneity, poor reusability, and interference from suspended matter and microorganisms. Here, we report a fiber-integrated SERS platform that overcomes these challenges through three-dimensionally engineered architecture, in which the optical fiber serves as an active element for excitation delivery, signal collection, and calibration. A hierarchical silica microparticle/zinc oxide nanorod/gold nanoparticle (Si μ P/ZnO NR/AuNP) structure creates a dense volumetric hotspot network with enhanced electromagnetic field uniformity. Coupled with uniform full-area fiber illumination, this design enables spatially stable signal acquisition while providing size-selective exclusion of microorganism-scale species. *In situ* photocatalytic regeneration allows repeated reuse of the same probe and enables on-probe calibration, substantially reducing reliance on substrate-to-substrate uniformity. Relative to two-dimensional and quasi-three-dimensional structured fibers, the platform delivers $>10^4$ and $>10^3$ sensitivity enhancements, respectively. It also provides experimentally detectable responses down to 100 pM Rhodamine B, with calculated detection limits in the low nanomolar range. Stable performance is maintained over multiple regeneration cycles, enabling preparation-free sensing by direct immersion in biologically complex aqueous environments.

KEYWORDS: SERS, Hierarchical materials architecture, Fiber-integrated materials, photocatalytic regeneration, Size-selective exclusion

3.2 INTRODUCTION

Accurate detection of small organic molecules in liquid-phase environments remains a central analytical challenge across environmental, industrial, and bioengineered contexts. In many representative liquid systems, dissolved organic compounds coexist with suspended particulates, macromolecular species, or living microorganisms, creating heterogeneous matrices that complicate selective molecular detection. Organic molecules such as pharmaceuticals, synthetic dyes, solvents, pesticides, and industrial byproducts can strongly influence chemical reactivity, biological activity, and process performance, motivating the development of analytical approaches capable of probing complex liquids without extensive sample preparation or chemical modification.^{1,2}

In this context, Raman spectroscopy offers a highly promising capability for label-free identification of organic molecules in liquid-phase environments, including environmental waters and bioengineered process media. Its fast, non-destructive, and highly selective nature enables direct analysis of aqueous samples with minimal preparation, negligible water interference, and no need for toxic reagents, making it practical and efficient.^{3–6} However, the inherently weak Raman scattering cross-section limits sensitivity at low concentrations, particularly in heterogeneous liquids where background signals and physical obstruction further degrade performance.

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) overcomes this limitation by amplifying Raman signals through localized electromagnetic fields generated at plasmonic nanostructures.⁷ Despite its high sensitivity, conventional SERS substrates face persistent challenges that complicate reliable signal interpretation in liquid-phase environments.^{8,9} Strong and often irreversible adsorption of analytes to plasmonic surfaces commonly restricts SERS substrates to single-use operation. In addition, spatially non-uniform distributions of plasmonic “hotspots” produce pronounced signal variability across the sensing surface, leading to fluctuations not only between independently prepared substrates but also within a single substrate. As a result, spatial averaging is often required even within one substrate to

obtain quantitative readouts. These effects primarily compromise measurement reliability and complicate quantitative interpretation. Furthermore, in biologically or chemically complex liquids, fouling by particulates or microorganisms can interfere with target SERS signals, frequently necessitating filtration or centrifugation steps prior to measurement, thereby negating the advantages of direct, *in situ* sensing.

To overcome these limitations, fiber-based SERS probes have emerged as a promising alternative, leveraging the inherent advantages of optical fibers for compact, remote, and *in situ* sensing. By enabling simultaneous light delivery and signal collection within a single waveguide platform, fiber-based systems offer improved accessibility to confined or otherwise inaccessible environments. However, existing fiber-based SERS designs are largely based on tip-functionalized or surface-coated geometries, where the active sensing region is confined to a limited surface area.⁹ This restriction reduces analyte-hotspot interaction volume, limits signal efficiency, and compromises robustness in heterogeneous media. Furthermore, these architectures often inherit the same limitations as planar substrates, including hotspot non-uniformity, limited reusability, and susceptibility to fouling.

In parallel, hierarchical three-dimensional (3HD) SERS architectures have been extensively explored in planar platforms as a strategy to enhance sensing performance. By integrating multi-scale structural features, 3HD designs increase hotspot density, improve light-matter interaction, and promote analyte confinement within plasmonic regions. These structures have demonstrated improved sensitivity and signal uniformity compared to conventional planar substrates.^{10,11} However, their implementation has remained largely confined to static, planar formats, limiting their applicability in dynamic liquid environments and restricting their integration into compact or remotely deployable sensing systems.

Here, we bridge these two approaches by introducing a fiber-integrated 3HD SERS platform designed for robust, reversible, and spatially uniform detection of small organic molecules in complex

liquid environments. The proposed system combines the structural advantages of 3HD architectures with the functional versatility of optical fibers, enabling a new class of in situ SERS probes.

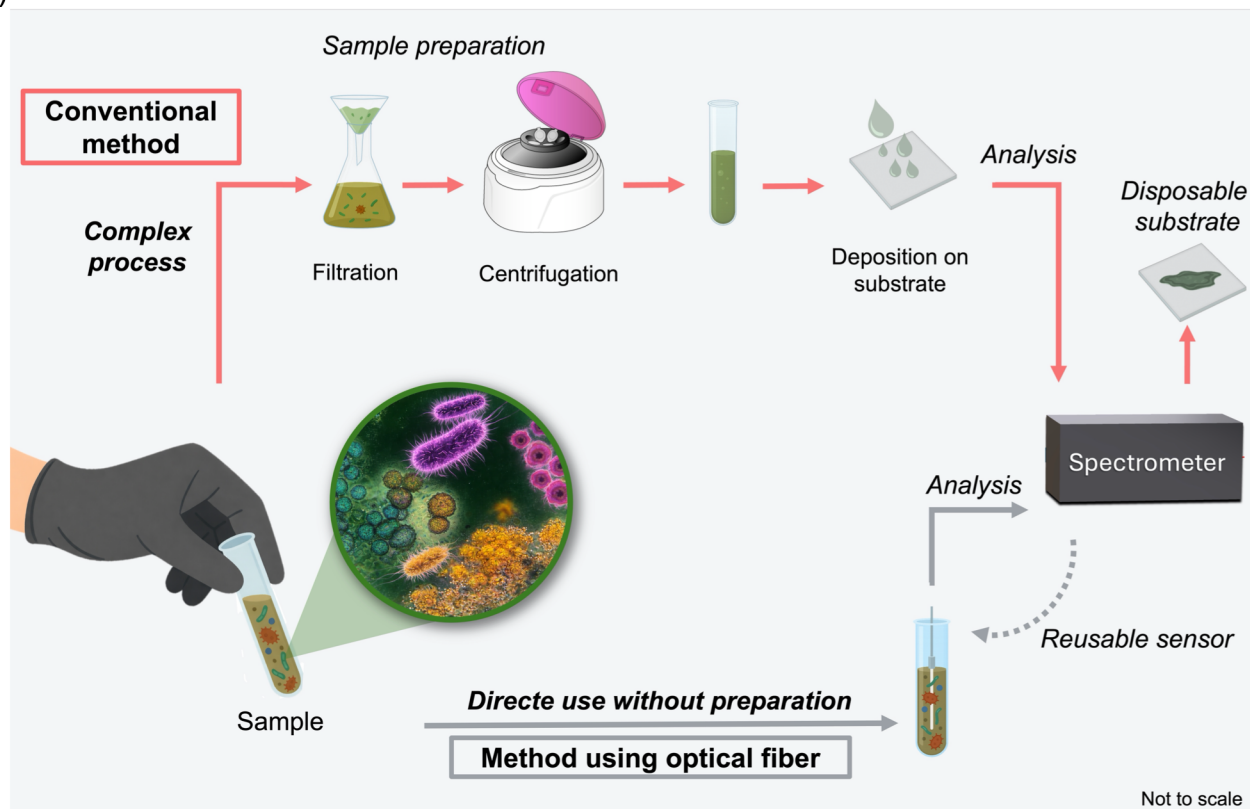
Specifically, the 3HD architecture is implemented on the fiber tip using silica microparticles (Si μ P) as a structural scaffold, zinc oxide nanorods (ZnO NR) as a high-surface-area semiconductor framework, and gold nanoparticles (AuNPs) as plasmonic enhancers, forming a Si μ P/ZnO NR/AuNP composite structure (Fig. 3.1b). This hierarchical design enables volumetric plasmonic interactions within a confined fiber geometry while preserving efficient light delivery and collection through the waveguide.

Beyond structural integration, the platform is designed to incorporate multiple complementary functionalities within a single probe. (i) The volumetric distribution of AuNPs within the radially oriented ZnO NR network significantly increases hotspot density and promotes uniform excitation of plasmonic regions, enhancing Raman signal generation. (ii) The intrinsic photocatalytic activity of ZnO enables in situ regeneration of the sensing surface under controlled UV illumination, allowing repeated use of the same probe. This capability supports on-probe calibration, defined here as a same-probe workflow enabled by regeneration. In this workflow, calibration measurements and subsequent sample analysis can be performed sequentially on the same regenerated sensing interface, rather than on separate probes or substrates. By maintaining an identical measurement regenerated sensing interface, this approach reduces uncertainty arising from probe-to-probe variability, substrate non-uniformity, and differences in hotspot distribution. This reduces errors associated with probe-to-probe variability. (iii) The ZnO NR network provides a size-selective filtration effect, limiting the penetration of large interfering species such as particulates or microorganisms while allowing diffusion of small organic molecules, thus improving signal fidelity and reducing fouling. (iv) Integration onto an optical fiber enables compact probe geometry, remote operation, and direct immersion into liquid samples without preprocessing. (v) The inherent uniform-area illumination provided by the fiber geometry reduces

spatial signal variability, mitigating the need for spatial mapping or averaging required in conventional SERS measurements.

Together, these features establish the fiber-integrated 3HD SERS architecture as an analytical platform for elucidating structure-function relationships that govern SERS performance in heterogeneous liquid environments. In this study, the proposed design principles are validated using biologically complex aqueous systems as a representative testbed, with emphasis on microorganism coexistence, regeneration behavior, and architecture-enabled signal control. Rhodamine B is used as a representative molecular probe to isolate and evaluate the architectural and operational characteristics of the platform. Figure 3.1a compares the workflow of organic molecule analysis using the fiber-based 3HD SERS architecture with conventional SERS approaches, highlighting its streamlined operation, reusability, and suitability for direct immersion without sample pretreatment.

(a)



(b)

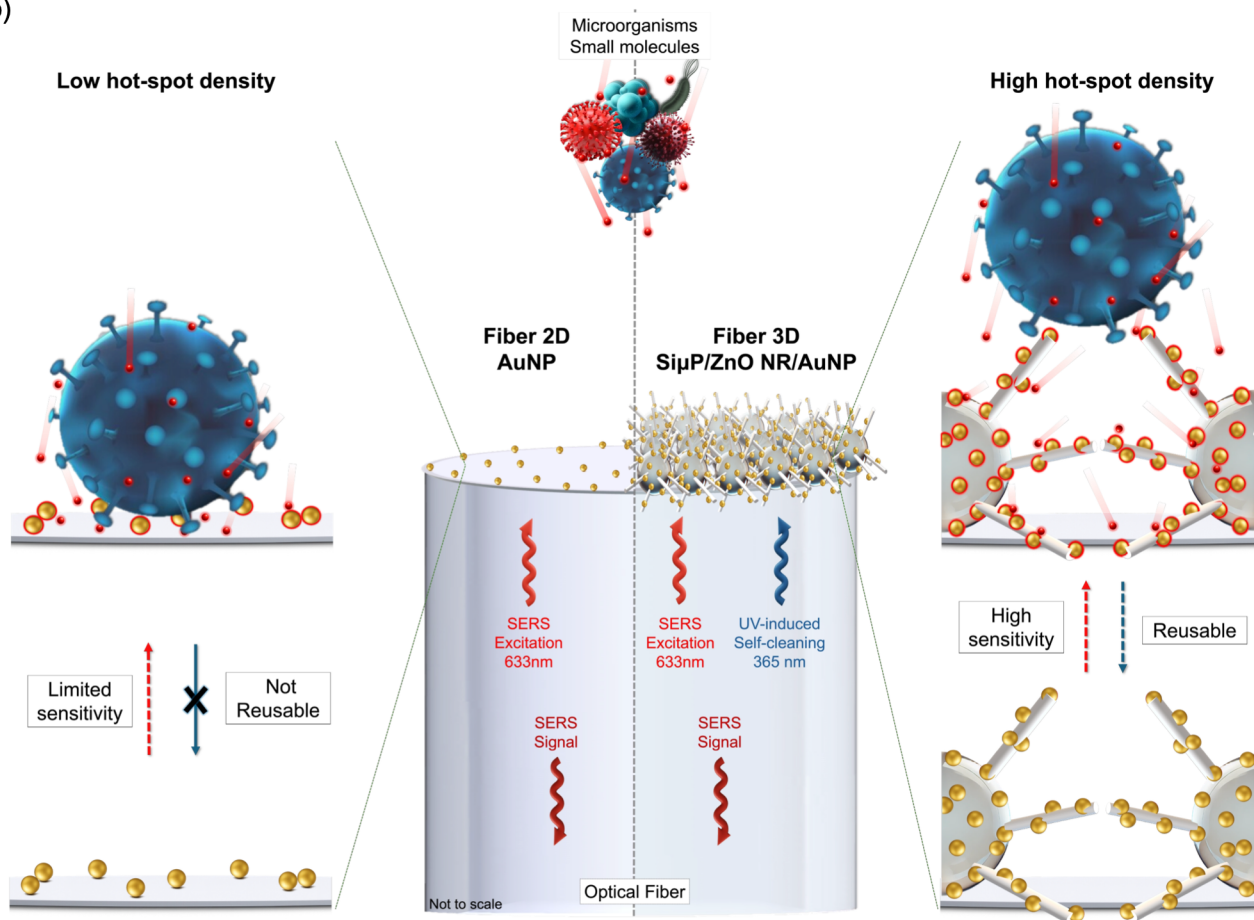


Figure 3.1. Conceptual comparison of SERS detection strategies and fiber-integrated architectures for sensing small organic molecules in biologically complex liquids. (a) Schematic comparison between conventional planar, substrate-based SERS workflows and the 3D-engineered fiber-integrated SERS architecture, illustrating direct-immersion, preparation-free measurements under microorganism coexistence. (b) Schematic representation of fiber tips incorporating distinct SERS-active architectures: a two-dimensional (2D, left) surface-localized configuration and a hierarchical three-dimensional (3HD, right) architecture. The 3HD design supports a volumetric plasmonic hotspot network that enhances signal strength and spatial uniformity, while ZnO-enabled photocatalytic regeneration and size-selective exclusion mitigate fouling and enable repeated use in heterogeneous liquid environments.

3.3 EXPERIMENTAL SECTION

3.3.1 Synthesis of ZnO seeds: ZnO seed solutions were prepared by dissolving zinc acetate dihydrate (0.01 M) in 125 mL of methanol under vigorous stirring at 60 °C. After complete dissolution, 65 mL of a potassium hydroxide solution in methanol (0.03 M) was added dropwise. The mixture was then maintained under continuous stirring at 60 °C for 2 hours to complete the synthesis.¹² The resulting ZnO seeds had an average diameter of approximately 6 nm.

3.3.2 Synthesis of AuNPs and ligand exchange with PVP: AuNPs were obtained by adding an aqueous HAuCl₄ solution (90 mL, 1.3 mM) to boiling water under vigorous stirring, followed by the rapid addition of sodium citrate (4.38 mL, 38.8 mM). The reaction mixture was refluxed for 15 minutes under continuous stirring, cooled to room temperature, and then stored at 2 °C. A statistical analysis of AuNP diameters was conducted based on a micrograph acquired via SEM, revealing a mean particle diameter of approximately 50 nm.

For ligand exchange, the AuNP solution was centrifuged at 15,000 rpm for 30 min to concentrate the NPs into a 2 mL volume. Separately, a Polyvinylpyrrolidone (PVP) solution (Mw ≈ 55,000) was prepared by dissolving 50 mg of the PVP in 15 mL of ethanol. The concentrated AuNPs suspension was slowly added dropwise to the PVP solution under continuous stirring and allowed to react overnight to promote ligand exchange. Excess PVP was removed by three washes with acetone and two with ethanol, followed by centrifugation and final concentration to 1 mL.⁷ All reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

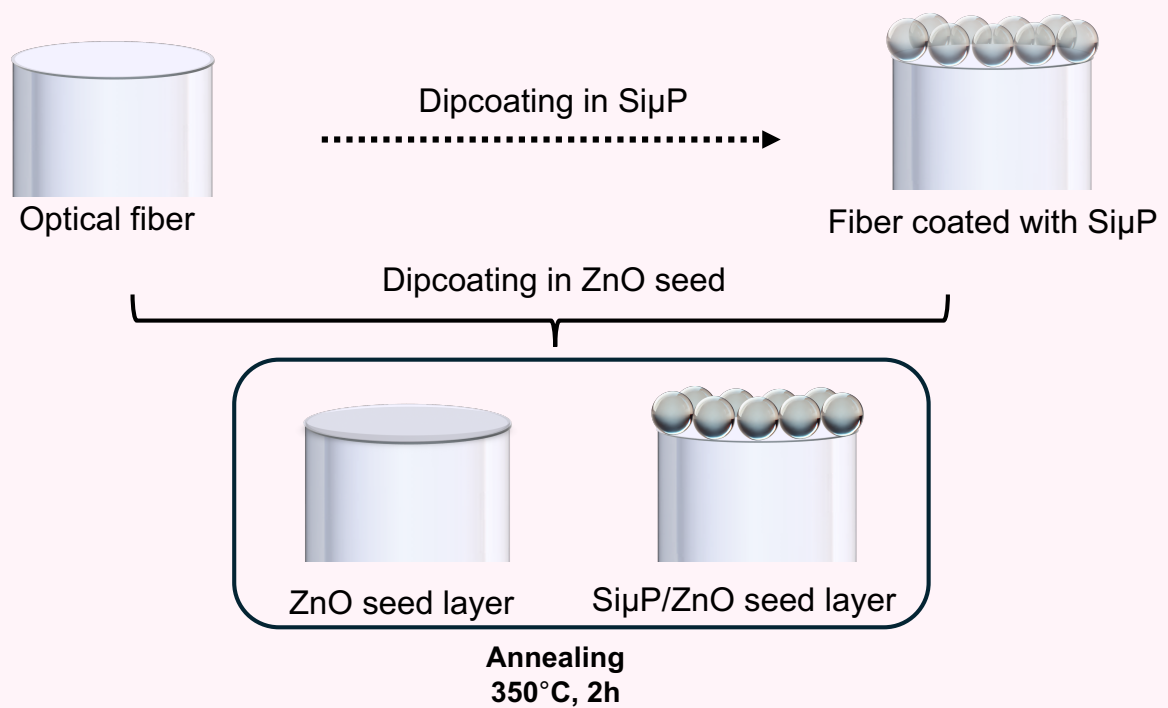
3.3.3 Fabrication of structured fiber-optic SERS probes: Multimode silica optical fibers (FG105UCA, Thorlabs) featuring a numerical aperture (NA) of 0.22 and a core diameter of 105 μm were employed in this study. The fibers were cut into 15 cm segments, and the polymeric jacket was carefully removed using a precision fiber stripper. Subsequently, the fibers were ultrasonically cleaned in a centrifuge tube for 5 minutes using a sequential solvent bath of acetone, ethanol, and deionized water.

The fabrication process of the functionalized fiber tip is schematically illustrated in Figure 3.2. The procedure was divided into three sequential steps. In the first step, the fiber tip was modified via dip-coating with ZnO seeds, either alone or in combination with Si μ P, yielding two distinct surface types: one containing only ZnO seeds on the flat fiber tip surface and another with ZnO seeds coated on Si μ P at the fiber end. A uniform monolayer of Si μ P on the fiber end was fabricated via dip-coating. To avoid capillary forces, arising from greater droplet curvature and increased air contact at the fiber end edge, which lead to coffee-ring particle accumulation driven by differences in vaporization rates between the droplet center and edge,^{13,14} a low-surface-energy ethanol was employed as the dispersing solution for the 1 μm silica microparticles (Fig. S3.1). This approach reduced droplet curvature and minimized vaporization rate differences, resulting in a uniform particle layer over the fiber tip. The modified fibers were then thermally annealed at 350 °C for 2 h to promote strong material adhesion.

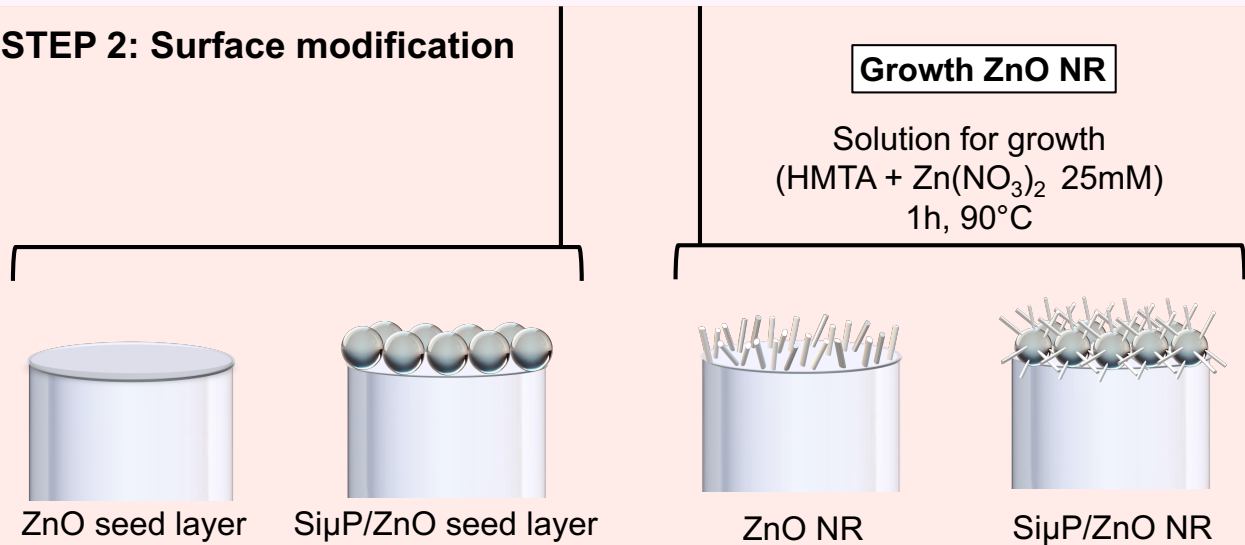
In the second step, each surface underwent one of two experimental routes. In one route, the annealed surface was kept unchanged. In the other, ZnO NR were grown via a hydrothermal method using an equimolar aqueous solution of HMTA and Zn(NO₃)₂ (25 mM) at 90 °C for 1 h. This process resulted in four distinct morphologies, as depicted in Figure 3.2: (i) ZnO seed, (ii) Si μ P/ZnO seed, (iii) ZnO NR, and (iv) Si μ P/ZnO NR, the latter forming a 3HD architecture. All surfaces were subsequently functionalized with PVP-stabilized AuNP (AuNP/PVP) by immersion in the colloidal solution. For clarity, the term ‘ZnO seed’ was omitted from the nomenclature after AuNP functionalization. The

final architectures were designated as: AuNP (2D), Si μ P/AuNP (quasi-3D; 3QD), ZnO NR/AuNP (quasi-3D; 3QD), and Si μ P/ZnO NR/AuNP (3HD). The structures and compositions were analyzed using scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy, respectively.

STEP 1: Tip of the fiber preparation



STEP 2: Surface modification



STEP 3: AuNP-PVP Functionalization

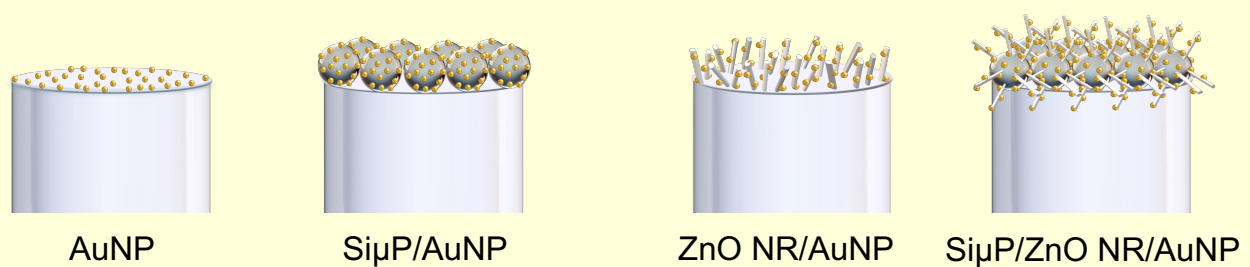


Figure 3.2. Schematic representation of the fabrication process and surface morphologies of functionalized optical fibers. The fabrication consists of three main steps: (1) dip-coating of optical

fiber tips in silica microparticles (Si μ Ps) followed by a ZnO seed layer, with subsequent annealing at 350 °C for 2 h to ensure adhesion and crystallization; (2) hydrothermal growth of vertically aligned ZnO NRs on the seeded surfaces using a 25 mM solution of HMTA and Zn(NO₃)₂ at 90 °C for 1 h, forming planar or hierarchical nanostructures depending on the presence of Si μ Ps; and (3) AuNP functionalization via dip-coating in a colloidal AuNP/PVP solution, yielding 2D (flat), quasi-3D (Si μ P/AuNP, ZnO NR/AuNP), and hierarchical-3D (Si μ P/ZnO NR/AuNP) SERS-active architectures.

3.3.4 SERS Measurement and Self-Cleaning Evaluation: The SERS performance of optical fiber tips functionalized with different surface architectures was evaluated using a Horiba iHR 550 Raman spectrometer equipped with a 633 nm excitation laser. All measurements were performed with a laser power of 0.3 mW and an integration time of 30 seconds.

Rhodamine B (RB), used as a model organic pollutant for SERS detection, was prepared in aqueous solutions at concentrations ranging from 0.1 nM to 10 μ M. The functionalized fiber tips were directly immersed in individual vials containing RB solutions (>95%, Sigma Aldrich), without applying any incubation period for dye adsorption onto the AuNPs, a step typically required in conventional SERS protocols.^{15,16} For the comparison among the different fiber architectures, the experimentally detectable concentration was defined as the lowest RB concentration at which a distinguishable SERS signal could be resolved under the same measurement conditions.

For the 3HD Si μ P/ZnO NR/AuNP architecture, inter-probe reproducibility was evaluated using three independently fabricated fiber probes. Each probe was measured under identical experimental conditions across the same RB concentration range. The SERS intensity of the 1650 cm⁻¹ band was extracted from each spectrum and used to construct the calibration curves. The linear regression used for LOD estimation was performed in the low-concentration linear range, from 1×10^{-10} to 1×10^{-8} M. The LOD was calculated according to $\text{LOD} = 3\sigma/S$, where S is the slope of the calibration curve and σ is the standard deviation of the analytical response obtained from the low-concentration calibration range. The final LOD value was reported as the mean $\pm$ standard deviation obtained from the three independent 3HD fibers.

To investigate the effects of biofouling, fibers functionalized with 2D and 3HD structures were analyzed. Initially, each fiber was immediately immersed in a 10 μ M RB solution, and Raman spectra were acquired immediately. Subsequently, *Escherichia coli* (*E. coli*) was added to the same solution, and a second spectral measurement was performed. For the fiber functionalized with the 3HD architecture, a third Raman spectrum was acquired after 24 hours of continuous immersion in the *E. coli* and RB solution. All spectra were recorded without prior drying or incubation, thereby maintaining real-time sensing conditions and ensuring that the fiber surface accurately represented *in situ* environmental exposure. This methodology was adopted consistently across all biofouling experiments to investigate bacterial adhesion and potential degradation of the nanostructured surface.

The self-cleaning capability of the 3HD fiber was evaluated through detection-regeneration cycles. In each cycle, the fiber was immersed in a 10 μ M RB solution, and the Raman signal was acquired. The fiber was then transferred to a deionized water bath and exposed to UV irradiation (365 nm, 0.3 mW) for 5 minutes. After this treatment, a new spectrum was acquired. Each detection–cleaning sequence was considered one cycle, and the entire process was repeated ten times under identical experimental conditions to evaluate signal reproducibility and the regeneration efficiency.

3.3.5 Numerical simulation of relative SERS enhancement factor: The finite element method (FEM) in the 2D Wave Optics Module of COMSOL Multiphysics was used to model near-field distributions and to quantitatively estimate the SERS enhancement generated by the 3HD architecture at the fiber tip. Figure S3.3 depicts the geometry of the simulation domain, including the fiber end with SERS nanostructures placed at the water–silica interface. A perfectly matched layer was applied at the input port, where the incident light entered, and at the termination of the water domain to minimize reflections. A second order scattering boundary condition was assigned to the outermost boundary, and periodic boundary conditions were imposed on the vertical sidewalls to represent an infinite periodic structure. The other information, including simulation dimensions and optical properties of the

materials, is detailed in Table S3.1. Our simulation analysis focuses on the relative SERS enhancement factor rather than absolute field intensities. For this purpose, the 2D model is sufficient to capture comparative trends between different nanostructured architectures, while also providing substantial computational efficiency over full 3D simulations.

3.4 RESULTS

A fundamental distinction between conventional planar SERS substrates (e.g., glass slides) and fiber-based platforms lies in how light is delivered and signals are collected. Planar substrates provide a large physical area, often tens of square millimeters, and typically employ high-NA objective lenses for enhanced collection. However, the effective sensing region is confined to the localized laser focal spot, meaning only a micrometer-scale fraction of the substrate is interrogated. This narrow sampling area makes the measurement highly susceptible to signal variability arising from surface morphology, nanostructure distribution, or analyte coverage.

In contrast, when a silica optical fiber is used as the SERS substrate, the excitation light is guided through the fiber core and distributed over the entire functionalized fiber-tip area (hundreds of square micrometers). The Raman signal is simultaneously collected from this same active region as an integrated response. As a result, the measurement inherently represents a spatially averaged signal over the full sensing surface, reducing sensitivity to local hotspot inhomogeneity that commonly affects point-based planar SERS measurements (Fig. S3.4). This configuration minimizes the need for precise lateral alignment, spatial mapping, or multi-spot averaging often required in planar systems to compensate for surface heterogeneity.

The fiber geometry further enables direct immersion into complex or confined environments, supporting real-time, *in situ* sensing where planar substrates are impractical, and it is inherently well-suited for remote applications, since both excitation and collection can be transmitted over long distances with minimal loss.

The possibility of sensor regeneration through photocatalytic cleaning, provided here by ZnO nanostructures, adds another critical functionality by allowing the fiber tip to be reused across multiple detection cycles without performance degradation, a sharp contrast to traditional single-use substrates prone to fouling. Collectively, these features establish the optical fiber not merely as a structural support, but as an active and versatile component of the sensing strategy, augmenting optical excitation uniformity, signal collection stability, measurement reliability, environmental accessibility, and operational reusability. In this study, these intrinsic advantages are further amplified by incorporating a 3HD nanostructure at the fiber tip, designed to overcome the fiber's limited NA through increased plasmonic hotspot density and efficiency.

3.4.1 Fabrication of 3HD SERS Nanostructures on Fiber Tips: The sequential modifications of the fiber tip were characterized by SEM, as illustrated in Figure 3.3. All architectures, including the 2D (ZnO seed/AuNP) and 3QD Si μ P/AuNP configurations, were initially coated with a uniform ZnO seed layer to ensure that any differences in SERS signal originated solely from the architectural variations. The morphological evolution was clearly visible at each fabrication step. The ZnO seed layer alone exhibited a smooth and continuous morphology, whereas the introduction of Si μ P resulted in a compact layer of densely packed spherical particles uniformly distributed over the fiber surface. Growth of ZnO NRs, either on the flat ZnO-coated tip or radially around Si μ P cores, produced vertically aligned 3QD structures that increased surface roughness and introduced spatial organization. In the 3HD architecture, NRs extended radially from the Si μ P scaffold, forming a porous network with well-defined inter-rod gaps-features known to enhance light trapping, hotspot density, and analyte diffusion.

The efficiency of SERS is primarily determined by the density of AuNPs and the formation of interparticle hotspots, with particle size optimization playing a critical role.¹⁷ Anchoring pre-synthesized AuNPs of uniform diameter onto ZnO NRs provides an effective strategy for achieving consistently strong SERS enhancement. Although a few studies have employed ZnO NR as a substrate for AuNP attachment, most reported extremely limited AuNP loading,^{18–22} which restricted the

formation of interparticle hotspots and thereby suppressed SERS enhancement, resulting in low overall sensitivity. In this study, we overcome this limitation by applying a ligand-exchange strategy that promotes strong AuNP adhesion to ZnO NR.

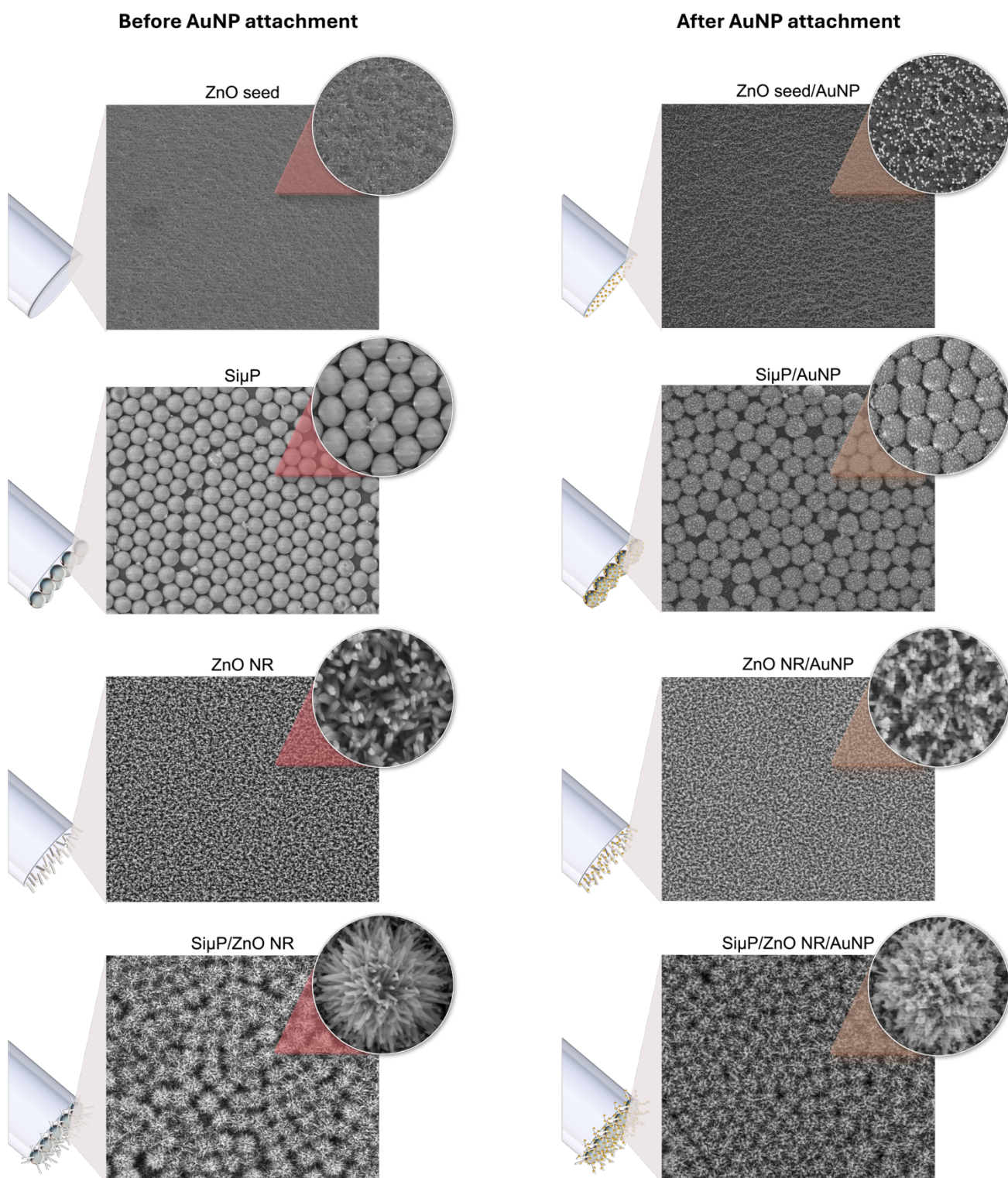


Figure 3.3. SEM images of fiber tips functionalized with ZnO seed (a, b), Si μ P (c, d), ZnO NR (e, f), and Si μ P/ZnO NR (g, h) architectures. Left images (a, c, e, g) show the surfaces prior to AuNP deposition; right images (b, d, f, h) show the corresponding surfaces after AuNP functionalization. Insets show magnified views of the surface morphology; scale bars are 1 μ m in the main images and 500 nm in the insets.

The mechanism underlying this improvement lies in the differences in surface chemistry between ligands. Citrate-AuNPs are surrounded by a dense hydration shell, which can hinder their close interaction with the ZnO surface.²³ Replacing citrate with an amphiphile, neutral ligand, PVP, improves surface compatibility by enabling wetting of both the hydrophilic ZnO and hydrophobic Au surfaces, thereby promoting better conformal contact. Furthermore, the lactam ring of the PVP contains a carbonyl group that can coordinate with surface-exposed metal cations (Zn²⁺) on ZnO, forming coordinate bonds that strengthen attachment. This coordination is effective only when the PVP layer is thin (<1 nm), as achieved through the controlled preparation method described in our previous work.⁷ Without this precisely controlled thin layer, the AuNPs remain sterically and electronically shielded, preventing effective binding. This optimized surface chemistry translates directly into superior performance metrics. SEM images reveal dramatically increased AuNP density on PVP-modified surfaces (Fig. S3.6) compared to citrate-stabilized counterparts. The performance improvements are striking. 2D fibers functionalized with citrate-stabilized AuNPs exhibited no detectable response during RB sensing, whereas PVP modification lowered the lowest experimentally detectable concentration by approximately two orders of magnitude (Fig. S3.7). In the 3HD architecture, PVP modification produced even stronger gains, lowering the lowest experimentally detectable concentration by roughly three orders of magnitude (Fig. S3.8). Most notably, the optimized 3HD-AuNP-PVP fiber achieved an overall sensitivity enhancement of five orders of magnitude relative to the 2D-AuNP-citrate system. To the best of our knowledge, the dense and continuous AuNP decoration observed by SEM far exceeds that reported in prior ZnO NR-based SERS substrates, although direct

quantitative comparison is constrained by the lack of standardized nanoparticle loading metrics across studies^{18–22}. Having established the critical role of surface chemistry in maximizing AuNP attachment, we next examine how the underlying architectural design further amplifies these sensitivity gains.

3.4.2 SERS Sensitivity Enhancement through Engineered 3HD Architectures: The optical setup is shown in Figure 3.4a. Figure 3.4c compares the SERS spectra of RB obtained with four architectures, illustrated in Figure 3.4b: (i) planar AuNP (2D), (ii) Si μ P/AuNP (3QD), (iii) ZnO NR/AuNP (3QD), and (iv) Si μ P/ZnO NR/AuNP (3HD). The SERS spectra exhibit distinct vibrational modes of RB, including the N-H bending mode at 1330 cm⁻¹, the aromatic C-H stretching at 1555 cm⁻¹, and the C=C stretching vibration at 1650 cm⁻¹. The 1650 cm⁻¹ peak was selected for quantitative analysis due to its pronounced intensity and spectral resolution.

Conventional SERS protocols often rely on drop-casting or extended incubation of the substrate in the analyte solution, followed by a drying step to pre-concentrate analytes at localized hotspots.^{15,16} While this pre-concentration is effective under laboratory conditions and can increase the concentration on the substrate up to three orders of magnitude²⁴, thereby enhancing its sensitivity, it also introduces substantial time delays that undermine suitability for rapid, *in situ* monitoring. Moreover, drying inconsistency across substrates leads to significant spot-to-spot variation,^{25,26} severely compromising quantitative accuracy. In contrast, the present platform employs a direct-in-solution measurement strategy that enables immediate, diffusion-mediated interaction between analytes and the sensing interface without a pre-treatment or incubation. Although this approach results in lower equilibrium surface coverage, it provides a more stringent test of the platform's capability for real-time sensing under continuous liquid-phase operation.

Under these conditions, analyte delivery to plasmonic hotspots is governed primarily by diffusion and transient molecular residence rather than by pre-established adsorption. While conventional SERS measurements mitigate stochastic signal fluctuations through increased surface

coverage, the present platform instead leverages full-area optical excitation and collection across the entire fiber tip. This configuration spatially averages the signal over a large population of hotspots, reducing sensitivity to transient molecular occupancy and enabling stable signal acquisition even under dynamic conditions.

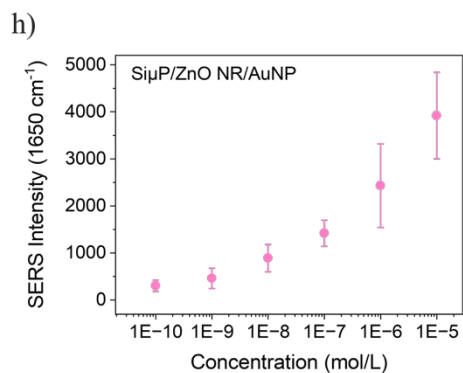
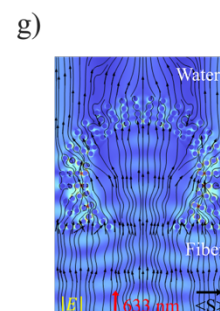
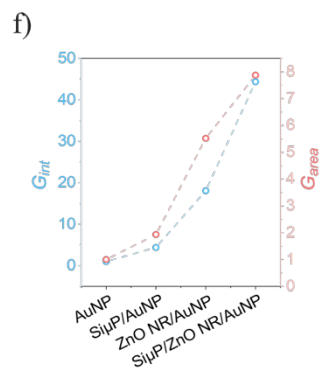
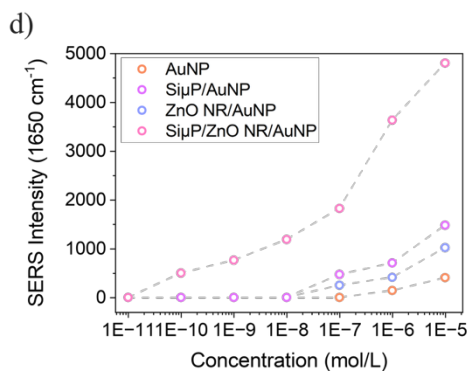
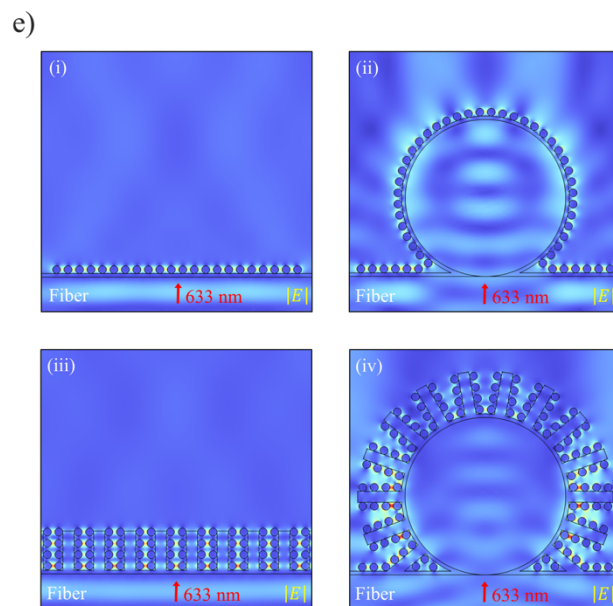
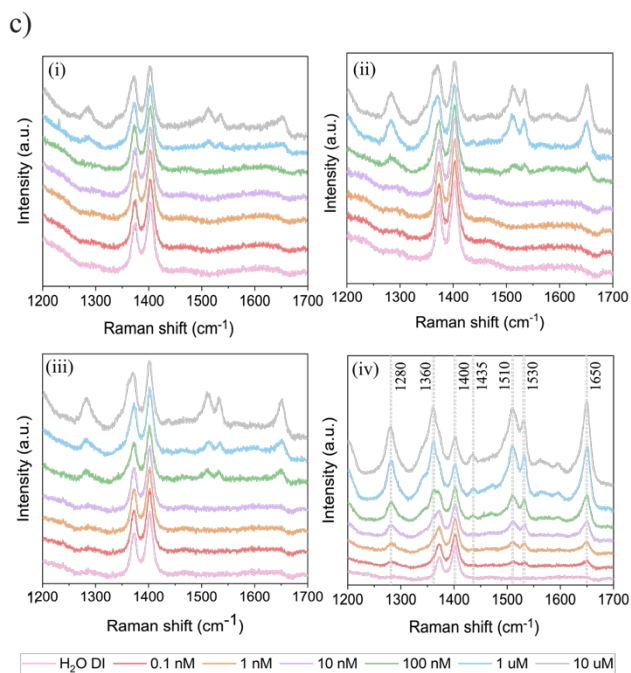
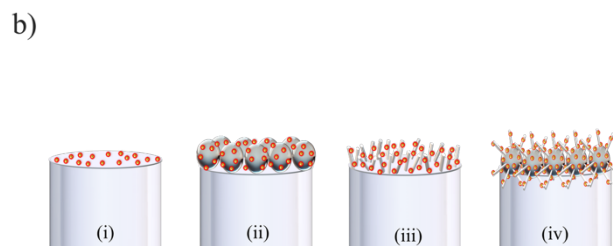
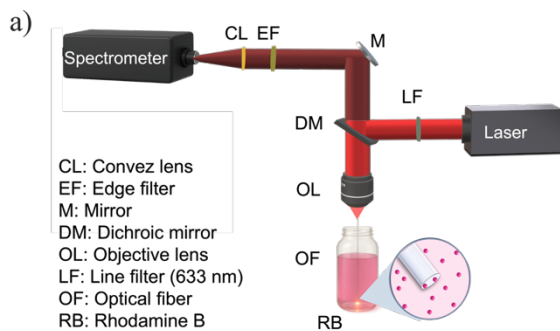


Figure 3.4. Fiber-optic-based SERS detection of RB using fibers functionalized with distinct surface architectures. (a) Schematic representation of the optical setup employed for SERS measurements, illustrating the excitation and collection through the optical fiber and the immersion of the functionalized tip in the RB solution. (b) Schematic illustrations of the four surface architectures evaluated: (i) AuNP, (ii) Si μ P/AuNP, (iii) ZnO NR/AuNP, and (iv). In each configuration, the red halo surrounding the AuNPs represents the localized interaction region with the RB molecules. (c) SERS spectra of RB obtained from all four architectures (i–iv) across a concentration range of 0.1 nM to 10 μ M. Experimental conditions: acquisition time = 30 s; laser power = 0.3 mW; excitation wavelength = 633 nm. (d) Concentration-response plot derived from the intensity of the 1650 cm^{-1} Raman band of RB. (e) Calibration curve of the 3HD fiber (Si μ P/ZnO NR/AuNP), obtained by plotting the average SERS intensity at 1650 cm^{-1} as a function of RB concentration, using the same concentration range applied to all sensors. This curve was used to determine the limit of detection (LOD), and to assess the inter-probe reproducibility, based on measurements performed in triplicate using three different 3HD fibers. (f) Simulated field distribution near AuNP of four surface architectures on optical fibers: (i) AuNP, (ii) Si μ P/AuNP, (iii) ZnO NR/AuNP, and (iv) Si μ P/ZnO NR/AuNP. (g) Intrinsic enhancement factor (G_{int}) and per-area normalized metric (G_{area}) for the combined effect of increased loading and hotspot enhancement and intrinsic hotspot quality per unit surface area, respectively. (h) Uniform delivery of incident light into the radially distributed plasmonic nanostructure facilitated by the 3D engineered architecture. Streamlines illustrate the time-averaged Poynting vector $\langle S \rangle$, overlaid on the electric-field distribution ($|E|$).

A comparative analysis of the sensing architectures revealed a clear performance hierarchy, progressing from the 3QD to the 3HD design. At high analyte concentrations, where molecular adsorption nearly saturates the plasmonic surface, the 3HD probe still produced notably stronger Raman signals, showing 8.0-fold and 14.8-fold enhancements over the 2D substrate at 1 μ M and 10 μ M, respectively (Fig. 3.4c,d). This indicates higher hotspot efficiency even under saturation conditions, where differences in enhancement are typically compressed.

At low analyte concentrations, however, the performance gap increased sharply. The 2D and 3QD structures exhibited measurable response at 1 μ M and 100 nM, respectively, whereas the 3HD probe maintained a distinct and reproducible signal down to 100 pM (Fig. 3.4c,d). This up to four-order-of-magnitude improvement in low-concentration detectability can be attributed to lower baseline noise and improved analyte accessibility, which together enhance the signal-to-noise ratio (SNR) and the calibration slope. A higher density and accessibility of plasmonic hotspots further increase the probability of molecular localization in high-field regions, thereby amplifying the overall signal

response. Such dependencies of sensitivity on SNR and hotspot utilization have been consistently reported in earlier SERS studies.^{27,28}

To assess the reproducibility of the 3HD architecture in terms of sensing sensitivity, the analytical performance of three independently fabricated 3HD probes was evaluated under identical measurement conditions (Fig. S3.8 and 3.4e). All three probes successfully demonstrated detectable responses at 100pM. Based on the standard 3σ /slope criterion, which provides a more conservative estimate of reliable detectability, the calculated LOD was $(3.529 \pm 2.195) \times 10^{-9}$ (Table S3.2), confirming comparable low-nanomolar sensitivity across independently prepared samples.

The structural origin of these improvements can be traced to how the 3HD architecture governs hotspot formation and excitation. Unlike conventional optical fiber functionalization, which relies on planar deposition of metallic NPs and confines hotspots to a flat surface, the hierarchical 3D organization in the 3HD probe integrates Si μ P scaffolds and ZnO NRs to expand the accessible volume for field localization. Although tuning NP size and interparticle spacing can moderately improve 2D sensitivity,²⁹ such planar configurations inherently limit hotspot density and spatial overlap³⁰. In contrast, a 3HD framework not only increases the density of potential hotspots but, when uniformly illuminated, ensures efficient excitation of surface plasmons throughout the volume, a condition deliberately realized in the 3HD design.

To quantitatively validate this structural advantage and separate intrinsic optical effects from geometrical factors, we performed FEM simulations (Figs. 3.4e,g). In these simulations, a SERS proxy was calculated and normalized to the optical power delivered to the simulation domain, allowing direct comparison across architectures. Specifically, the SERS proxy was defined as the surface integral, $I_4 = \int_{S_{AuNP}} |E|^4 dS$, evaluated over all AuNP surfaces in accordance with the well-established $|E|^4$ rule.³¹ The intrinsic enhancement factor (G_{int}) was then defined as:

$$G_{int} = \frac{I_4^{(3D)} / P_{delv}^{(3D)}}{I_4^{(2D)} / P_{delv}^{(2D)}} \quad (3.1)$$

Under identical excitation conditions, Si μ P and ZnO NR architectures increased the SERS proxy by 4.4-fold and 18.1-fold, respectively. Remarkably, when combined, the hierarchical Si μ P/ZnO NR/AuNP structure achieved more than 44-fold increase, underscoring the synergistic effect of 3HD organization (Fig. 3.4f). To separate the influence of increased AuNP loading from the intrinsic efficiency of individual hotspots, we introduced a per-area normalized metric, a dual-metric computational formulation for comparative analysis of volumetric SERS architectures

$$G_{area} = \frac{(I_4^{(3D)} / S_{AuNP}^{(3D)}) / P_{delv}^{(3D)}}{(I_4^{(2D)} / S_{AuNP}^{(2D)}) / P_{delv}^{(2D)}} \quad (3.2)$$

where $S_{AuNP}^{(3D)}$ denotes the total AuNP surface area. While G_{int} captures the combined contributions of increased loading and improved hotspot, G_{area} isolates intrinsic hotspot quality per unit surface area. The dual-metric framework provides a practical basis for distinguishing gains arising from increased AuNP loading from those associated with improved intrinsic hotspot efficiency.

As shown in Figure 3.4f, the per-area analysis yields enhancement factors of 1.9 $\times$ for Si μ P/AuNP and 5.5 $\times$ for ZnO NR/AuNP relative to the 2D baseline, while the hierarchical Si μ P/ZnO NR/AuNP architecture reaches 7.9 $\times$. These results support our claim that the 3HD architecture not only enables greater AuNP loading, as reflected in G_{int} , but also inherently improves hotspot quality (G_{area}).

The structural origin of this improved hotspot quality is illustrated in Figure 3.4g, which depicts the Poynting vector flow of incident light propagating from the fiber and uniformly delivered to the AuNPs. The Si μ P/ZnO micro-scaffold facilitates uniform delivery of incident light to the radially distributed AuNPs, while the radially grown ZnO NRs both scatter light and confine electromagnetic fields within the structure. Together, these effects strengthen plasmonic coupling across the AuNP

network and ensure efficient excitation throughout the 3HD architecture. This synergistic mechanism underlies the observed 7.9-fold hotspot quality, highlighting the rational novelty of our design and its significant impact on advancing SERS sensitivity beyond simple NP loading.

Interestingly, the simulations predicted ZnO NR/AuNP structures to be more efficient than Si μ P/AuNP, whereas the opposite trend was observed experimentally. In the simulations, vertically aligned ZnO NRs were assumed for simplicity, resulting in uniform AuNP arrangements with consistent gap distances that favor strong plasmonic coupling. In practice, however, ZnO NRs tend to grow at tilted angles, leading to less uniform particle spacing and weaker hotspot formation, particularly for AuNPs located near the upper regions of the NRs, as modeled in the Si μ P/ZnO NR/AuNP structures. This structural non-uniformity is considered a key factor contributing to the discrepancy between simulated and experimental results.

3.4.3 Structural Exclusion of Biofoulings via Engineered 3HD Architectures: Current SERS sensors are highly susceptible to biofouling, and effective strategies to suppress nonspecific adsorption or accumulation of biological contaminants on plasmonic surfaces remain limited. In complex liquid environments, such fouling degrades signal stability, obscures target vibrational features and ultimately hinders reliable real-time and *in situ* detection of small organic molecules. These challenges motivate the development of surface and nano-architectural designs that resist biofouling while preserving analyte accessibility and SERS signal integrity.

To evaluate the impact of microbial contamination on SERS performance, *Escherichia coli* (*E. coli*) was selected as a representative microorganism due to its prevalence in natural and engineered aqueous systems and its relevance as a clinically significant biological species.^{32–34} Figure 3.5 compares the performance of 2D and 3HD SERS architectures under biologically complex liquid conditions, representative of heterogeneous environments where small organic molecules coexist with larger biological interferents. The experimental protocol first introduced a small-molecule analyte, RB,

to assess its access to plasmonic sensing regions, followed by the addition of *E. coli* to examine how bacterial-scale contaminants influence signal stability and analyte detection without filtration or separation.

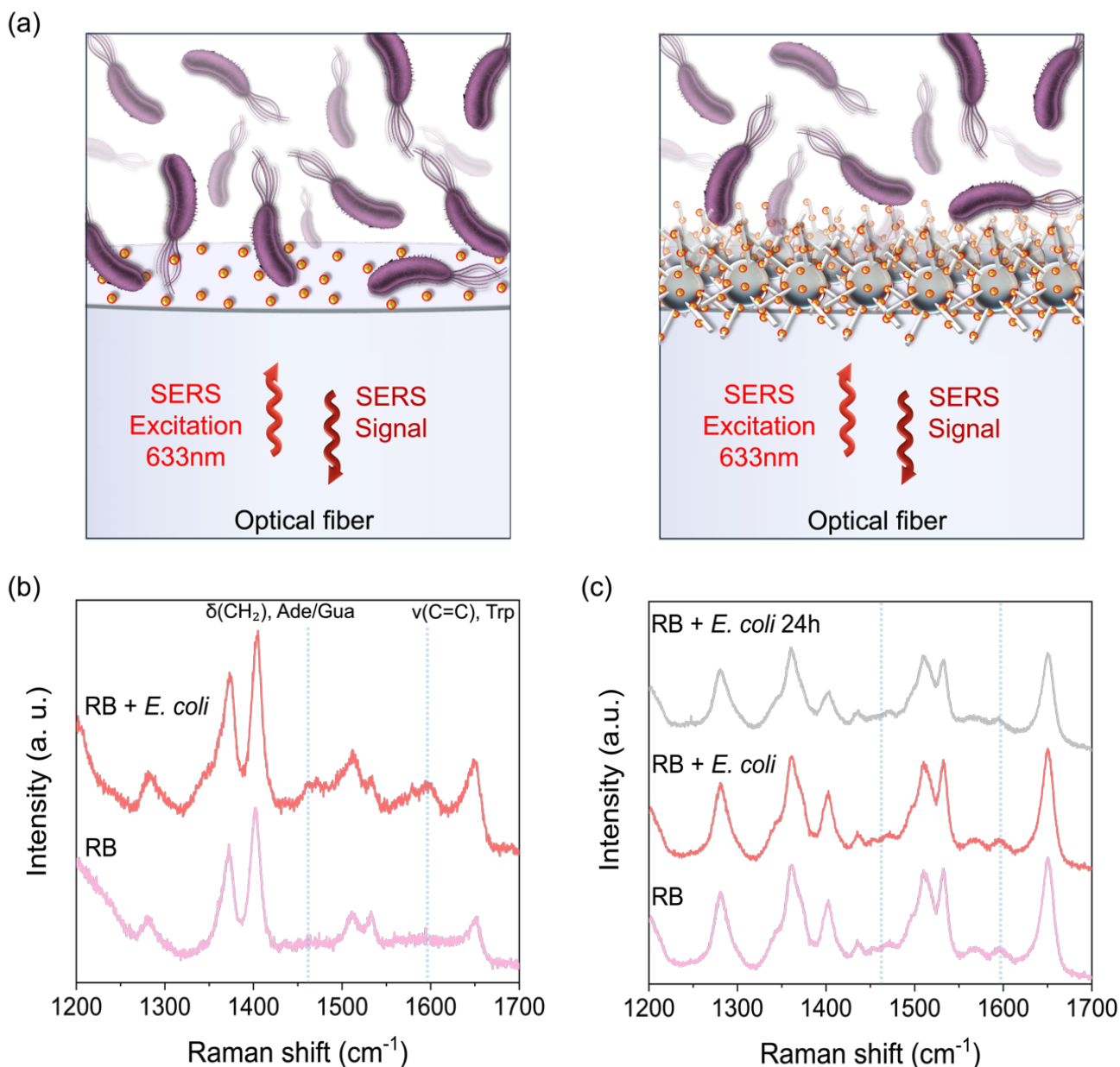


Figure 3.5. Structural comparison of 2D and 3D functionalized fibers for size-selective SERS detection in the presence of biological contaminants. (a) Schematic illustration of functionalized optical fiber tips used to evaluate interactions with biological contaminants, using *E. coli* as a model organism. (b–c) Raman spectra acquired from 2D- and 3D-functionalized fibers after sequential exposure to RB (10 μ M) and *E. coli*, with immediate acquisition and no incubation. In the case of the 3D fiber, an additional measurement was performed after 24 h of incubation. For each configuration, the spectra were compared before and after the addition of *E. coli*. Experimental conditions: acquisition time = 30 s; laser power = 0.3 mW at 633 nm.

The SERS spectra presented in Figures 3.5a and 3.5b reveal the influence of the substrate's structural configuration on analyte signal stability in the presence of biological contaminants. For the 2D configuration (Fig. 3.5b), the introduction of *E. coli* led to the emergence of additional Raman bands at 1458 cm^{-1} and 1600 cm^{-1} , attributed to CH_2 bending vibrations of purine bases (adenine and guanine) and $\text{C}=\text{C}$ stretching from tryptophan, respectively.⁴⁵ These bacterial features partially overlap with the RB vibrational modes, particularly at 1458 cm^{-1} , resulting in spectral interference and a noticeable decrease in the RB signal intensity. Such overlap is especially detrimental for multiplex detection of organic molecules, where biological interference can significantly compromise quantitative accuracy.¹¹ In contrast, the 3HD-functionalized fiber preserved the characteristic RB spectral features even after *E. coli* exposure, exhibiting minimal intensity change and no discernible bacterial spectral contribution. Notably, this behavior remained stable after 24 h of incubation, indicating that the 3HD architecture provides a robust sensing environment under bio-contaminated conditions. This result is further supported by the SEM analysis shown in Figure S3.9, which shows that the 3HD surface maintained its dense hierarchical/dendritic morphology after immediate immersion in the *E. coli* suspension under conditions representative of the sensing environment. After rinsing, no obvious bacterial accumulation was observed on the analyzed region, suggesting that the nanostructured architecture helps reduce bacterial retention at the sensing interface and contributes to the preservation of the RB SERS signal under bio-contaminated conditions. This behavior can be understood as an effective size- and geometry-dependent filtering effect, arising from the structural organization of the 3HD architecture rather than from a single isolated mechanism.

The structural origin of this behavior is illustrated schematically in Figure 3.5c. In the 2D architecture (left), the planar distribution of AuNPs presents an open surface that readily permits nonspecific interactions with larger biological species such as bacteria. In contrast, the 3HD architecture (right), composed of AuNP-decorated ZnO NRs radially grown from a Si μ P scaffold, forms a porous, forest-like network with defined inter-rod spacing, increased surface curvature, and

nanoscale roughness. With excitation delivered from the underlying fiber, this vertical geometry limits access of microorganism-scale species (hundreds of nanometers to micrometers) to plasmonic junctions near the fiber surface, while still allowing efficient diffusion of small organic molecules such as rhodamine B into the active sensing regions.

In addition to this geometric constraint, the volumetric distribution of plasmonic hotspots contributes to signal robustness by distributing signal generation throughout the structure rather than confining it to a single exposed interface. As a result, even if partial occupation occurs at the outer boundary, a substantial fraction of active hotspots remains accessible to small analytes.

The reduced bacterial interference observed in the 3HD architecture is therefore attributed to the combined effects of geometry-mediated access limitation and volumetric signal robustness, rather than exclusively to size-selective exclusion.

Although the detailed self-cleaning mechanism is discussed in the following section, it is important to note that removal of large microbial contaminants from SERS substrates is intrinsically difficult and often necessitates aggressive regeneration conditions that can compromise structural integrity or sensing performance in conventional systems. By reducing initial adhesion of large contaminants through size-selective exclusion, the present architecture substantially lowers the regeneration burden. This preemptive fouling mitigation enhances the effectiveness and durability of subsequent photocatalytic regeneration.

3.4.4 UV-Driven Photocatalytic Regeneration of 3HD SERS Probes for Long-Term Reusability:

While the engineered 3HD architecture effectively suppresses fouling by large biological species, the accumulation of smaller target analytes and other low-molecular-weight species on plasmonic surfaces can still occur during repeated measurements. Such adsorption can progressively compromise sensing performance by reducing signal stability over time.

To address this residual fouling pathway, the 3HD fiber-tip probe incorporates ZnO nanorods grown radially around silica microparticles, forming a three-dimensional photoactive network integrated with plasmonic sensing structures. This architecture enables guided UV illumination to be delivered directly through the optical fiber to the active region, where photocatalytic cleaning and Raman sensing occur at the same interface. The geometry is particularly well suited for fiber-based operation, as light delivery, analyte access, and signal collection are combined within a compact probe format that can be directly immersed in liquid environments.

Under UV illumination, ZnO is well known to generate electron–hole pairs that react with water and dissolved oxygen to produce reactive oxygen species (ROS), including hydroxyl radicals and superoxide species, which oxidatively decompose adsorbed organic molecules. This ROS-mediated self-cleaning behavior has been extensively established in prior photocatalytic literature.^{35–37}

Building on the well-established ROS-mediated photocatalytic activity of ZnO under UV illumination, the present work focuses on integrating this regeneration functionality into a reusable microscale fiber-optic SERS probe operating under practical liquid-phase conditions, thereby demonstrating the practical feasibility of UV-driven regeneration for fiber-tip SERS probes in chemically and biologically complex environments.

To experimentally validate the regeneration capabilities, fiber tips were subjected to ten sequential cycles of RB (10 μ M) detection followed by UV treatment (365 nm, 0.3 mW, 5 minutes), as outlined in Figure 3.6a. The SERS spectra obtained before and after each cleaning step (Fig. 3.6b) consistently showed the complete disappearance of RB signals, indicating effective removal of adsorbed analytes. Quantitative tracking of the 1650 cm^{-1} vibrational mode (Fig. 3.6c) demonstrated stable signal recovery over all cycles, confirming the robustness, reproducibility, and efficiency of the photocatalytic regeneration process.

To further confirm the structural and chemical stability of the probe, SEM and EDX analyses were conducted before and after the ten regeneration cycles. SEM images (Fig. 3.6d) showed no

evidence of NR collapse or delamination, indicating preservation of the 3HD architecture. Similarly, EDX spectra (Fig. S3.10) confirmed stable elemental composition, with no detectable loss of Zn, Si, or Au, indicating the absence of significant leaching or material degradation.

The ability to withstand multiple regeneration cycles without loss of sensitivity establishes the 3HD fiber probe as a durable, self-cleaning SERS interface for operation in complex liquid environments. Importantly, repeated restoration of sensing performance enables quantitative measurements to be carried out on a single, continuously regenerated interface, eliminating signal drift associated with surface fouling over time. In contrast to conventional planar SERS substrates, which often require spatial or substrate-level averaging to compensate for sensitivity fluctuations, the present platform supports consistent signal interpretation across repeated use cycles without additional recalibration.

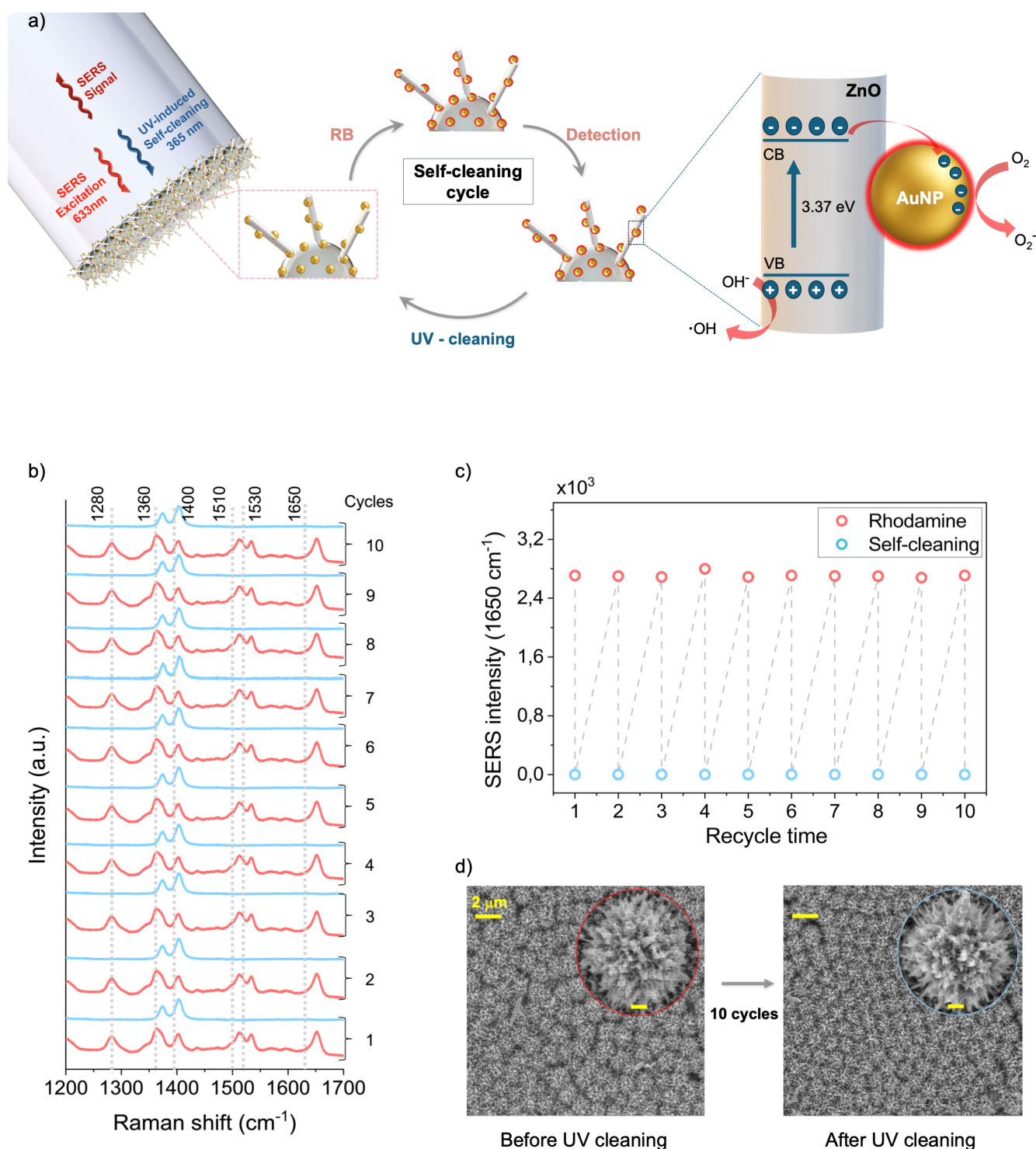


Figure 3.6. Assessment of self-cleaning and reusability of 3D-structured fiber-optic SERS sensors. (a) Schematic illustration of the detection/regeneration cycle, comprising SERS measurement followed by UV irradiation (365 nm) for surface cleaning. (b) SERS spectra collected during RB detection (pink curves) and after each UV-cleaning step (blue curves) over ten consecutive cycles. (c) Evolution of the RB peak intensity at 1650 cm^{-1} after each detection and regeneration cycle. (d) SEM images of the same fiber tip before and after ten UV-cleaning cycles, with 500 nm scale bars. Experimental conditions: acquisition time = 30 s, laser power (633 nm) = 0.3 mW; UV exposure (365 nm) = 0.3 mW, for 5 min.

3.5 CONCLUSION

In summary, we introduce a highly sensitive and resettable fiber-optic SERS platform, three-dimensionally engineered to integrate uniform-area illumination, size-selective antifouling, on-probe calibration, and *in situ* photocatalytic regeneration within a single architecture. The hierarchical 3HD design enhances SERS performance through volumetric plasmonic coupling, increasing hotspot efficiency as supported by finite element simulations. This architecture enables experimentally detectable responses down to 100 pM and calculated LOD values in the low-nanomolar range. Stable sensing performance is maintained across multiple regeneration cycles, as demonstrated in biologically complex aqueous systems used as a representative model. By mitigating spatial signal heterogeneity and decoupling quantitative measurement from substrate-to-substrate variation, the platform advances reusable and reliable SERS-based sensing in heterogeneous liquid environments. More broadly, the design principles established here provide a modular architectural framework for engineering regenerative, fiber-integrated SERS interfaces across diverse liquid-phase sensing contexts. These capabilities provide a foundation for extension to application-specific systems, where further validation will refine and expand their applicability.

3.6 ACKNOWLEDGEMENT

We acknowledge the support of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), [Discovery Grant with funding reference number RGPIN-2020-04800]. This work was also financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (proc. 2020/14009-3 and 2023/05092-2).

3.7 DATA AVAILABILITY

All data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary information. Additional raw data are available from the corresponding author upon reasonable request.

3.8 CONTRIBUTION

Beatriz Bianca Schulz Ramin: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation.

Sanggon Kim: Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Software, Project administration, Methodology, Investigation, Conceptualization.

Yves De Koninck: Writing – review & editing, Supervision, Resources, Funding acquisition.

Sidney Jose Lima Ribeiro: Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition.

Younes Messaddeq: Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

3.9 CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

REFERENCES

- [1] M. Patel, R. Kumar, K. Kishor, T. Mlsna, C.U. Pittman, D. Mohan, Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods, *Chem. Rev.* 119 (2019) 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>.
- [2] Z. Yang, Z. Zhang, Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.002>.
- [3] L. Zhang, J. Li, W. Yi, G. Wei, M. Yin, G. Xi, Synthesis of Graphdiyne Hollow Spheres and Multiwalled Nanotubes and Applications in Water Purification and Raman Sensing, *Nano Lett.* 23 (2023) 3023–3029. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c00416>.
- [4] S. Sharma, S. Kolašinac, X. Jiang, J. Gao, D. Kumari, S. Biswas, U.K. Sur, Z. Dajić-Stevanović, Q. Rao, P. Raha, S. Mukherjee, Raman Spectroscopy-Based Chemometrics for Pesticide Residue Detection: Current Approaches and Future Challenges, *ACS Agricultural Science and Technology* 4 (2024) 389–404. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.4c00005>.
- [5] J. Li, H. Liu, S. Chen, X. Liang, Y. Gao, X. Zhao, Z. Li, C. Zhang, F. Lei, J. Yu, Particle-in-Molybdenum Disulfide-Coated Cavity Structure with a Raman Internal Standard for Sensitive Raman Detection of Water Contaminants from Ions to <300 nm Nanoplastics, *Journal of Physical Chemistry Letters* 13 (2022) 5815–5823. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.2c01534>.

- [6] Z. Li, M.J. Deen, S. Kumar, P.R. Selvaganapathy, Raman spectroscopy for in-line water quality monitoring — Instrumentation and potential, *Sensors* 14 (2014) 17275–17303. <https://doi.org/10.3390/s140917275>.
- [7] O.P. Gomes, S. Kim, P.N. Lisboa-Filho, A. Batagin-Neto, Y. De Koninck, Y. Messaddeq, Enhancing gold nanoparticle immobilization on thiolated silica: utilizing neutral ligands to achieve maximum surface coverage for improved SERS substrates, *J. Mater. Chem. C Mater.* 12 (2024) 6816–6825. <https://doi.org/10.1039/d3tc04577c>.
- [8] X.M. Lin, Y. Cui, Y.H. Xu, B. Ren, Z.Q. Tian, Surface-enhanced raman spectroscopy: Substrate-related issues, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1729–1745. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2761-5>.
- [9] J.A. Kim, D.J. Wales, A.J. Thompson, G.-Z. Yang, J.A. Kim, D.J. Wales, A.J. Thompson, G.-Z. Yang, Fiber-Optic SERS Probes Fabricated Using Two-Photon Polymerization For Rapid Detection of Bacteria, *Adv. Opt. Mater.* 8 (2020) 1901934. <https://doi.org/10.1002/ADOM.201901934>.
- [10] X. Guo, X. Cai, F. Lei, Y. Jiao, X. Zhao, Z. Li, C. Zhang, B. Man, J. Yu, Both-In-One Rapid Detection and Removal of Methylmercury in Real Complex Aquatic Environments Using a Janus Confined SERS Filter Membrane, *Adv. Funct. Mater.* 35 (2025). <https://doi.org/10.1002/adfm.202416769>.
- [11] X. Lin, F. Lei, X. Liang, Y. Jiao, X. Zhao, Z. Li, C. Zhang, J. Yu, Quantitative detection of trace nanoplastics (down to 50 nm) via surface-enhanced Raman scattering based on the multiplex-feature coffee ring, *Opto-Electronic Advances* 8 (2025). <https://doi.org/10.29026/oea.2025.240260>.
- [12] H. Chen, M. Wen, Z. Huang, Q. Wu, J. Liu, T. Tu, Construction of Cu@ZnO Nanobrushes Based on Cu Nanowires and Their High-performance Selectivity-degradation for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *J. Mater. Chem. A Mater.* (2013) 1–3. www.rsc.org/materialsA (accessed April 24, 2025).
- [13] Robert D. Deegan, Olgica Bakajin, Todd F. Dupont, Greb Huber, Sidney R. Nagel, Thomas A. Witten, Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops, *Nature* 389 (1997) 827–829.
- [14] S. Kim, Plasmonic Nanowire Waveguide for Chemical Sensing and Imaging at Nanoscale, University of California Riverside, 2018.
- [15] J. Tong, Z. Xu, Y. Bian, Y. Niu, Y. Zhang, Z. Wang, Flexible and smart fibers decorated with Ag nanoflowers for highly active surface-enhanced Raman scattering detection, *Journal of Raman Spectroscopy* 50 (2019) 1468–1476. <https://doi.org/10.1002/jrs.5644>.
- [16] V. Dzhagan, N. Mazur, O. Kapush, M. Skoryk, Y. Pirko, A. Yemets, V. Dzhahan, P. Shepeliavyi, M. Valakh, V. Yukhymchuk, Self-Organized SERS Substrates with Efficient Analyte Enrichment in the Hot Spots, *ACS Omega* 9 (2024) 4819–4830. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08393>.
- [17] S. Kim, O.P. Gomes, Y. De Koninck, Y. Messaddeq, A Comprehensive Numerical Study on Fiber Optic SERS Probe Design, *Journal of Physical Chemistry C* 128 (2024) 6357–6369. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c07618>.
- [18] H.H. Mai, E. Janssens, Au nanoparticle-decorated ZnO nanorods as fluorescent non-enzymatic glucose probe, *Microchimica Acta* 187 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1007/S00604-020-04563-6/FIGURES/8>.
- [19] E.J. Guidelli, O. Baffa, D.R. Clarke, Enhanced UV Emission from Silver/ZnO and Gold/ZnO Core-Shell Nanoparticles: Photoluminescence, Radioluminescence, and Optically Stimulated Luminescence, *Sci. Rep.* 5 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep14004>.
- [20] Y. Zhao, X. Fang, Y. Gu, X. Yan, Z. Kang, X. Zheng, P. Lin, L. Zhao, Y. Zhang, Gold nanoparticles coated zinc oxide nanorods as the matrix for enhanced l-lactate sensing, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 126 (2015) 476–480. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.053>.
- [21] V. Perumal, U. Hashim, S.C.B. Gopinath, R. Haarindraprasad, P. Poopalan, W.W. Liu, M. Ravichandran, S.R. Balakrishnan, A.R. Ruslinda, A new nano-worm structure from gold-nanoparticle mediated random curving of zinc oxide nanorods, *Biosens. Bioelectron.* 78 (2016) 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.083>.
- [22] M. Ahmad, W. Rehman, M.M. Khan, M.T. Qureshi, A. Gul, S. Haq, R. Ullah, A. Rab, F. Menaa, Phytogenic fabrication of ZnO and gold decorated ZnO nanoparticles for photocatalytic degradation of Rhodamine B, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104725>.
- [23] T. Mukherjee, E.K. Smith, M. Sulpizi, M. Rabe, Hydration shell water surrounding citrate-stabilised gold nanoparticles, *Nanoscale* (2025). <https://doi.org/10.1039/d5nr01153a>.
- [24] W.L. Chen, C.Y. Lo, Y.C. Huang, Y.C. Wang, W.H. Chen, K.J. Lin, Y.M. Chang, Toward quantitative SERS detection in low analyte concentration by investigating the immersion volume and time of SERS substrate in analyte solution, *Journal of Raman Spectroscopy* 53 (2022) 33–39. <https://doi.org/10.1002/jrs.6250>.

- [25] D. Zhang, H. Pu, L. Huang, D.W. Sun, Advances in flexible surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrates for nondestructive food detection: Fundamentals and recent applications, *Trends Food Sci. Technol.* 109 (2021) 690–701. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.058>.
- [26] E. Kočíšová, A. Kuižová, M. Procházka, Analytical applications of droplet deposition Raman spectroscopy, *Analyst* 149 (2024) 3276–3287. <https://doi.org/10.1039/d4an00336e>.
- [27] E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, M. Meyer, Enhancement factor distribution around a single surface-enhanced Raman scattering hot spot and its relation to single molecule detection, *Journal of Chemical Physics* 125 (2006). <https://doi.org/10.1063/1.2390694>.
- [28] H.Y. Chen, M.H. Lin, C.Y. Wang, Y.M. Chang, S. Gwo, Large-Scale Hot Spot Engineering for Quantitative SERS at the Single-Molecule Scale, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 13698–13705. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09111>.
- [29] J.D. Jang, H.J. Seo, Y.J. Yoon, S.H. Choi, Y.S. Han, T.H. Kim, Conformational control of two-dimensional gold nanoparticle arrays in a confined geometry within a vesicular wall, *Sci. Rep.* 12 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08607-0>.
- [30] C.G. Kim, S. Lee, M. Kim, V.A. Cao, S.Y. Kim, J. Nah, Synergistic Enhancement of Filtering Efficiency and Antibacterial Performance of a Nanofiber Air Filter Decorated with Electropolarized Lithium-Doped ZnO Nanorods, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 15 (2023) 20977–20986. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsami.3c00744> (accessed February 25, 2025).
- [31] E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, Rigorous justification of the $|E|^4$ enhancement factor in Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* 423 (2006) 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2006.03.042>.
- [32] J. Bryce, C. Boschi-Pinto, K. Shibuya, R.E. Black, WHO estimates of the causes of death in children, *Lancet* 365 (2005).
- [33] L. Liu, S. Oza, D. Hogan, J. Perin, I. Rudan, J.E. Lawn, S. Cousens, C. Mathers, R.E. Black, Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: An updated systematic analysis, *Lancet* 385 (2015) 430–440. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61698-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61698-6).
- [34] D.D. Kim, J.M. Swarthout, C.J. Worby, B. Chieng, J. Mboya, A.M. Earl, S.M. Njenga, A.J. Pickering, Contaminated drinking water facilitates *Escherichia coli* strain-sharing within households in urban informal settlements, *Nat. Microbiol.* 10 (2025) 1198–1209. <https://doi.org/10.1038/s41564-025-01986-w>.
- [35] Z. Pei, C. Ji, M. Shao, Y. Wu, X. Zhao, B. Man, Z. Li, J. Yu, C. Zhang, Enrichment strategies in surface-enhanced Raman scattering: theoretical insights and optical design for enhanced light-matter interaction, *Opto-Electronic Science* 4 (2025). <https://doi.org/10.29026/oes.2025.250015>.
- [36] J. Pei, X. Wan, M. Guo, J. Mi, W. Wu, Y. Hong, P. Hu, P. Chen, L. Chen, S. Xiang, Q. Zhang, H. Zeng, L. Liu, X. Fan, B. Yu, Mechanochemical synthesis of ZnO@TiO₂ II heterojunction material: Photocatalytic degradation and antibacterial synergistic effect, *Chemical Engineering Journal* 523 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.168624>.
- [37] Y. Wu, T. Sun, Z. Pei, C. Ji, X. Zhao, M. Shao, J. Yu, Z. Li, C. Zhang, Light-field and external-field modulation in surface-enhanced Raman scattering: Strategies and prospects, *Light Manipulation and Applications* (2026). <https://doi.org/10.70401/lma.2026.0004>.

3.10 SUPPORTING INFORMATION

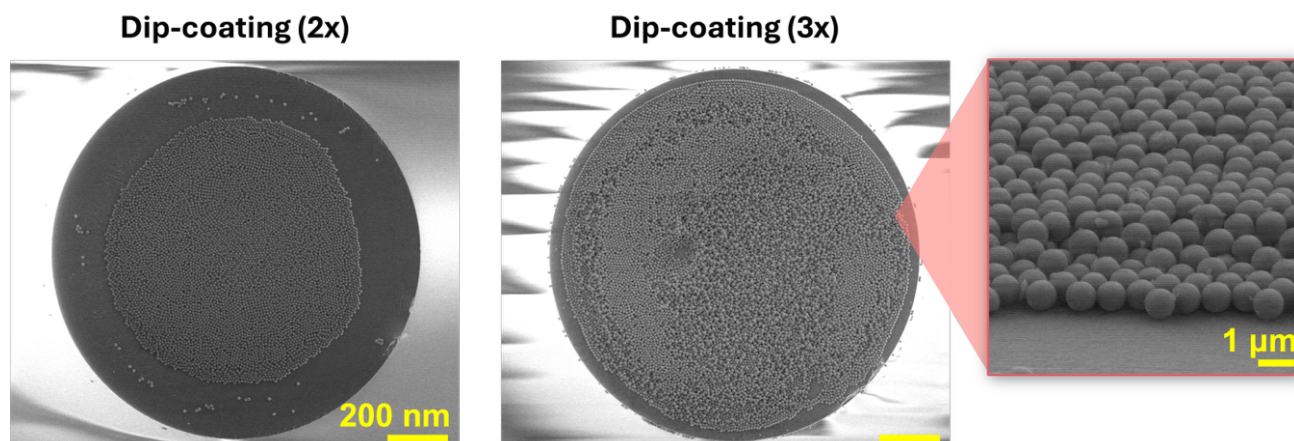


Figure S3.1. SEM images of the fiber tip after dip-coating with a monolayer of Si μ P. The 1 μ m silica microparticles were deposited onto the fiber surface using an ethanol-based suspension.

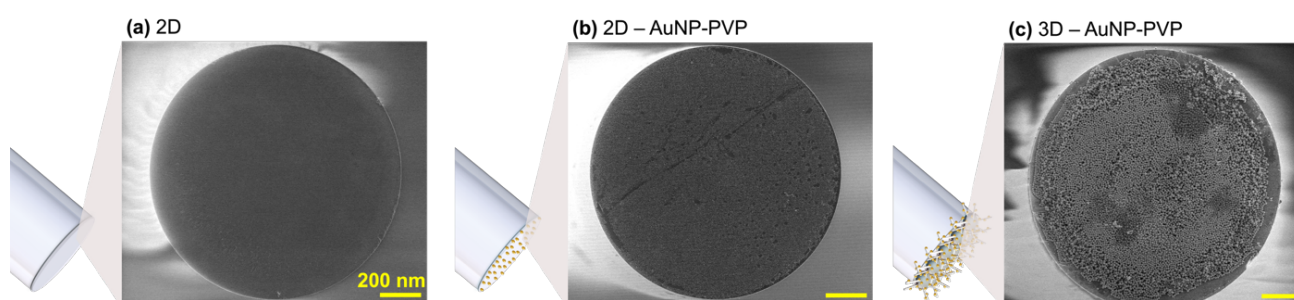


Figure S3.2. SEM images of fiber tip surfaces at different functionalization stages. The 2D (ZnO seed layer) and 3D (Si μ P/ZnO NR) architectures are shown before and after AuNP-PVP deposition, with low-magnification views highlighting surface coverage and structural integrity.

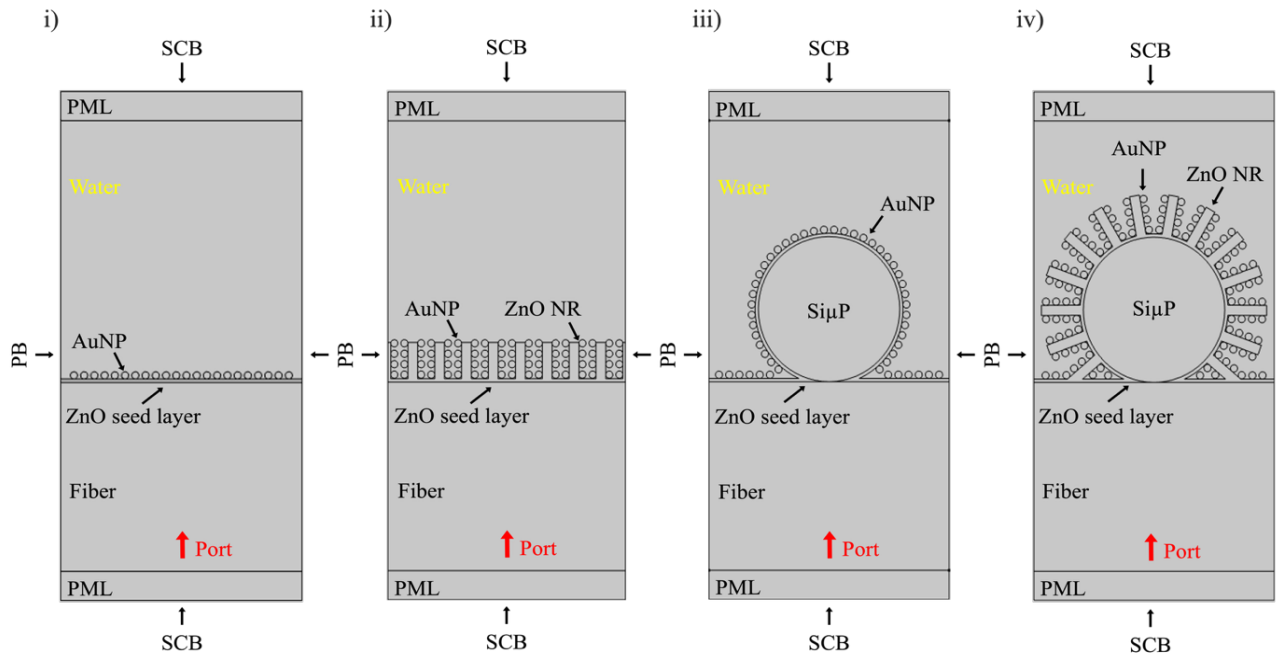


Figure S3.3. Geometries and boundary conditions for simulating the integrated E-field on gold nanoparticles (AuNP) surface of four surface architectures on optical fibers: (i) AuNP/ZnO seed layer, (ii) silica microparticles decorated with AuNP (SiμP/AuNP), (iii) zinc oxide nanorods decorated with AuNP (ZnO NR/AuNP), and (iv) SiμP with ZnO NR decorated with AuNP (SiμP/ZnO NR/AuNP). PML: Perfectly matched layer, SCB: Scattering boundary, PB: Periodic boundary. Excitation wavelength and power: 633 nm, 1W, respectively.

Table S3.1. Dimension and optical properties of structures used in simulation

Structure	Dimension	Structure	Optical properties (n)
SiμP diameter	1 μm	AuNP	$0.18344 + 3.4332i$
ZnO seed layer thickness	23 nm	ZnO	1.9888^2
ZnO NR length	250 nm	Fiber and SiμP	1.457^3
ZnO NR diameter	70 nm	Water	1.33^4
AuNP diameter	50 nm		
Minimal gap distance	22 nm		
Fiber length	1500 nm		
PML thickness	200 nm		
Water length	2000 nm		
Width of the overall domain	1700 nm		

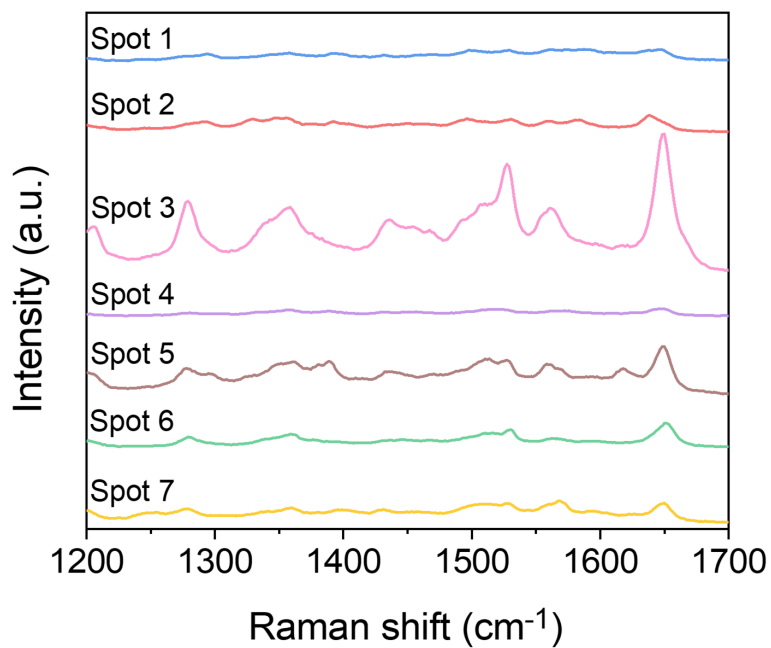


Figure S3.4. SERS spectra collected at different locations on a single AuNP/ZnO seed layer/silica substrate using Rhodamine B as the probe molecule. The substrate was immersed in 10 μ M Rhodamine B for an hour and then thoroughly washed with water before Raman measurements. Spectra were acquired from multiple spatial positions across the substrate surface under the same experimental conditions, showing point-to-point variation in SERS signal intensity across the analyzed regions of the substrate.

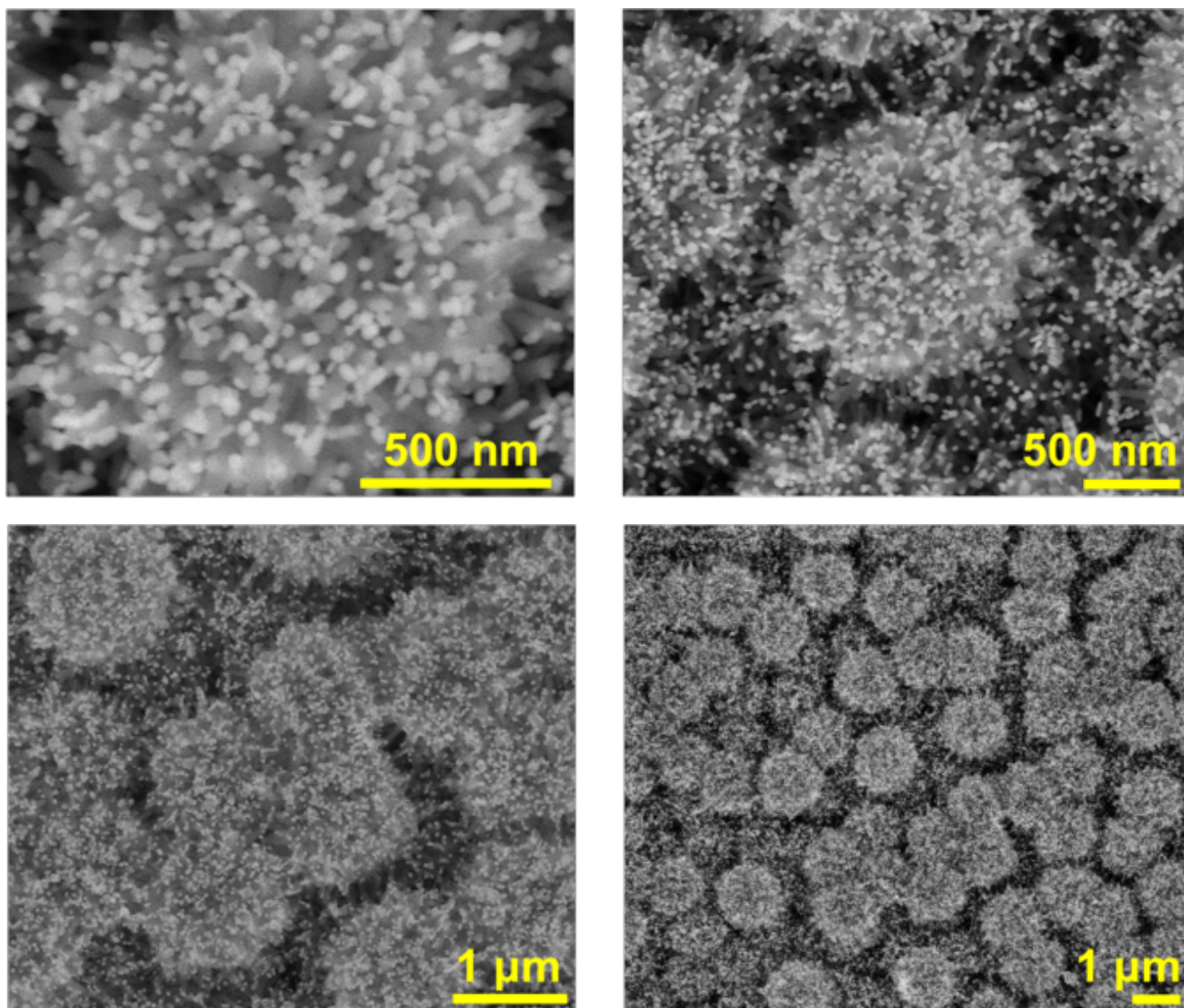


Figure S3.5. Backscattered SEM images of AuNP–PVP functionalized 3HD architecture, illustrating unprecedentedly dense and homogeneous AuNP loading across Si μ P/ZnO NR domains at multiple magnifications.

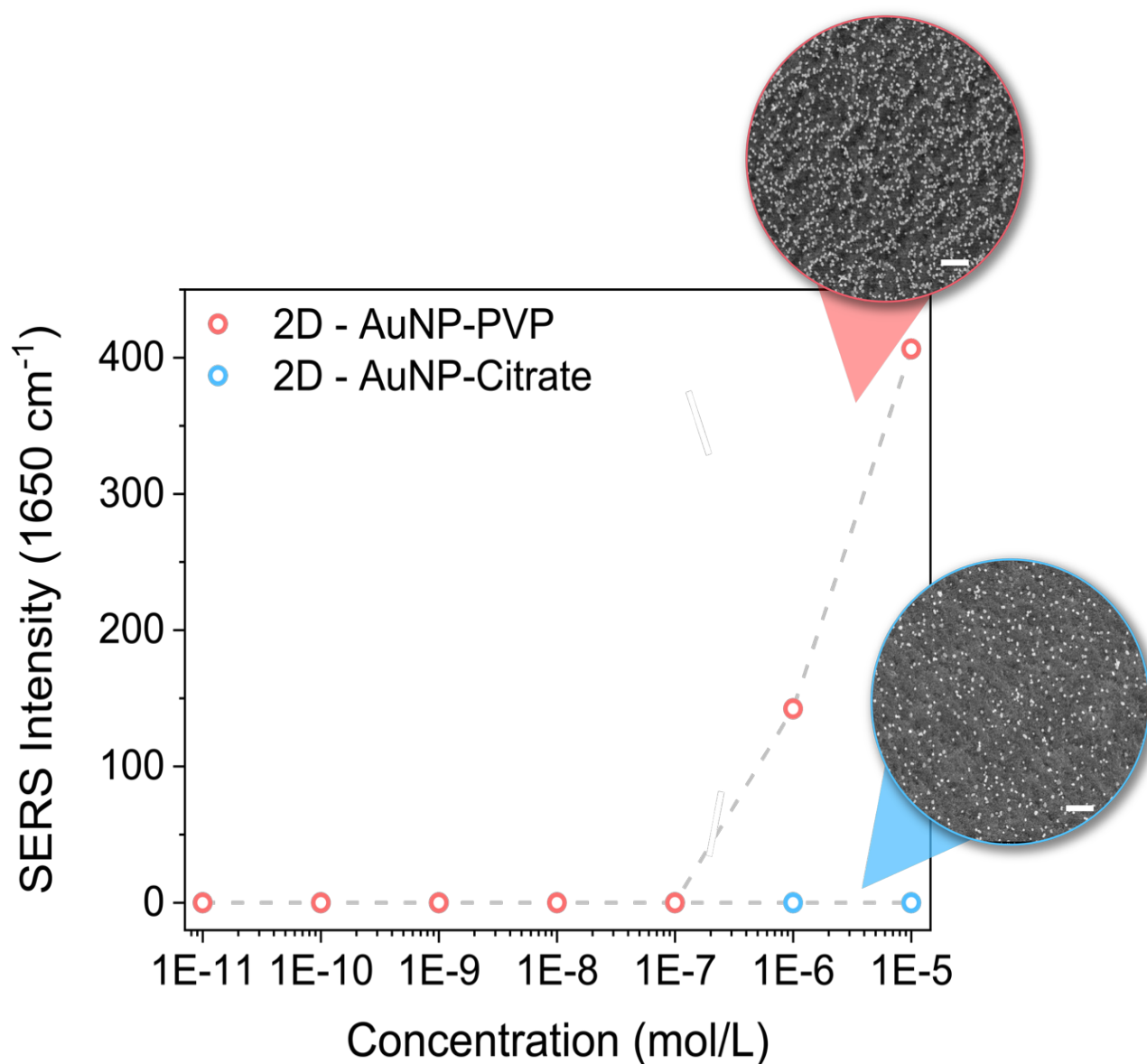


Figure S3.6. SERS performance of 2D fiber substrates (ZnO seed/AuNP) with different AuNP surface stabilizers. Panels (a) and (b) correspond to citrate-stabilized AuNP: (a) SEM image of the fiber surface and (b) SERS spectra of Rhodamine B at different concentrations. (c) compares the SERS response of citrate- and PVP-stabilized AuNP. The SEM insets correspond to the respective structures analyzed in the graph, with a scale bar of 500 nm.

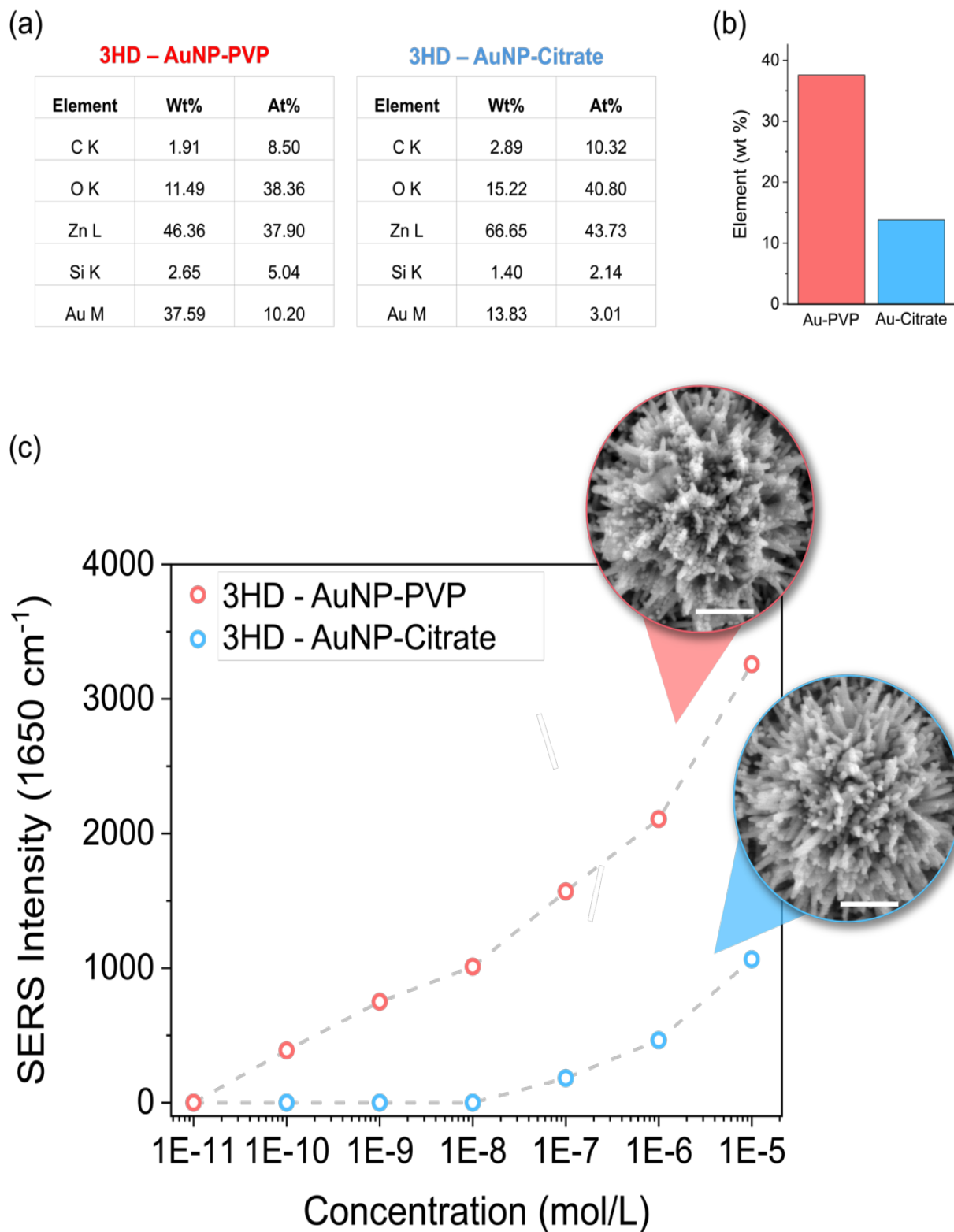


Figure S3.7. Characterization of 3HD fiber substrates (Si μ P/ZnO NR/AuNP) with different AuNP surface stabilizers. (a) EDX elemental analysis for citrate- and PVP-stabilized AuNP adsorbed on the 3HD structures. (b) Comparison of Au content (wt%) between the two modifications. (c) SERS response of Rhodamine B on 3HD fibers functionalized with citrate- and PVP-stabilized AuNP. The SEM insets correspond to the respective structures analyzed in the graph, with a scale bar of 500 nm.

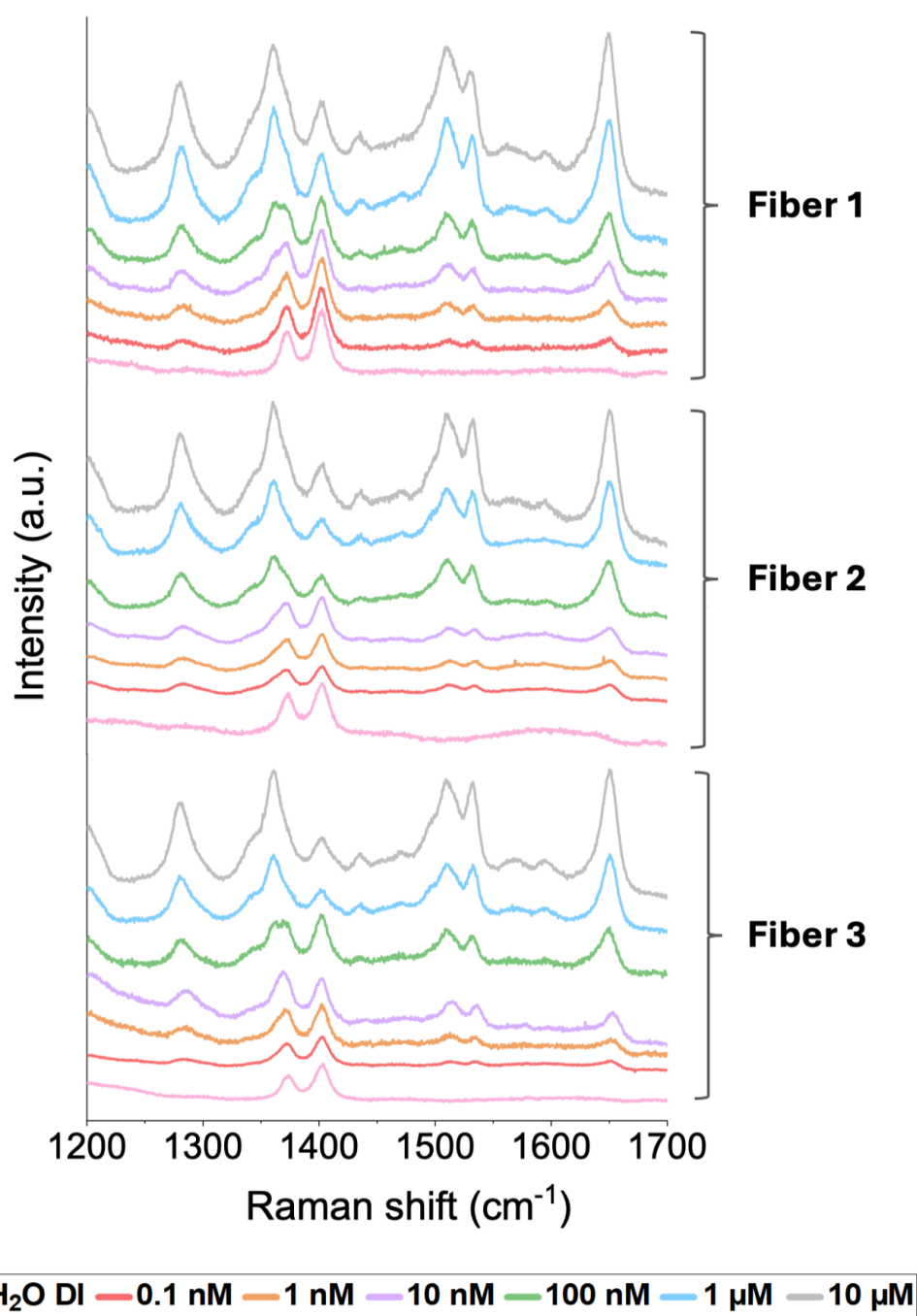


Figure S3.8. Inter-probe reproducibility of the 3HD fiber for RB detection. SERS spectra of RB acquired using three independently fabricated Si μ P/ZnO NR/AuNP fibers, referred to as Fiber 1, Fiber 2, and Fiber 3. For each fiber, spectra were collected under the same experimental conditions and using the same RB concentration range applied in the calibration analysis. The progressive increase in the characteristic RB bands with increasing concentration confirms the reproducible SERS response of the 3HD architecture across different probes. The intensity of the 1650 cm^{-1} band was used to construct the corresponding calibration curves and to calculate the LOD value.

Table S3.2. Linear regression parameters, limit of detection (LOD) for the three SERS 3HD fibers. The linear regression equations were obtained from calibration curves by plotting the SERS intensity at 1660 cm^{-1} as a function of analyte concentration in the range from 1×10^{-10} to 1×10^{-8} M. The coefficient of determination (R^2) indicates the goodness of fit of the linear model. The LOD was calculated according to the ICH guidelines using the equations $\text{LOD} = 3\sigma/S$, where S is the slope of the calibration curve and σ is the standard deviation of the analytical response obtained from the low-concentration calibration range. The mean and standard deviation (SD) values were calculated from the three independently fabricated 3HD fibers.

Fiber	Linear regression equation	R^2	LOD (M)
Fiber 1	$y = 592.61 + 6.074 \times 10^{10} x$	0.9093	5.498×10^{-9}
Fiber 2	$y = 308.39 + 3.017 \times 10^{10} x$	0.9956	1.116×10^{-9}
Fiber 3	$y = 340.02 + 5.559 \times 10^{10} x$	0.9605	3.529×10^{-9}
Mean $\pm$ SD	—	—	$(3.529 \pm 2.195) \times 10^{-9}$

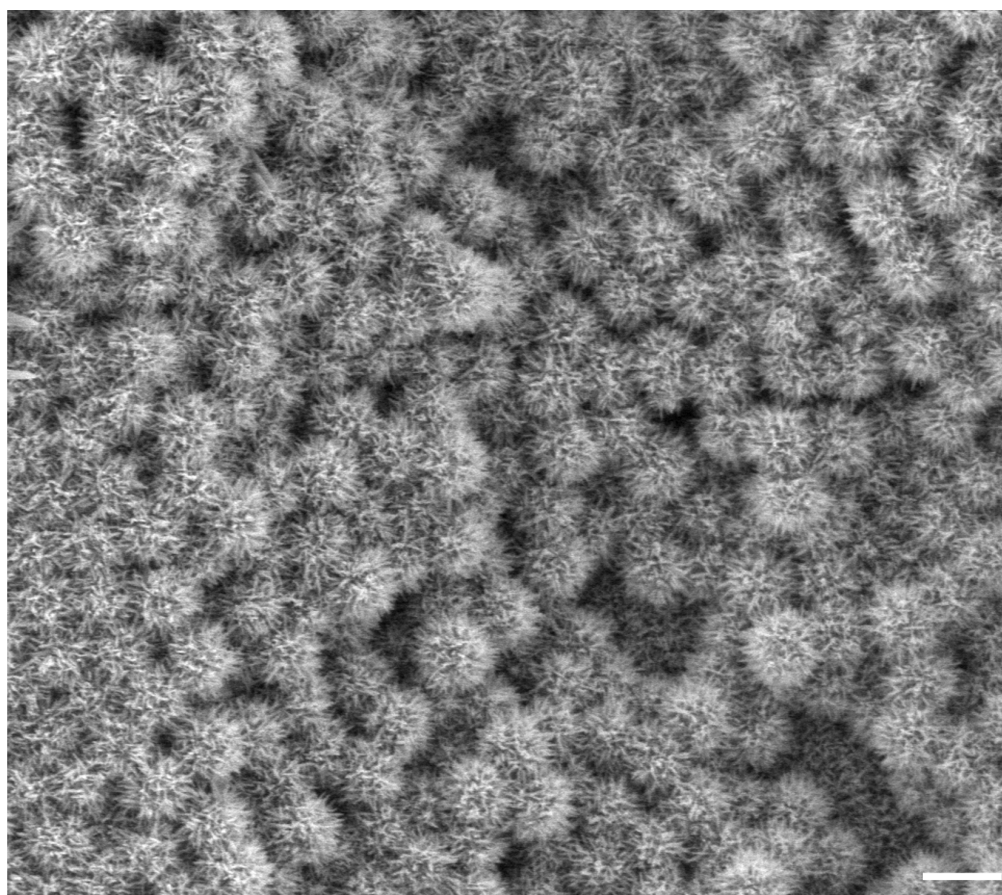


Figure S3.9. SEM image of the 3HD optical fiber tip after immediate exposure to an *E. coli* suspension. After immersion, the fiber tip was rinsed several times with water to remove loosely attached or non-adhered bacterial cells before SEM analysis. The high-magnification SEM image documents the nanoscale morphology of the functionalized 3HD surface used for evaluating biofouling interactions at the sensor interface. Scale bar: $1\text{ }\mu\text{m}$.

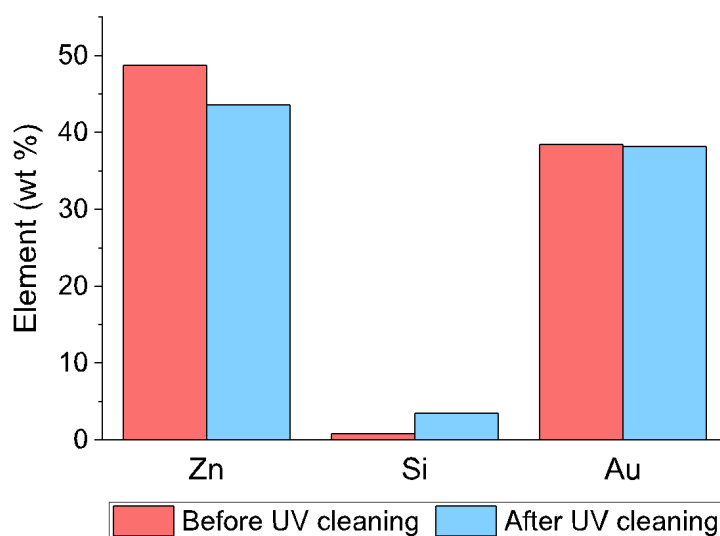


Figure S3.10. EDX elemental analysis of the Si μ P/ZnO NR/AuNP 3HD fiber structure before and after ten cycles of UV-assisted regeneration.

REFERENCES

1. Koelling, D., Freeman, A., Mueller, F., Johnson, P. B. & Christy, R. W. Optical constants of the Noble Metals. *Phys Rev B* 11, 3093 (1963).
2. Bond, W. L. Measurement of the refractive indices of several crystals. *J Appl Phys* 36, 1674–1677 (1965).
3. Malitson, I. H. Interspecimen Comparison of the Refractive Index of Fused Silica. *Journal of the society of America* 55, (1965).
4. Hale, G. M. & Querry, M. R. Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-um Wavelength Region. *Appl Opt* 12, (1973).

CAPÍTULO 4

04

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

4.1 CONCLUSÕES GERAIS

A integração de nanomateriais em sensores ópticos envolve um desafio que vai além da obtenção de materiais com propriedades luminescentes ou plasmônicas favoráveis. Após a funcionalização e a imobilização, a resposta analítica passa a depender da organização da interface, da acessibilidade do analito e do acoplamento entre o material ativo e o sistema de excitação e coleta. Esta tese abordou esse problema por meio do desenvolvimento de duas plataformas nanoestruturadas, projetadas de acordo com as exigências de mecanismos distintos de transdução óptica.

Na plataforma luminescente, nanopartículas de conversão ascendente funcionalizadas foram organizadas em filmes multicamadas por montagem Layer-by-Layer para o sensoriamento de *Escherichia coli*. Essa configuração permitiu associar a emissão das UCNPs a uma interface de reconhecimento biológico, produzindo uma resposta luminescente dependente da concentração bacteriana. A funcionalização com anticorpos ampliou a faixa de resposta em relação à plataforma sem anticorpos e resultou em um limite de detecção calculado de 34 CFU mL⁻¹. O estudo estabeleceu, assim, uma prova de conceito para a integração entre conversão ascendente, modificação superficial e organização multicamada em uma plataforma planar destinada ao sensoriamento bacteriano.

Na plataforma SERS, uma arquitetura hierárquica formada por micropartículas de sílica, nanobastões de ZnO e nanopartículas de ouro foi integrada à face terminal de uma fibra óptica. A fibra atuou simultaneamente como suporte, guia de excitação e meio de coleta do sinal, enquanto a organização tridimensional ampliou a região plasmonicamente ativa. A plataforma forneceu resposta experimentalmente detectável para rodamina B até 100 pM em meio líquido biologicamente complexo utilizados como modelo.

Além da intensificação do sinal Raman, a arquitetura incorporou funções relacionadas à operação em meios heterogêneos. A rede de nanobastões limitou a aproximação de espécies com

dimensões comparáveis às de microrganismos, reduzindo sua interferência física sem implicar seletividade molecular. A atividade fotocatalítica do ZnO possibilitou a regeneração da interface ao longo de dez ciclos consecutivos de detecção e limpeza. A reutilização da mesma sonda também permitiu realizar calibração e análise em uma interface comum, reduzindo a influência da variabilidade entre dispositivos preparados separadamente.

As duas plataformas não foram concebidas como técnicas equivalentes nem como componentes de um único dispositivo. O sistema baseado em UCNPs utilizou uma arquitetura planar para integrar luminescência e reconhecimento bacteriano, enquanto o sistema SERS empregou uma arquitetura hierárquica integrada à fibra para favorecer a interação plasmônica, a análise direta em meio líquido e a regeneração da superfície. Cada solução foi, portanto, definida pelas características do material, do analito e do mecanismo de transdução.

A principal conclusão desta tese é que as propriedades ópticas do nanomaterial, isoladamente, não determinam o desempenho do sensor. A resposta analítica resulta da integração entre material ativo, química de superfície, organização interfacial, transporte do analito e configuração óptica. O desenvolvimento de sensores nanoestruturados deve, assim, ser tratado como um problema de engenharia da plataforma, no qual os diferentes componentes precisam operar de forma coerente com as condições de análise.

4.2 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora a plataforma luminescente baseada em UCNPs tenha fornecido uma prova de conceito para o sensoriamento bacteriano, sua avaliação foi realizada em condições controladas e ainda não contemplou aspectos necessários para sua aplicação em sistemas de monitoramento microbiológico, como validação em matrizes alimentares, estabilidade durante o armazenamento e reprodutibilidade entre diferentes lotes de fabricação. A configuração planar em filmes Layer-by-Layer mostrou-se

adequada para organizar as nanopartículas e incorporar o elemento de reconhecimento biológico em uma interface opticamente ativa. A continuidade desse trabalho poderá explorar a deposição dos filmes sobre substratos flexíveis, a integração com sistemas compactos de excitação e leitura e a avaliação em matrizes alimentares. Estudos da resposta frente a diferentes microrganismos também poderão contribuir para aproximar a plataforma de condições representativas do monitoramento de alimentos.

A plataforma SERS integrada à fibra apresentou características compatíveis com medições diretas, localizadas e potencialmente remotas em meios líquidos. Entretanto, os ensaios realizados em amostras naturais tiveram caráter exploratório, e a aplicação da sonda em monitoramento ambiental ainda requer validação com analitos de interesse, avaliação quantitativa dos efeitos da matriz e investigação de seu desempenho durante períodos prolongados de operação. A combinação entre geometria de sonda, arquitetura hierárquica, exclusão de espécies de maiores dimensões e regeneração da interface fornece uma base para aplicações futuras em sistemas aquosos complexos. Os ensaios realizados com água de rio contribuíram para identificar aspectos próprios de amostras naturais, como variações de composição, matéria suspensa e competição entre espécies pela superfície, orientando as etapas seguintes de validação. A continuidade do estudo poderá priorizar analitos ambientalmente relevantes, métodos de calibração adequados a matrizes naturais, medições sob fluxo ou imersão prolongada e a associação da sonda a instrumentação Raman portátil, com o objetivo de avaliar sua utilização em condições progressivamente mais próximas do monitoramento em campo.

4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, os estudos demonstram que a conversão das propriedades ópticas de nanomateriais em respostas analíticas depende de sua integração coerente com a química de superfície, a organização interfacial, as características do analito e a configuração de leitura. Embora baseadas em materiais, arquiteturas e mecanismos de transdução distintos, as duas plataformas desenvolvidas evidenciam que o desempenho do sensor é determinado pelo projeto do sistema como um todo. Essa

perspectiva de engenharia de plataformas constitui a contribuição integradora da tese e fornece uma base para o desenvolvimento futuro de sensores ópticos destinados à análise de meios aquosos complexos.