



Universidade Federal de Campina Grande

Centro de Engenharia Elétrica e Informática

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica



# Caracterização da camada de reconhecimento de transdutores ópticos baseados no princípio da ressonância de plásmons de superfície

Tiago Abreu Tavares de Sousa

Campina Grande, Paraíba, Brasil

Fevereiro de 2018

# Tese de Doutorado

*Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande - Campus de Campina Grande como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Ciências no Domínio da Engenharia Elétrica*

Área de Conhecimento: Processamento de Informação

Tiago Abreu Tavares de Sousa

Aluno

Antonio Marcus Nogueira Lima, Dr.

Orientador

Franz Neff Helmut, Dr.

Orientador

Campina Grande, Paraíba, Brasil

Fevereiro de 2018

S725c

Sousa, Tiago Abreu Tavares de.

Caracterização da camada de reconhecimento de transdutores ópticos baseados no princípio da ressonância de plásmons de superfície / Tiago Abreu Tavares de Sousa. - Campina Grande, 2018.

100 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, 2018.

"Orientação: Profa. Dra. Antonio Marcus Nogueira Lima, Prof. Dr. Franz Neff Helmut".

Referências.

1. Adsorção de Proteínas. 2. Identificação de Sistemas. 3. Método dos Elementos Finitos. 4. Ressonância de Plásmom de Superfície. I. Lima, Antonio Marcus Nogueira. II. Helmut, Franz Neff. III. Título.

CDU 621.318.43(043)


**"CARACTERIZAÇÃO DA CAMADA DE RECONHECIMENTO DE TRANSDUTORES  
ÓPTICOS BASEADOS NO PRINCÍPIO DA RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE  
SUPERFÍCIE"**

**TIAGO ABREU TAVARES DE SOUSA**

**TESE APROVADA EM 16/03/2018**



**ANTONIO MARCUS NOGUEIRA LIMA, Dr., UFCG**  
Orientador(a)



**FRANZ HELMUT NEFF, Dr, UFCG**  
Orientador(a)



**VITALY FÉLIX RODRIGUEZ ESQUERRE, Dr., UFBA**  
Examinador(a)



**HELDER ALVES PEREIRA, Dr., UFCG**  
Examinador(a)



**HERVÉ MICHEL LABORDE, Dr., UFCG**  
Examinador(a)



**ANGELO PERKUSICH, D.Sc., UFCG**  
Examinador(a)

**CAMPINA GRANDE - PB**

# Resumo

O uso da ressonância de plásmon de superfície (SPR) como bio-transdutor requer a formação de uma camada reconhecimento sobre um filme metálico. Sobre o metal é formada uma camada de proteínas sobre a qual devem ser depositados os anticorpos para a realização de um imuno-ensaio. A proteína é depositada de modo não homogêneo sobre a superfície metálica por meio de adsorção. Um modelo matemático foi desenvolvido para simular todo o processo para formação dessa camada de proteína (transporte da solução e adsorção) e a excitação do SPR considerando camadas irregulares e não homogêneas. A complexidade do modelo impossibilita sua solução analítica, sendo utilizado o método dos elementos finitos por meio do software COMSOL Multiphysics. Também foi desenvolvida uma teoria de meios equivalentes para representar uma camada irregular e não homogênea como sendo regular e homogênea. Um método iterativo baseado em otimização foi criado com essa teoria para caracterizar a camada de reconhecimento em um bio-transdutor a partir de sua resposta SPR. O método foi aplicado para tratar dados de experimentos de adsorção com neutravidina, albumina bovina e hemoglobina obtendo resultados compatíveis com a literatura.

**Palavras chave:** Adsorção de proteínas, Identificação de sistemas, Método dos elementos finitos, Ressonância de plásmon de superfície.

# Abstract

The use of surface plasmon resonance as a bio-transducer requires the formation of a recognition layer over a metallic film. For immunoassays, antibodies are used at the recognition layer, a protein layer must be formed by means of adsorption on the metal surface, resulting in an inhomogeneous layer. A mathematical model was developed to simulate all the protein layer formation processes (fluid transport and adsorption) and, for the first time, the SPR excitation over irregular and inhomogeneous recognition layers. The model complexity prevents analytical solutions. Thus the finite element method (FEM), utilizing the COMSOL Multiphysics software was applied for a numerical approach. In addition, a theory of equivalent layers was developed to represent an irregular and inhomogeneous layer as regular and homogeneous. Applying this theory, an interactive method based on optimization was created to characterize the recognition layer in a bio-transducer by means of its SPR response. The method was applied to data from adsorption experiments with neutravidin, bovine albumin and neutravidin. The obtained results match the values found in literature.

**Palavras chave:** Finite element method, Protein adsorption, Surface plasmon resonance, System identification.

# Lista de Figuras

Figura 2.1:	Configurações para ressonância de plásmons de superfície propostas por Otto (esquerda) e por Kretschmann-Raether (direita) . . . . .	23
Figura 2.2:	Esquema representativo de um transdutor SPR com ênfase na ressonância de plasmon de superfície. . . . .	25
Figura 2.3:	Refração da luz com ângulo de incidência $\alpha$ de um meio com índice $n_i$ para um de índice $n_t$ . . . . .	29
Figura 2.4:	Ilustração do campo evanescente gerado durante a ressonância de plásmons de superfície . . . . .	31
Figura 2.5:	Esquema da camada de reconhecimento preparada para detectar uma interação antígeno-anticorpo. . . . .	32
Figura 2.6:	Sensorgramas obtidos para curvas SPR em um experimento com a) ligações reversíveis apenas e com b) ligações irreversíveis. . . . .	37
Figura 2.7:	Acoplamento óptico do transdutor VIR. . . . .	39
Figura 2.8:	Acoplamento óptico do transdutor SPREETA. . . . .	39
Figura 2.9:	Acoplamento óptico do transdutor PPBIO. . . . .	41
Figura 2.10:	Ilustração dos fenômenos de reflexão e transmissão de um feixe de luz em um arranjo de quatro camadas. . . . .	43

Figura 2.11:	Representação da cobertura não homogênea da camada de reconhecimento do transdutor SPR (a) vista lateral das moléculas recém adsorvidas; (b) representação de alguns fenômenos de deformação da camada, sendo 1- pequena deformação, 2- deformação, 3- desorção, 4-rotação, 5- sem variação; (c) vista lateral após deposição de anticorpos; (d) vista superior após deposição de anticorpos (e) imagem microscópica de uma camada não-homogênea de albumina bovina. . . . .	47
Figura 3.1:	Modelo de camadas com o adicional 2* ao filme metálico com espessura variante, variando $\epsilon_2$ . . . . .	55
Figura 4.1:	Arranjo óptico de quatro camadas para excitação a ressonância de plásmos de superfície (a) e modelo projetado para solução numérica (b). Os vetores de onda, constantes dielétricas, espessura das camadas estão indicadas. . . . .	58
Figura 4.2:	Comparação das curvas teóricas de refletância SPR obtidos com as equações de Fresnel e com o modelo proposto. Os parâmetros simulados em cada gráfico estão apresentados na Tabela 4.1. . . . .	64
Figura 4.3:	Fluxograma do processo de validação do modelo MEF proposto. . . . .	66
Figura 4.4:	Adsorção cooperativa: (a) cooperação positiva, as moléculas já aderidas atraem as demais melhorando a cinética de adsorção; (b) cooperação negativa, as moléculas aderidas repelem as demais, dificultando a cinética de adsorção. . . . .	67
Figura 4.5:	Geometrias utilizadas para redefinir a superfície $S_9$ no modelo MEF proposto. As equações estão apresentadas no apêndice A. . . . .	68
Figura 4.6:	Sensorgrama do processo de adsorção provocado por uma solução de Neutravídina com concentração 0,21 $\mu\text{M/L}$ (esquerda) e 3,3 $\mu\text{M/L}$ (direita). . . . .	69
Figura 4.7:	Vistas da região de incidência da luz. . . . .	70
Figura 4.8:	Comparação entre as curvas SPR simuladas com diferentes geometrias para quatro valores de cobertura distribuídos de forma uniforme espaçados entre 0 a 1. . . . .	71



Figura 4.9:	Associação paralela de dielétricos . . . . .	71
Figura 4.10:	Comparação dos resultados obtidos de simulações para diferentes valores de cobertura, utilizando o modelo MEF proposto e solucionado utilizando o Comsol e o modelo de Fresnel expandido: as equações de Fresnel com o dielétrico equivalente. O desvio médio quadrático (RMSD) é apresentado para cada par de curvas para a mesma cobertura. . . . .	72
Figura 5.1:	Plataforma experimental desenvolvida sobre o bio-chip SPREETA. . . . .	75
Figura 5.2:	Espalhamento espectral da luz excitante do SPREETA medida com o espectrômetro USB4000 da Ocean Optics (detector TCD1304AP com sensibilidade de 60 fótons/count). . . . .	76
Figura 5.3:	Curvas SPR simuladas: com o modelo de Fresnel ( $R_m$ ) e com o modelo de Fresnel Modificado ( $R_p$ ). Curvas SPR experimentais: sem calibração ( $R_e$ ) e com calibração $C(R_p)$ e $C(R_e)$ . . . . .	76
Figura 5.4:	Fluxograma apresentando o procedimento de calibração do bio-transdutor. . . . .	78
Figura 5.5:	Fluxograma apresentando o procedimento desenvolvido para calcular os valores de cobertura da camada em formação. Caso a constante dielétrica da proteína em processo de adsorção não seja conhecida, o procedimento em pontilhado deve ser realizado. . . . .	81
Figura 5.6:	Valores estimados utilizando dados oriundos de experimentos com neutraavidina ( $n_{NA} = 1,5785$ ) e albumina bovina ( $n_{BSA} = 1,5530$ ). . . . .	82
Figura 5.7:	Valores estimados utilizando dados oriundos de experimentos com hemoglobina ( $n_{hemo} = 1,6043$ ). . . . .	83

# Lista de Tabelas

Tabela 4.1:	Valores dos parâmetros utilizados para gerar as curvas SPR na figura 4.2. As espessuras da primeira e última camadas são irrelevantes por serem muito maior que as demais. . . . .	65
Tabela 5.1:	Resumo dos parâmetros teóricos e calculados para a camada de proteína.	82

# Lista de símbolos

- $\alpha$  - Ângulo de incidência da luz no arranjo de camadas
- $\beta$  - Ângulo de transmissão da luz através do arranjo de camadas
- $\alpha_c$  - Ângulo crítico de reflexão total
- $n_1$  - Índice de refração do substrato óptico
- $\varepsilon_1$  - Constante dielétrica do substrato óptico
- $n_2$  - Índice de refração do filme metálico
- $\varepsilon_2$  - Constante dielétrica do filme metálico
- $d_2$  - Espessura do filme metálico
- $\lambda$  - Comprimento de onda do feixe de luz
- $\varepsilon'$  - Parte real da constante dielétrica do filme metálico
- $\varepsilon''$  - Parte imaginária da constante dielétrica do filme metálico
- $n_3$  - Índice de refração da membrana de reconhecimento
- $\varepsilon_3$  - Constante dielétrica da membrana de reconhecimento
- $\varepsilon_{eq}$  - Constante dielétrica equivalente da membrana de reconhecimento.
- $d_3$  - Espessura da membrana de reconhecimento
- $n_4$  - Índice de refração da solução aquosa no meio externo

- $\varepsilon_4$  - Constante dielétrica da solução aquosa no meio externo
- $n_{\text{eff}}$  - Índice de refração do meio efetivo sobre o filme metálico
- $\varepsilon_{\text{eff}}$  - Constante dielétrica do meio efetivo sobre o filme metálico
- $\vec{E}$  - Vetor intensidade de campo dielétrico
- $\vec{B}$  - Vetor intensidade de campo magnético
- $\vec{D}$  - Vetor densidade de fluxo dielétrico
- $\vec{H}$  - Vetor densidade de fluxo magnético
- $\vec{J}$  - Vetor densidade de corrente
- $t$  - Tempo
- $\varepsilon$  - Constante dielétrica do meio (permissividade elétrica)
- $\varepsilon_0$  - Constante dielétrica do vácuo
- $\mu$  - Constante magnética do meio (permeabilidade magnética)
- $\mu_0$  - Constante magnética do vácuo
- $\sigma$  - Condutividade elétrica do meio
- $\omega$  - Frequência angular da onda
- $c$  - Velocidade da luz no vácuo
- $\vec{k}_i$  - Vetor de onda da luz incidente
- $\vec{k}_{xi}$  - Componente na direção x do vetor de onda da luz incidente
- $\vec{k}_{yi}$  - Componente na direção y do vetor de onda da luz incidente
- $\vec{k}_t$  - Vetor de onda da luz transmitida
- $\vec{k}_{xt}$  - Componente na direção x do vetor de onda da luz transmitida

- $\vec{k}_{yt}$  - Componente na direção y do vetor de onda da luz transmitida
- $R$  - Refletância da luz
- $\Phi_i$  - Fluxo de irradiação eletromagnética incidente na superfície
- $\Phi_r$  Fluxo de irradiação eletromagnética refletido pela superfície
- $r_p$  - Coeficiente de refletividade para a onda com polarização transverso-magnética.
- $\Theta$  - Cobertura da camada
- $V_a$  - Volume de absorvato
- $V_m$  - Volume máximo de absorvato
- $m_a$  - Massa de absorvato
- $m_m$  - Massa máxima de absorvato
- $c_s$  - Concentração da substância absorvente imediatamente acima da superfície sensível
- $k^{on}$  - Constante de formação da camada
- $k^{off}$  - Constante de dessorção da camada

# Lista de siglas

AIM - Modo de interrogação angular (*Angular Interrogation Mode*)

BSA - Soro de albumina bovina (*Bovine Serum Albumin*)

FDTD - Método das diferenças finitas no domínio do tempo (*Finite-difference time-domain*)

IM - Modulação de intensidade (*Intensity Modulation*)

MEF - Método dos elementos finitos (*Finite Element Method*)

MoM - Método dos momentos (*Method of Moments*)

MUMPS - *MUltifrontal Massively Parallel sparse direct Solver*

PARDISO - *Parallel Direct Sparse Solver*

PBS - Solução tampão fosfato-salina (*PBS - Phosphate Buffered Saline*)

PCM - Mensuração de fase (*Phase Change Measurement*)

PM - Mensuração de polarização (*Polarization Measurement*)

PPBIO - Prisma Polimérico para aplicação biológica

RSA - Adsorção sequencial aleatória (*random sequential adsorption*)

SPOOLES - *S*Parse *O*bject *O*riented *L*inear *E*quations *S*olver

SPR - Ressonância de plásmons de superfície (*Surface Plasmon Resonance*)

SPW - Onda de plásmons de superfície (*Surface Plasmon Wave*)

UFCG - Universidade Federal da Paraíba

WIM - Modo de interrogação por comprimento de onda (*Wavelength Interrogation Mode*)

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>17</b>
1.1	Objetivo Geral . . . . .	19
1.2	Objetivos Específicos . . . . .	20
1.3	Estrutura do documento . . . . .	20
<b>2</b>	<b>Fundamentação Teórica</b>	<b>22</b>
2.1	A ressonância de plásmons de superfície. . . . .	22
2.1.1	Apresentação matemática . . . . .	25
2.1.2	A onda de superfície . . . . .	28
2.2	O transdutor SPR . . . . .	31
2.2.1	Modos de interrogação . . . . .	33
2.2.2	A condição de ressonância . . . . .	35
2.2.3	Acoplamento óptico . . . . .	38
2.3	Modelos matemáticos para refletância . . . . .	41
2.3.1	Equações de Fresnel . . . . .	41
2.3.2	O modelo de Fresnel modificado . . . . .	44
2.4	Cobertura da camada e processo de adsorção em superfície . . . . .	46
2.5	Considerações Gerais . . . . .	49
<b>3</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>51</b>
3.1	Transporte de fluidos . . . . .	51
3.2	Adsorção de proteínas . . . . .	53
3.3	Caracterização da membrana de reconhecimento . . . . .	54



<b>4 Modelos</b>	<b>57</b>
4.1 Formulação do modelo . . . . .	57
4.1.1 Geometria . . . . .	57
4.1.2 Condições de contorno . . . . .	58
4.1.3 O método de Solução . . . . .	60
4.1.4 Estudo comparativo . . . . .	63
4.1.5 Aplicação . . . . .	65
4.2 Cálculo da constante dielétrica equivalente . . . . .	70
4.3 Constante dielétrica resultante $\varepsilon_R$ e comprimento de onda resultante $\lambda_R$ . . .	72
<b>5 Caracterização da camada dielétrica</b>	<b>74</b>
5.1 Plataforma experimental . . . . .	74
5.2 Calibração do equipamento . . . . .	76
5.3 Estimativa da constante dielétrica equivalente . . . . .	78
5.4 Estimativa da cobertura e constante dielétrica da proteína . . . . .	80
5.5 Resultados . . . . .	82
5.6 Conclusão . . . . .	83
<b>6 Conclusões</b>	<b>85</b>
6.1 Perspectivas de trabalhos futuros . . . . .	86
<b>Apêndice A Equações simuladas no modelo proposto</b>	<b>87</b>
<b>Apêndice B Protocolo Experimental</b>	<b>89</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>92</b>

# Capítulo 1

## Introdução

Interações biomoleculares (fármacos, antígeno-anticorpo, ácidos nucleicos, ensaios enzimáticos e proteínas) são essenciais para a atividade biológica, ocorrendo nos organismos a todo momento. São essas interações que permitem, por exemplo, a organização e funcionamento celular. Em síntese, todo processo biológico envolve uma sequência de interações entre moléculas.

A caracterização global e completa de interações moleculares é a chave para a descoberta de novas drogas, desenvolvimento de sistemas de diagnóstico e compreensão dos processos da vida a nível molecular em geral. Para o desenvolvimento de drogas, por exemplo, são necessários cerca de 10 anos e 600 a 700 milhões de dólares [1]. A correta seleção das substâncias candidatas à composição da droga pode ser acelerada se suas interações biomoleculares forem conhecidas, o que ajudaria a evitar erros graves como eliminar erroneamente substâncias que seriam boas candidatas à composição.

Para detectar e quantificar uma interação é necessário preparar o material biológico para interação sobre um transdutor sensível a alterações no material preparado. Um sensor preparado com esse fim tem sua seletividade regida pela escolha e preparação do material biológico. Já a sensibilidade e precisão dependem do transdutor utilizado.

A seletividade almejada nesse tipo de sensor é observada em um sistema imunológico, no qual uma proteína específica é produzida para reagir apenas com o corpo estranho (antígeno) para o qual foi produzido. Por esse motivo o anticorpo é um forte candidato para compor o material biológico do bio-sensor.

Já para o transdutor, uma alternativa eficaz é a plasmônica, o estudo da interação entre ondas eletromagnéticas e elétrons livres em um meio. A interação luz-matéria pode ser aplicada para detectar interações moleculares ao monitorar as ondas eletromagnéticas associadas. Dentre as técnicas de plasmônica se destaca a ressonância de plásmons de superfície (*SPR - Surface Plasmon Resonance*) pela sua sensibilidade e seletividade, além de não utilizar marcadores.

A ressonância de plásmons de superfície é uma oscilação na densidade de carga que se propaga ao longo de uma superfície quando os elétrons livres presentes em uma interface metal-dielétrico recebem energia proveniente de um feixe de luz incidente. Criando um arranjo com substâncias específicas, organizadas em camadas apropriadamente ordenadas, basta incidir corretamente um feixe de luz com comprimento de onda também específico para propiciar a ressonância de plásmons. O feixe incidente transmite uma fração de sua energia para os elétrons e a fração restante é refletida com uma assinatura do SPR.

A detecção e análise acurada da luz refletida permite, por meio dessa assinatura, inferir informações sobre o complexo de camadas que propiciou a ressonância. Detectando a ocorrência, ou não, da interação biomolecular para a qual o meio dielétrico do arranjo de camadas estiver preparada.

A preparação do arranjo de camadas, contudo, é um ponto chave da utilização desse tipo de transdutor. A especificidade e seletividade da interação é garantida pela correta escolha das substâncias que compõe o arranjo. A sensibilidade está relacionada a um processo adequado de adsorção para formação de uma membrana de reconhecimento.

O processo de adsorção de proteínas em uma superfície, contudo, é complicado [2], mas desperta interesse em pesquisadores de diversas áreas. Alguns exemplos de aplicação desse tipo de estudo são o desenvolvimento de biomateriais [3], de implantes biomédicos [4], além do estudo, aplicação e desenvolvimento de nanopartículas [5–7], entre outras áreas como ciência farmacêutica, biotecnologia, biologia celular e biofísica [2]. Sendo a cobertura da superfície adsorvida um tópico que concentra interesse dos pesquisadores da área, seja para identificar o alcance de sua influência [3, 8, 9] ou para sua mensuração [4, 5, 7].

Por esses motivos, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de utilizar a ressonância de plásmons de superfície para caracterizar a membrana de reconhecimento durante seu processo de formação e estimar sua propriedade dielétrica e cobertura. Possibilitando, assim,

qualificar e otimizar a preparação da membrana de reconhecimento, reduzindo gastos de tempo e material biológico (custo), além de ampliar a sensibilidade e precisão.

Um estudo teórico da sensibilidade do SPR à cobertura de uma camada, no entanto, é dificultado pela ausência de ferramentas de simulação que contemplem essa variável. As equações de Fresnel são um método consolidado de calcular a ressonância, mas têm como uma de suas hipóteses um arranjo com camadas homogêneas, regulares e uniformes, sendo necessária apenas a espessura e a propriedade dielétrica de uma camada para determinar sua influência na ressonância. Espessura que não é claramente definida quando uma camada irregular, não uniforme e com lacunas é observada. Neste caso a cobertura da camada deve ser considerada.

Um modelo teórico do SPR em um arranjo com camadas irregulares e não homogêneas foi proposto utilizando as equações de Maxwell para estudar a sensibilidade da ressonância. Hipóteses como isotropia, linearidade e refração/reflexão sem mudança de polarização foram mantidas das equações de Fresnel. A aplicação das equações de Maxwell para ondas planas em superfícies irregulares adicionou ao modelo uma complexidade matemática que só pode ser solucionada numericamente, para o caso em estudo o método dos elementos finitos (MEF) foi escolhido.

Esse modelo foi desenvolvido como primeira etapa da pesquisa, contemplando a difusão do fluido na célula de fluxo, o processo de adsorção e a ressonância de plásmons de superfície. Na segunda etapa, o modelo foi aplicado para gerar o sensorgrama para o processo de formação de uma camada de neutravidina e estudar a geometria da camada em adsorção. Por fim, os resultados obtidos foram utilizados para justificar decisões tomadas ao elaborar um método de otimização para estimar o índice de refração do material, a cobertura da camada e a espessura da molécula aderida à superfície.

## 1.1 Objetivo Geral

Caracterizar a membrana de reconhecimento de um bio-transdutor SPR quanto à sua cobertura e constante dielétrica por meio de uma curva SPR medida

## 1.2 Objetivos Específicos

- Estudar a influência do transporte de fluido sobre o processo de adsorção molecular de proteínas em uma superfície metálica;
- Propor um modelo matemático que contemple a interação da física eletromagnética, inerente à ressonância, com a física da adsorção, inerente à formação da camada;
- Planejar e executar um conjunto de experimentos de adsorção para validar o modelo matemático proposto;
- Analisar e explorar o potencial de simulação do modelo matemático proposto enfatizando sua robustez e confiabilidade;
- Investigar, por meio do modelo matemático proposto, a organização das moléculas adsorvidas na superfície metálica e sua influência na ressonância de plásmons de superfície;
- Utilizar métodos de identificação de sistemas para analisar a curva SPR gerada por um bio-transdutor SPR e inferir a constante dielétrica e a cobertura da camada de reconhecimento no arranjo.

## 1.3 Estrutura do documento

No **Capítulo 2** é apresentado, de forma resumida, o conhecimento básico necessário para compreensão do trabalho realizado. A abordagem foca principalmente a excitação de plásmons de superfície, o modelo de fresnel e a adsorção de proteínas.

No **Capítulo 3**: são apresentadas as principais contribuições nos últimos anos encontradas na literatura científica das áreas que o modelo abrange.

No **Capítulo 4**: é apresentado o modelo matemático proposto para simular a ressonância de plásmons de superfície, bem como os testes realizados com o modelo para sua validação. Também é explorada a organização molecular da proteína adsorvida na superfície e proposto um meio equivalente para representar a camada em formação. Também é proposto o uso do transdutor SPR como refratômetro para calibração do equipamento.

No **Capítulo 5**: Os modelos propostos no capítulo 3 são aplicados em um método para caracterizar a camada de reconhecimento do bio-transdutor SPR.

No **Capítulo 6**: Os resultados alcançados são analisados e avaliados enfatizando a contribuição do trabalho. Também são apresentadas sugestões para a continuidade do trabalho ressaltando possíveis aplicações do mesmo.

# Capítulo 2

## Fundamentação Teórica

Neste capítulo são apresentados, de forma resumida, o princípio da ressonância de plásmons de superfície, a onda de superfície, o transdutor SPR e seus modos de funcionamento, a curva de refletância resultante de um transdutor SPR e princípios do processo de adsorção.

### 2.1 A ressonância de plásmons de superfície.

Um feixe luminoso incidente sobre uma interface de materiais ópticos quaisquer com ângulo de incidência maior que o ângulo crítico deve ser totalmente refletido, isso é o que se pensava até o início do século XX, mas esse resultado não foi obtido por Wood (1902) [10] em uma configuração específica de metal e dielétrico. Contudo, apenas na década de 60 do século XX arranjos experimentais que exploravam a então chamada “reflexão total frustrada” foram criados para estudar o que hoje se denomina o fenômeno da ressonância de plásmons de superfície. São estas as configurações de Otto, na qual a camada dielétrica fica entre o substrato óptico e a camada metálica, e a configuração de Kretschmann-Raether, na qual a camada metálica se posiciona entre a dielétrica e o substrato óptico, ver Figura 2.1 [11].

A ressonância de plásmons de superfície ocorre de forma similar em ambas as configurações, no entanto a Kretschmann-Raether é mais utilizada por questões de facilidade de instrumentação [12]. A apresentação física e matemática do SPR neste capítulo é feita com base na configuração de Kretschmann-Raether, pois esta foi a configuração utilizada neste

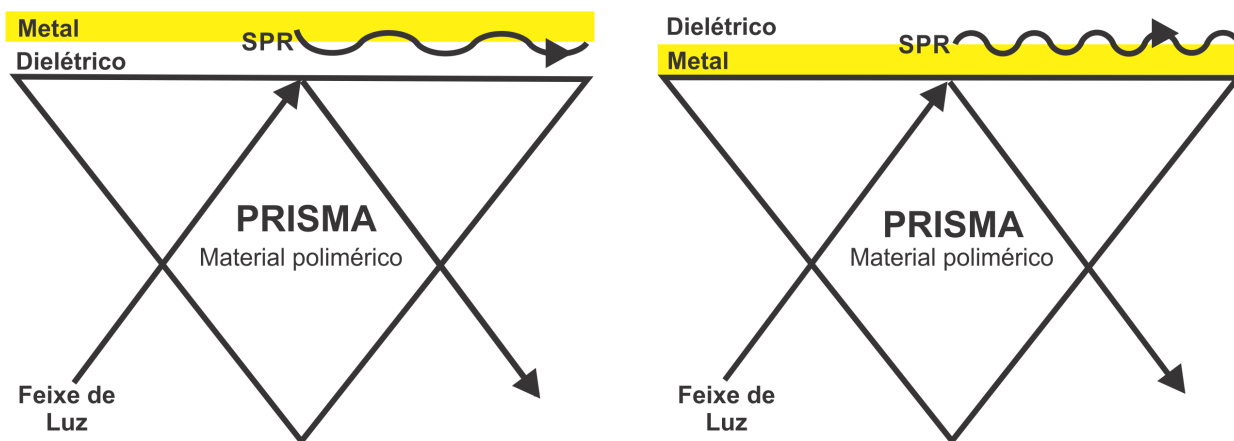


Figura 2.1: Configurações para ressonância de plásmons de superfície propostas por Otto (esquerda) e por Kretschmann-Raether (direita)

trabalho.

Em um bio-sensor com esta configuração uma solução aquosa da proteína em análise é bombeada através de uma célula de fluxo na qual está exposta a superfície metálica. Assim o processo de adsorção de proteínas acontece sobre o metal, formando a membrana de reconhecimento do arranjo de camadas.

Sobre esse arranjo, deve incidir um feixe de luz com condições específicas de polarização, comprimento de onda e ângulo de incidência. Esse feixe irá excitar, na interface metal-dielétrico, uma oscilação na densidade de carga, gerando uma onda de plásmons de superfície (*SPW - Surface Plasmon Wave*). Apenas a componente do feixe de luz com polarização transverso-magnética é capaz de excitar a SPW, a componente transverso-elétrica sofre reflexão total [11]. Por isso, a luz deve ser polarizada antes de excitar a ressonância, caso contrário uma componente será totalmente refletida de modo a atenuar a perda de energia percebida pelos fotodetectores adequadamente posicionados para captar a luz refletida.

As demais condições do feixe de luz que excita a SPW são fortemente dependentes dos materiais utilizados no arranjo de camadas no qual ocorre a ressonância. Sendo necessário apenas garantir a condição de reflexão total, ou seja, o ângulo de incidência ( $\alpha$ ) da luz na interface deve ser maior que o ângulo crítico ( $\alpha_c$ ).

Por esse motivo, o primeiro material do arranjo de camadas deve ser um substrato óptico com índice de refração ( $n_1 = \sqrt{\epsilon_1}$ ) alto o suficiente para reduzir o valor de  $\alpha_c$  a um valor abaixo da faixa de ângulos de incidência da luz que excitam a SPW nos demais materiais do



arranjo. A qualidade da resposta do transdutor depende desse substrato óptico associado [13]

A segunda camada deve ser um filme metálico fino de espessura ( $d_2$ ) nanométrica. É conhecido que os metais têm constante dielétrica complexa e com alta dependência com o comprimento de onda  $\lambda$  do feixe de luz  $\varepsilon_2(\lambda) = \varepsilon'(\lambda) + j\varepsilon''(\lambda)$  quando comparada à dependência de outros materiais. Os metais nos quais ocorrem a SPW com maior energia são aqueles que têm constante dielétrica com a parte real negativa e maior, em módulo, do que a sua parte imaginária ( $|\varepsilon'| > \varepsilon''$ ). De acordo com esses critérios os metais que propiciam melhor ressonância de plámons de superfície são o ouro, a prata, o cobre, o alumínio [14, 15] e o chumbo.

Sobre o filme metálico deve haver um meio dielétrico, pois em uma interface deste tipo pode ser observada uma quantidade de elétrons livres grande o suficiente para gerar uma SPW ao serem excitados por uma fonte de luz. Por depender da quantidade de elétrons livres na interface, a onda de plámons de superfície tem maior intensidade na interface, propaga-se ao longo da superfície e perde intensidade exponencialmente ao penetrar em qualquer dos materiais. Desse modo, a SPW é sensível apenas a algumas centenas de nanômetros distante da interface para ambos os lados, sendo mais sensível quanto maior a proximidade da interface metal-dielétrico.

Para que o SPR possa ser utilizado como método de transdução da informação biológica, o meio dielétrico deve compor duas camadas do arranjo. São elas uma fina membrana de reconhecimento com constante dielétrica ( $\varepsilon_3$ ) e espessura ( $d_3$ ) e uma solução aquosa com constante dielétrica ( $\varepsilon_4$ ) conhecida. Desse modo, qualquer variação na membrana de reconhecimento influenciará a SPW mesmo que  $\varepsilon_4$  não varie. Como a onda de plámons de superfície recebe energia do feixe de luz, variações na SPW implicam em variações na perda de energia sofrida pelo feixe de luz refletido.

Ao fornecer essa energia o feixe de luz é refletido com menor energia. Essa perda de energia é observada como uma região escura no feixe de luz, esta carrega uma assinatura da SPW. Assim, monitorando a região escura do feixe refletido, é possível identificar a presença e a concentração de uma substância alvo qualquer que interaja com a camada de reconhecimento. Um esquema do bio-transdutor pode ser visto na Figura 2.2.

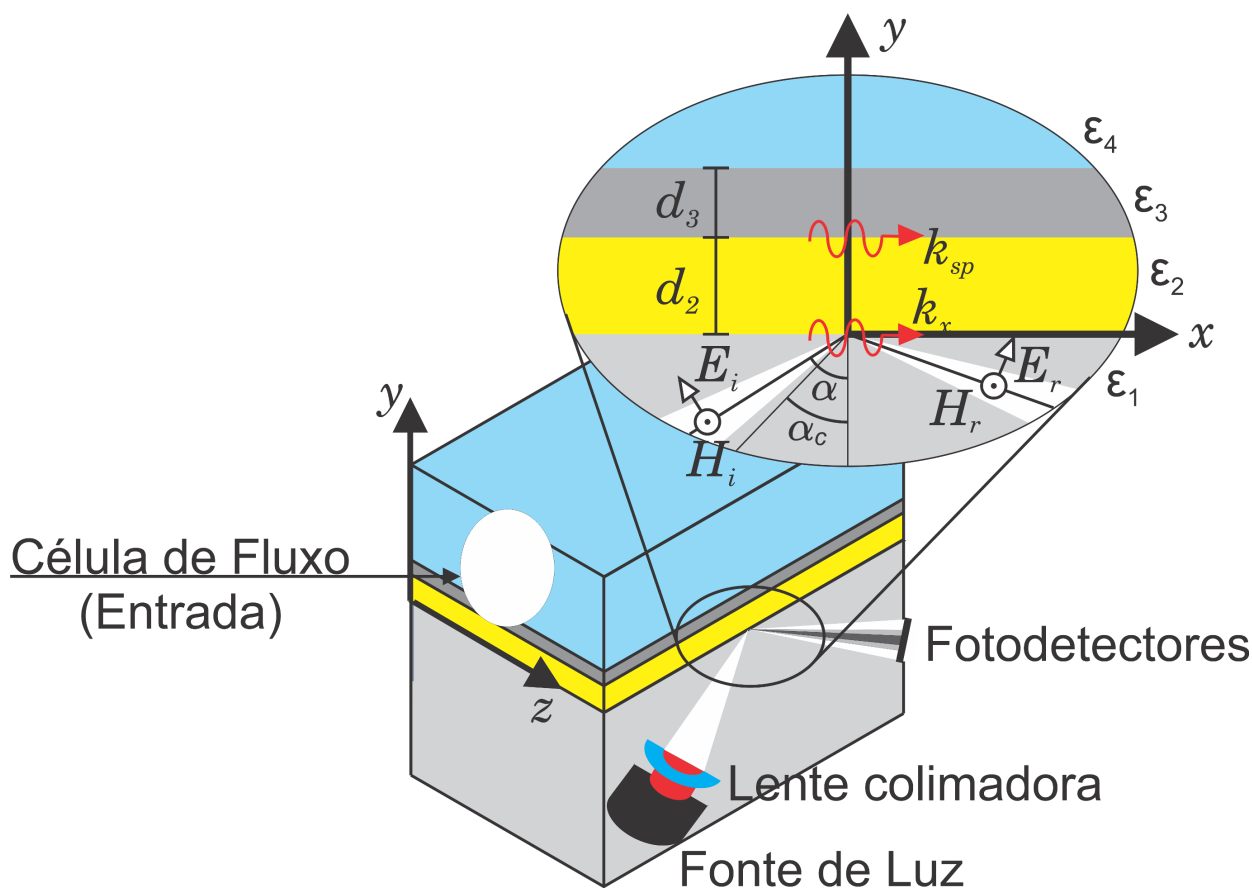


Figura 2.2: Esquema representativo de um transdutor SPR com ênfase na ressonância de plasmon de superfície.

### 2.1.1 Apresentação matemática

A interação luz-matéria, que excita a onda de plásmons de superfície, é um fenômeno quântico, estudado pela plasmônica. Contudo, a instrumentação do transdutor é preparada para monitorar a luz refletida, de modo que a óptica clássica é suficiente para descrever a ressonância observada.

Como se trata de uma onda eletromagnética, o comportamento da luz pode ser analisado por meio das equações de Maxwell:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \rho \quad (\text{Lei de Gauss}) \quad (2.1)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (\text{Lei magnética de Gauss}) \quad (2.2)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{J} \quad (\text{Lei de Ampère}) \quad (2.3)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (\text{Lei de Faraday-Neumann-Lenz}) \quad (2.4)$$

Assumindo ausência de fontes e que para esses materiais como lineares, homogêneos e isotrópicos, valem  $\vec{D} = \varepsilon \vec{E}$ ,  $\vec{J} = \sigma \vec{E}$  e  $\vec{B} = \mu \vec{H}$ , essas equações se tornam

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 \quad (2.5)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{H} = 0 \quad (2.6)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \varepsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \sigma \vec{E} \quad (2.7)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\mu \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \quad (2.8)$$

Aplicando o operador rotacional na equação (2.8), tem-se que:

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) = -\frac{\partial}{\partial t} \mu (\vec{\nabla} \times \vec{H}) \quad (2.9)$$

Aplicando a seguinte identidade vetorial na equação (2.9)

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{V}) = \vec{\nabla} (\vec{\nabla} \cdot \vec{V}) - \vec{\nabla}^2 \vec{V}$$

tem-se que:

$$\vec{\nabla} (\vec{\nabla} \cdot \vec{E}) - \vec{\nabla}^2 \vec{E} = -\frac{\partial}{\partial t} \mu (\vec{\nabla} \times \vec{H}) \quad (2.10)$$

Aplicando as equações (2.5) e (2.7) em (2.10), tem-se que:

$$\begin{aligned} \vec{\nabla}^2 \vec{E} &= \frac{\partial}{\partial t} \mu \left( \varepsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \sigma \vec{E} \right) \\ \vec{\nabla}^2 \vec{E} &= \mu \varepsilon \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} + \mu \sigma \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \end{aligned} \quad (2.11)$$

Esta é a equação de onda do campo elétrico, cuja solução é na seguinte forma

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{j(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r})} \quad (2.12)$$

em que  $\vec{k} = k_x \hat{a}_x + k_y \hat{a}_y + k_z \hat{a}_z$  representa o vetor de onda na posição  $\vec{r} = x \hat{a}_x + y \hat{a}_y + z \hat{a}_z$  e  $\hat{a}_x, \hat{a}_y, \hat{a}_z$  os vetores unitários nas direções  $x, y$  e  $z$  respectivamente.

Sem perda de generalidade pode-se considerar que o feixe de luz se propaga no arranjo no plano  $xy$ , como ilustrado na Figura 2.2, de modo que a  $k_z = 0$  e

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{j\omega t - j(k_x x + k_y y)}, \quad (2.13)$$

esse resultado implica que

$$\frac{\partial \vec{E}}{\partial t} = j\omega \vec{E} \quad (2.14)$$

Substituindo a equação (2.7) na equação (2.9) e utilizando a igualdade em (2.14), obtêm-se a equação que resume as quatro equações de Maxwell em função apenas de  $\vec{E}$ , na forma da equação de Helmholtz:

$$\vec{\nabla} \times \mu_r^{-1} (\vec{\nabla} \times \vec{E}) - k_0^2 \varepsilon_c \vec{E} = 0 \quad (2.15)$$

com

$$k_0^2 = \omega^2 \mu_0 \varepsilon_0$$

e

$$\varepsilon_c \equiv \varepsilon'_r - j \frac{\sigma}{\omega \varepsilon_0}.$$

sendo  $\mu$  a permeabilidade magnética do material,  $\mu_r$  a permeabilidade magnética relativa ( $\mu_r = \mu/\mu_0$ ),  $k_0$  o módulo do vetor de onda no vácuo e  $\varepsilon_c$  a permissividade elétrica complexa do material. Por definição:

$$\varepsilon_c = \varepsilon' - j\varepsilon'' \equiv \varepsilon - \frac{j\sigma}{\omega} \quad \text{e} \quad \varepsilon_r = \varepsilon'_r - j\varepsilon''_r \equiv \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} - \frac{j\sigma}{\omega \varepsilon_0}, \quad (2.16)$$

em que  $\sigma$  é a condutividade elétrica do meio e  $\omega$  a frequência angular da onda.

A equação (2.15) evidencia a dependência do fenômeno da ressonância de plásmos de superfície com a permeabilidade magnética dos materiais envolvidos. Contudo, os materiais mais utilizados na composição do arranjo de camadas apresentam permeabilidade próxima à do vácuo, por isso o modelo matemático do SPR considera  $\mu_r = 1$  [11]. Desse modo, a relação entre índice  $n$  de refração e constante dielétrica  $\varepsilon$  se torna  $n = \sqrt{\varepsilon}$ .

Para uma constante dielétrica complexa ( $\varepsilon_c = \varepsilon' - j\varepsilon''$ ) o índice de refração também deve ser complexo

$$n = \eta - j\kappa, \quad (2.17)$$

sendo  $\eta$  o índice da velocidade de propagação da onda no meio em relação à velocidade no vácuo, e  $\kappa$  o índice da perda de energia por absorção do meio durante a propagação da onda eletromagnética através do material, de modo que:

$$\varepsilon'_r = \eta^2 - \kappa^2 \quad \text{e} \quad \varepsilon''_r = 2\eta\kappa \quad (2.18)$$

ou

$$\eta^2 = \frac{1}{2} \left( \varepsilon'_r + \sqrt{\varepsilon_r'^2 + \varepsilon_r''^2} \right) \quad \text{e} \quad \kappa^2 = \frac{1}{2} \left( -\varepsilon'_r + \sqrt{\varepsilon_r'^2 + \varepsilon_r''^2} \right). \quad (2.19)$$

### 2.1.2 A onda de superfície

Considere um feixe de luz que se propaga em um meio de índice de refração  $n_1$  e incide sobre a interface deste com um segundo meio de índice  $n_2$  com ângulo de incidência  $\alpha$  em relação à normal à interface. Desse modo, parte da energia do feixe deve atravessar a interface sofrendo refração, sendo transmitida com ângulo  $\beta$  em relação à normal, ver Figura 2.3. Esses ângulos estão relacionados entre si e com os meios envolvidos de acordo com a lei de Snell [16]:

$$n_i \sin(\alpha) = n_t \sin(\beta). \quad (2.20)$$

Quanto maior o ângulo  $\alpha$  de incidência, maior também será o ângulo  $\beta$  da luz transmitida através da interface, até um limite no qual  $\beta = 90^\circ$ , implicando que a luz transmitida se propaga paralelamente à superfície, ver Figura 2.3. O ângulo de incidência para o qual isso ocorre é chamada de ângulo crítico  $\alpha_c$ . Quando  $\alpha > \alpha_c$  não há luz transmitida e toda a energia incidente é refletida com o mesmo ângulo em relação à normal.

Quando os meios envolvidos na interface têm constantes dielétricas com sinais opostos na sua parte real, verifica-se uma quantidade de elétrons grande o suficiente para interagir com a luz e absorver parte de sua energia, de modo que a reflexão total pode não ser observada.

Sabendo que o índice de refração de um material pode ser calculado pela razão dos

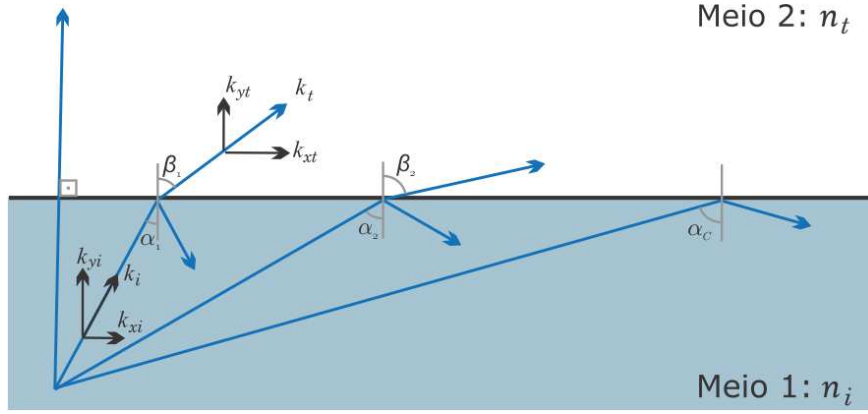


Figura 2.3: Refração da luz com ângulo de incidência  $\alpha$  de um meio com índice  $n_i$  para um de índice  $n_t$

módulos dos vetores de onda da luz nesse material e no vácuo:  $n_i = k_i/k_0$ , pode-se reescrever a lei de Snell de forma:

$$\frac{k_i}{k_0} \sin(\alpha) = \frac{k_t}{k_0} \sin(\beta). \quad (2.21)$$

Considerando, sem perda de generalidade, que a luz se propaga no plano  $xy$  e a interface está em  $y = 0$ , o vetor de onda  $k_i$  pode ser decomposto em  $k_{xi}$  e  $k_{yi}$ , como ilustrado na Figura 2.3, obtendo  $k_i \sin(\alpha) = k_{xi}$  com  $k_i = \sqrt{k_{xi}^2 + k_{yi}^2}$ . Analogamente para  $k_t$ :  $k_t \sin(\beta) = k_{xt}$ . Substituindo esses resultados na equação (2.21) têm-se a igualdade dessas componentes do vetores de onda, que será chamada apenas de  $k_x$ :

$$k_{xi} = k_{xt} = k_x.$$

Sabendo que o vetor de onda é dado por  $k = n \left(\frac{\omega}{c}\right)$ , tem-se:

$$\begin{aligned} k_t^2 &= k_x^2 + k_{yt}^2 = n_t^2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2, \\ k_i^2 \sin^2(\alpha) + k_{yt}^2 &= n_t^2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2, \\ n_i^2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \sin^2(\alpha) + k_{yt}^2 &= n_t^2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \end{aligned} \quad (2.22)$$

e

$$k_{yt}^2 = n_i^2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \left[ \frac{n_t^2}{n_i^2} - \sin^2(\alpha) \right] \quad (2.23)$$

O caso em que  $n_i$  é grande o suficiente para não existir refração da luz implica que  $\sin(\alpha) > n_t/n_i$ , de modo que  $k_{yt}^2$  é negativo. Conseqüentemente,  $k_{yt}$  é puramente imaginário e define-se  $K_{yt} = jk_{yt}$  puramente real. Nesse caso, a equação (2.13) representa uma onda viajante no meio 2 apenas na direção paralela à interface, ou seja,

$$E_t = E_0 e^{-K_{yt}y} e^{j\omega t - jk_x x}. \quad (2.24)$$

Das condições de fronteira na interface, sabe-se que as componentes de campo elétrico e campo magnético na interface devem ser idênticas em ambos os meios:  $E_{xi} = E_{xt}$  e  $H_{xi} = H_{xt}$ , sendo o sub-índice  $i$  utilizado para o campo incidente e o sub-índice  $t$  para o campo transmitido. Associando estas igualdades com as leis de Faraday e Àmpere-Marxwell [11], tem-se que

$$\frac{k_{yi}}{\varepsilon_i} + \frac{k_{yt}}{\varepsilon_t} = 0. \quad (2.25)$$

Substituindo  $k_{yi}$  e  $k_{yt}$  obtidos por meio da equação (2.22) na equação (2.25), a solução do vetor da onda de superfície na direção  $x$  pode ser obtida:

$$k^{\text{sp}} = \frac{\omega}{c} \left( \frac{\varepsilon_i \varepsilon_t}{\varepsilon_i + \varepsilon_t} \right)^{1/2}. \quad (2.26)$$

Já na direção  $y$  o campo magnético varia em intensidade, com  $K_{yt}$  real, o módulo do campo elétrico transmitido é calculado como dependente unicamente de  $y$ :

$$|E_t(y)| = E_0 e^{-K_{yt}y}. \quad (2.27)$$

Essa grandeza, portanto, decai exponencialmente com a penetração da onda no meio. Essa onda viajante na direção do plano e evanescente na direção perpendicular é denominada onda de superfície, por ser encontrada apenas na interface.

É possível calcular a profundidade de penetração da onda no meio 2 utilizando a equação (2.27). Definindo essa profundidade como a distância em que o campo tem intensidade  $E_0/e$ , sendo  $e$  o número de Euler. A profundidade de penetração nos meios 1 e 2 é da ordem de metade do comprimento de onda do feixe de luz e pode ser calculada com  $1/K_{yi}$  e  $1/K_{yt}$ , respectivamente [17]. Na Figura 2.4 está ilustrada a onda de superfície na interface dos

meios metálico e dielétrico. Também está representada na figura a variação da intensidade da onda com a distância da interface.

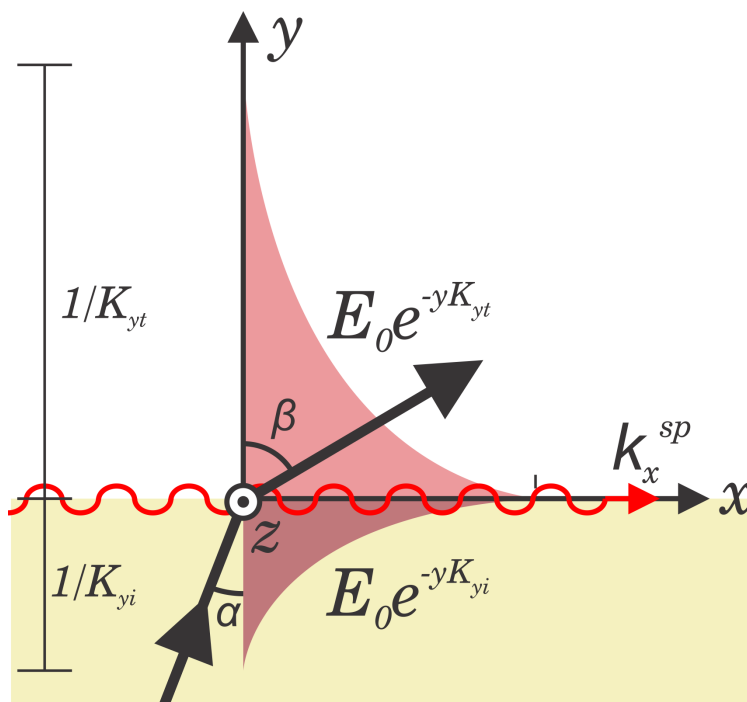


Figura 2.4: Ilustração do campo evanescente gerado durante a ressonância de plásmons de superfície

Essa característica evanescente da SPW garante que ela só seja influenciada por mudanças nas propriedades dielétricas do material na região próxima à interface. Propriedades estas que variam com os materiais utilizados, com o processo de fixação das duas camadas, com suas espessuras e com a temperatura [17, 18].

## 2.2 O transdutor SPR

Devido à característica evanescente da SPW e sua sensibilidade apenas aos meios próximos à interface (algumas centenas de nanômetros), a técnica de transdução SPR tem como ponto crítico a preparação de uma fina membrana como camada de reconhecimento sobre o filme metálico e expô-la à uma solução aquosa na célula de fluxo.

A formação dessa membrana ocorre como resultado de diversas interações físicas e químicas entre as moléculas de uma proteína e a superfície metálica. O processo resultante dessas interações é denominado de adsorção, esse processo acontece dentro da célula de



fluxo do bio-sensor. Um exemplo é a preparação de uma superfície de ouro para análise de um vírus específico. Uma solução com alta concentração da proteína Avidina é bombeada através da célula de fluxo. Devido à afinidade entre ouro e Avidina, a proteína se associa fortemente à superfície. Contudo, a associação permite a existência de lacunas que podem ser preenchidas por substâncias desconhecidas e indesejadas. Para evitá-las uma molécula de tamanho menor é aplicada em uma solução na célula de fluxo após completada a adsorção da Avidina, a albumina bovina (BSA - *Bovine Serum Albumin*) é bastante utilizada. O BSA se associa à camada pré-formada, preenchendo a maior parte das lacunas e reduzindo-as a um número insignificante. Por fim, uma solução com anticorpos é aplicada, permitindo que estes interajam com a membrana de reconhecimento. Na Figura 2.5 está ilustrado esse exemplo de membrana, sendo  $n_{\text{eff}}$  o índice de refração efetivo do meio dielétrico sobre o filme metálico e  $n_2$  o índice de refração complexo do ouro. A ligação antígeno-anticorpo é específica, de modo que apenas na presença daquele antígeno em específico na solução na célula de fluxo pode haver interação de associação do vírus com a membrana e consequente alteração das propriedades da camada dielétrica [18].

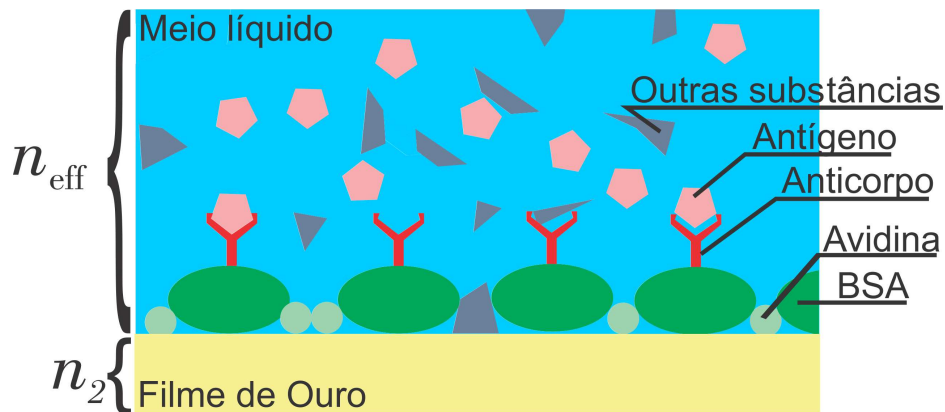


Figura 2.5: Esquema da camada de reconhecimento preparada para detectar uma interação antígeno-anticorpo.

Se a solução contiver a substância para a qual a camada de reconhecimento foi preparada, uma interação irreversível entre as moléculas deve acontecer alterando as propriedades da membrana e consequentemente a SPW e a energia absorvida do feixe de luz incidente.

Contudo, para evitar que variações na solução aquosa alterem a SPW, uma solução de referência deve ser utilizada. Uma solução tampão fosfato-salina (*PBS - Phosphate Buffered Saline*) é normalmente utilizada. Assim, o transdutor deve ser exposto ao PBS antes e depois

da solução analisada, de modo que a variação da SPW para as duas amostras de PBS pode ser comparada. Se substâncias da solução aquosa interagirem fisicamente as ligações são fracas e são reversíveis, a exposição do arranjo ao PBS deve remover essas ligações e nenhuma variação deve ser observada. Já as interações químicas produzem ligações irreversíveis, que não são removidas no processo de lavagem com o PBS. De modo que a variação na SPW para as duas amostras da solução tampão permanece. Bastando ao usuário do transdutor rastrear as variações ocorridas na SPW.

Esse rastreamento, contudo, depende da instrumentação utilizada, o que determina os chamados modos de interrogação do SPR.

### 2.2.1 Modos de interrogação

A variedade de parâmetros do feixe de luz possibilita que a interação com os elétrons da interface metal dielétrica possa ser percebida a partir de qualquer um desses parâmetros. Por esse motivo, a resposta SPR pode ser monitorada de cinco formas diferentes [19]: ângulo de incidência, comprimento de onda, intensidade, fase e polarização. Essas formas são denominadas de modos de interrogação, cada um deles implica em diferentes dispositivos de instrumentação associados e um modo de operação específico do transdutor:

**Modo de interrogação angular** (AIM - *Angular Interrogation Mode*) : neste caso deve-se manter constantes o comprimento de onda, a polarização, a fase e a intensidade da luz emitida sobre o arranjo de camadas e variar seu ângulo de incidência. Ao medir a intensidade da luz refletida para cada um dos ângulos de incidência uma curva de refletância para o transdutor pode ser traçada. O ângulo em que a refletância for mínima implica na maior perda de energia por parte do feixe incidente e conseqüentemente a ressonância de plásmons de superfície.

Inicialmente um aparato mecânico era utilizado para variar o ângulo de incidência. Hoje um elemento de difração óptica [20] é muito usado para este fim. Outra forma simples e prática é o prisma polimérico para aplicação biológica (PPBIO), desenvolvido no laboratório de bio-sensores da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Este prisma pode ser utilizado também para o modo de interrogação de comprimento de onda descrito a seguir.

**Modo de interrogação por comprimento de onda** (WIM - *Wavelength Interrogation Mode*): O feixe de luz incidente deve ser gerado por fonte de luz com uma faixa de valores de comprimento de onda (policromática). Para isso, pode ser utilizada uma fonte halógena ou um diodo de luz branca. Esse feixe deve incidir sobre o arranjo com ângulo, intensidade e polarização constantes. Ao utilizar um espectrômetro como fotodetector é possível montar a curva de refletância do transdutor em função do comprimento de onda da luz incidente. Analogamente ao modo AIM, a condição de ressonância é dada pelo valor de mínimo na curva de refletância.

**Modulação de intensidade** (IM - *Intensity Modulation*): Após interação com a onda de plásmons de superfície, a intensidade luminosa do feixe de luz refletido é mensurada, analisada e comparada com a intensidade incidente.

**Mensuração de fase** (PCM - *Phase Change Measurement*): A interação da luz com os elétrons livres na interface metal/dielétrico, que gera a SPW, produz uma alteração de fase do feixe de luz refletido. Essa mudança de fase pode ser monitorada para identificação da condição de ressonância.

**Mensuração de polarização** (PM - *Polarization Measurement*): Mesmo sabendo que apenas o feixe de luz com polarização transverso-magnética excita a SPW, é possível identificar a condição de ressonância ao utilizar uma fonte de luz com componente transverso-elétrica. Para isso, a polarização da luz refletida deve ser monitorada após a interação com a SPW.

Os modos com maior precisão, e por isso mais utilizados, são o AIM e o WIM. Ambos os modos têm sua sensibilidade alterada com a faixa de comprimento de onda utilizada. Para o modo de interrogação angular, o bio-sensor SPR é mais sensível à variação da espessura e do índice de refração com um menor comprimento de onda da luz incidente. O contrário ocorre para a interrogação espectral em que a sensibilidade aumenta com o aumento do comprimento de onda. [21–23]

### 2.2.2 A condição de ressonância

A ressonância é caracterizada pelo maior transferência possível de energia do feixe de luz para os elétrons livres no meio. É observada quando a componente do vetor de onda do feixe de luz na direção da interface  $\vec{k}_x$  se iguala ao vetor de onda da SPW  $\vec{k}^{SP}$ :

$$\vec{k}_x = \vec{k}^{SP}. \quad (2.28)$$

Como a luz inicialmente se propaga no substrato óptico, incidindo na interface com ângulo  $\alpha$  conhecido, é possível calcular

$$k_x = n_1 \sin(\alpha). \quad (2.29)$$

Aplicando a equação (2.26) na equação (2.29) é pode-se escrever a condição de ressonância para um arranjo com três camadas [24]:

$$n_1 \sin(\alpha) = \frac{\omega}{c} \left( \frac{\varepsilon'_2(\lambda)\varepsilon_{\text{eff}}(\lambda)}{\varepsilon'_2(\lambda) + \varepsilon_{\text{eff}}(\lambda)} \right)^{1/2}, \quad (2.30)$$

sendo  $n_1$  o índice de refração do substrato óptico (meio 1),  $\varepsilon'_2(\lambda)$  é a constante dielétrica do filme metálico (meio 2) para o comprimento de onda  $\lambda$  e  $\varepsilon_{\text{eff}}(\lambda)$  a constante dielétrica do dielétrico (meio 3) para o mesmo comprimento de onda.

O vetor de onda da SPW, equação (2.26), foi calculado considerando apenas dois meios sobre o substrato óptico: o filme metálico e o dielétrico. Contudo, ao utilizar a ressonância de plásmons de superfície como transdutor, tem-se quatro meios envolvidos no arranjo: o substrato óptico (meio 1), o filme metálico (meio 2), a membrana de reconhecimento (meio 3) e a solução aquosa na célula de fluxo (meio 4). Para comparar os dois modelos do arranjo, de três e quatro camadas, serão utilizados o sub-índice 4 para a solução aquosa, o sub-índice 3 para a membrana de reconhecimento (ambas do modelo de 4 camadas) e o sub-índice eff para o meio dielétrico efetivo no modelo de 3 camadas que produz a mesma ressonância do modelo de 4 camadas, para maiores detalhes consulte [20, 25]. Os sub-índices 1 e 2 são utilizados para o substrato óptico e o filme metálico, respectivamente, independente do número de camadas do arranjo.

Assim, a condição de ressonância apresentada na equação (2.30) pode ser utilizada para

calcular o índice de refração do meio dielétrico efetivo resultante de um experimento SPR:

$$n_{\text{eff}} = \sqrt{\frac{\varepsilon'_2(\lambda_R)(n_1 \sin(\alpha_R))^2}{\varepsilon'_2(\lambda_R) - (n_1 \sin(\alpha_R))^2}}, \quad (2.31)$$

sendo  $\alpha_R$  o ângulo com o qual a luz que provoca a ressonância incide sobre o filme metálico e  $\lambda_R$  o comprimento de onda dessa luz. Assim, se os meios do arranjo de camadas forem bem conhecidos, basta encontrar os parâmetros da luz excitante que atendam às condições de ressonância  $\alpha_R$  e  $\lambda_R$  para inferir informações do meio dielétrico desconhecido. A equação (2.31), contudo, se aplica apenas ao modo de interrogação angular. Para o modo de interrogação por comprimento de onda é necessário considerar a influência que o comprimento de onda do feixe de luz exerce sobre os parâmetros dielétricos dos materiais, resultando em:

$$n_{\text{eff}} = \sqrt{\sqrt{\varepsilon'_{\text{eff}}{}^2(\lambda) + \varepsilon''_{\text{eff}}{}^2(\lambda) + \varepsilon'_{\text{eff}}{}^2(\lambda)/2}}, \quad (2.32)$$

sendo:

$$\varepsilon_{\text{eff}} = \frac{(\varepsilon'_2 - 1 + \varepsilon_2''^2)(n_1 \sin(\alpha))^2 + \varepsilon'_2}{(\varepsilon'_2 - n_1^2 \sin^2(\alpha))^2 + \varepsilon_2 i^2} - i \frac{\varepsilon_2'' n_1^4 \sin^4(\alpha)}{(\varepsilon'_2 - n_1^2 \sin^2(\alpha))^2 + \varepsilon_2''^2},$$

por simplicidade foi omitida a dependência da permissividade real e imaginária do meio metálico com o comprimento de onda da luz excitante.

Em qualquer um dos modos de interrogação é possível perceber uma região de menor energia no feixe refletido ao montar a curva de refletância  $R$  do arranjo. Essa curva apresenta a proporção entre o fluxo de irradiação eletromagnética incidente ( $\Phi_i$ ) na superfície e o fluxo refletido ( $\Phi_r$ ). Quando a reflexão se dá em um material homogêneo semi-infinito, que em termos práticos é o caso do SPR, a refletância é igual à refletividade, que pode ser calculada como o quadrado do módulo do coeficiente de refletividade ( $r_p$ ):

$$R = \frac{\Phi_r}{\Phi_i} = |r_p|^2, \quad r_p = \frac{E_r}{E_i}. \quad (2.33)$$

O valor da curva de refletância no qual o valor de mínimo pode ser observado é o valor exato da condição de ressonância, seja  $\alpha_R$  para AIM ou  $\lambda_R$  para WIM. Desse modo, qualquer variação na SPW altera a condição de ressonância do transdutor. Ao rastrear o mínimo da curva ao longo do tempo e aplicando a equação adequada para calcular  $n_{\text{eff}}$ , é possível representar essa variação ao longo do tempo, o que é denominado de sensorgrama [17].

Na Figura 2.6 está ilustrado o sensorgrama esperado para dois experimentos diferentes, sendo o a) que produz apenas ligações reversíveis e o b) que produz ligações irreversíveis. Para cada curva de refletância  $c_k$  obtida, o seu valor de mínimo ( $\alpha_{R,k}$ ) é rastreado e utilizado para calcular o índice de refração efetivo  $n_{\text{eff},k}$  correspondente. No intervalo de tempo inicial ( $t_0 \rightarrow t_1$ ), a célula de fluxo está preenchida de PBS e a curva  $c_1$  é adquirida, com  $\alpha_{R,1}$  e  $n_{\text{eff},1}$ . No instante  $t_1$ , uma solução de proteína é bombeada através da célula de fluxo, a interação com o filme metálico acontece formando a membrana de reconhecimento e variando a curva de reflectância de  $c_1$  para  $c_2$  e estabilizando em  $c_3$  no instante  $t_3$ . No instante  $t_3$  a solução de PBS é novamente bombeada através da célula de fluxo, iniciando o processo de lavagem que remove as ligações reversíveis. No caso a) o sensorgrama volta para o estado inicial depois da lavagem, mas no caso b), devido às ligações irreversíveis, a curva de ressonância estabiliza em  $c_2$ , com mínimo em  $\alpha_{R,2}$  que implica em índice de refração efetivo  $n_{\text{eff},2}$ .

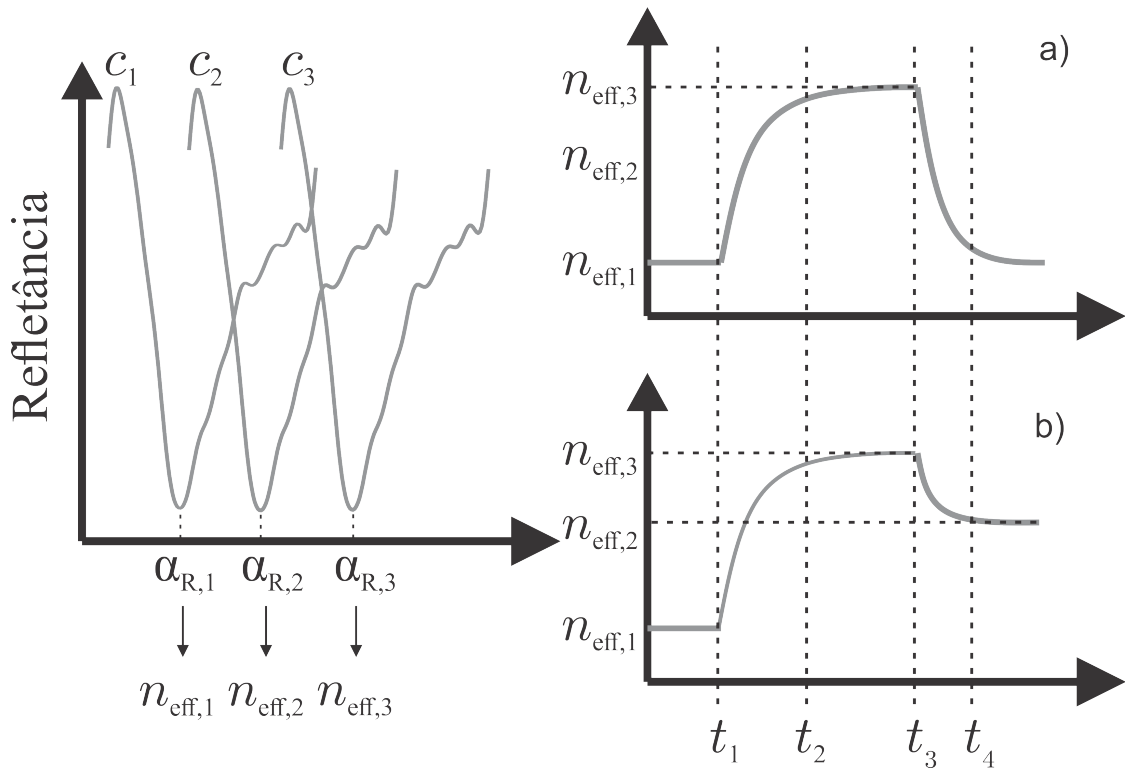


Figura 2.6: Sensorgramas obtidos para curvas SPR em um experimento com a) ligações reversíveis apenas e com b) ligações irreversíveis.

A temperatura influencia cada uma das camadas individualmente, variando as condições de ressonância do arranjo. Tanto as dimensões físicas, devido à dilatação, como as propriedades intrínsecas, como o índice de refração, são influenciadas. Características da

fonte de luz e dos fotosensores também são influenciadas pela variação da temperatura. Efetivamente, para a prata, como camada metálica, o aumento da temperatura provoca um crescimento na largura da curva SPR e varia o ângulo de condição de ressonância em uma taxa de  $-0,05^\circ/\text{C}$  [26]. Isso porque a temperatura influencia principalmente a parte imaginária do índice de refração da camada metálica, que é um indicador da absorção de energia pelo material.

### 2.2.3 Acoplamento óptico

O projeto de um bio-sensor envolve a escolha do modo de interrogação utilizado e a definição de um acoplamento óptico do arranjo de camadas com a fonte de luz e os fotodetectores. O percurso do feixe de luz incidente, sua incidência no arranjo de camadas e a reflexão em direção aos sensores ópticos devem ser ajustados por meio do acoplamento óptico. Nesta subseção são apresentadas soluções disponíveis no Laboratório de Bio-sensores (eBIOS) da UFCG. São soluções de acoplamento óptico para os modos de interrogação angular e de comprimento de onda.

## VIR

Proposto em 2003 pela empresa VIR, o bio-chip tem o mesmo nome da empresa e utiliza elementos difrativos de acoplamento óptico (DOCE - *Diffractive Optical Coupling Elements*). O DOCE é uma grade de difração projetada para que um feixe de luz, com comprimento de onda específico, que incida perpendicularmente ( $\alpha_i = 90^\circ$ ) seja refletido de modo a convergir para um foco  $f$ . Se um feixe divergente, com o mesmo foco, incidir sobre o DOCE, ele é refletido perpendicularmente [20].

Dois DOCEs são posicionados simetricamente opostos à superfície metálica exposta à célula de fluxo, a uma distância horizontal igual à distância horizontal do foco. A fonte de luz emite um feixe sobre uma lente colimadora para que este incida perpendicularmente em um DOCE e seja refletido de forma convergente. Por meio de reflexão total da luz, esse feixe convergente é redirecionado para a superfície metálica onde deve acontecer a ressonância. O feixe refletido é divergente, sofre reflexão total para incidir sobre o DOCE que o reflete como um feixe de retas paralelas perpendiculares para deixar o substrato óptico sem sofrer

reflexão [20]. Um diagrama desse acoplamento pode ser visto na Figura 2.7. A fabricação dos elementos DOCE requer um aparato de nano-tecnologia holográfica para a produção do molde inicial de acordo com o comprimento de onda de projeto, de modo que esse acoplamento óptico se aplica apenas ao modo de interrogação angular .

## Spreeta

Uma forma de acoplamento óptico desenvolvida e instrumentada em 1996 pela *Texas Instruments* (TI), o bio-chip Spreeta também utiliza o modo de interrogação angular.

A TI propôs um encapsulamento denominado *SPREETA™ Evaluation Kit*, no qual um material óptico envolve a fonte de luz, um polarizador da luz, um espelho para direcionamento do feixe de luz e os fotodetectores, de forma a fixar e proteger os componentes de forma adequada. Assim, o SPREETA consiste em uma única peça de  $3\text{ cm} \times 0,7\text{ cm} \times 1,5\text{ cm}$ . Nesse sistema a luz é polarizada e emitida diretamente sobre o arranjo de camadas. O feixe refletido é redirecionado por um espelho para incidir sobre os fotodetectores, ver Figura 2.8.

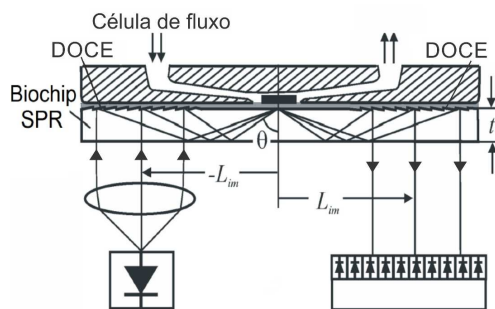


Figura 2.7: Acoplamento óptico do transdutor VIR.

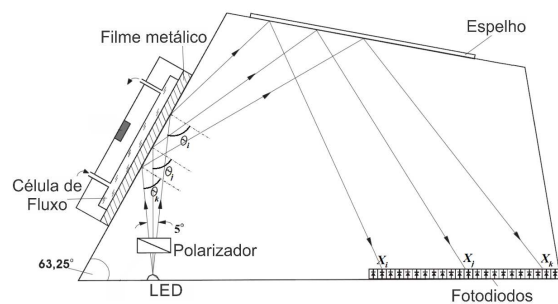


Figura 2.8: Acoplamento óptico do transdutor SPREETA.

Nessa configuração o usuário tem acesso apenas à camada metálica, sobre a qual deve ocorrer deposição de material biológico, e aos terminais dos componentes eletrônicos para emissão de sinais de controle e aquisição de dados. Desse modo, o funcionamento do SPREETA é criticamente depende da plataforma de controle e aquisição de dados.

Apesar do benefício do baixo custo e volume, os menores do mercado, este equipamento apresenta sensibilidade considerável a variações de temperatura, o que afeta todos os elementos internos do SPREETA, a posição e a geometria dos componentes, influenciando na



posição de ressonância e, conseqüentemente, o desempenho do bio-sensor.

O kit da TI, hoje produzido pela Sensata, tem um módulo de controle e aquisição de dados que se comunica com um computador por meio da porta serial para que o *software* SPREETA5 possa controlar o equipamento, coletar, processar e apresentar os dados SPR. Contudo esse *software* é antigo e limitado em aplicação, além de subutilizar os recursos da máquina por precisar do *Microsoft Windows 98* para funcionamento. Por isso, os módulos de controle, aquisição e processamento de dados precisaram ser refeitos para melhor aproveitar a tecnologia. O controle é implementado em nível de *hardware* por meio de linguagem de descrição de *hardware* em um arranjo de portas programável em campo (FPGA - *Field Programmable Gate Array*) e a aquisição de dados é realizada por um módulo de aquisição da *National Instruments* para garantir o funcionamento em tempo real [27].

### **Prisma Polimérico para aplicação Biológica - PPBIO**

Proposto em trabalhos desenvolvidos no próprio eBIOS [19, 28] para detecção rápida, o PPBIO tem características de descartabilidade, baixo custo e flexibilidade. O bio-chip PPBIO utiliza um prisma óptico trapezoidal fabricado com o polímero COC TOPAS 5013, usando técnicas de moldagem por injeção. O trapézio é projetado para que um feixe de luz que incida perpendicularmente à base maior seja refletido na peça para incidir sobre o centro do filme metálico. O trapézio é simétrico de modo que a luz refletida segue caminho análogo e deixa a peça formando ângulo reto com a base maior. Para isso, as faces não paralelas devem ser internamente espelhadas. Para melhor compreensão ver diagrama da Figura 2.9.

Esse tipo de acoplamento óptico pode ser utilizado com os modos de interrogação angular e de comprimento de onda. No primeiro caso, o feixe de luz deve incidir na base maior de forma convergente. As superfícies espelhadas garantem o posicionamento correto do foco. Câmeras de fotodiodos podem ser utilizadas na captação da luz refletida. No segundo caso, lentes cilíndricas externas devem ser acrescentadas para garantir um ângulo reto do feixe de luz com a base do trapézio, para que a mudança de meios não cause reflexão da luz. Um espectrômetro deve ser utilizado na detecção da luz.

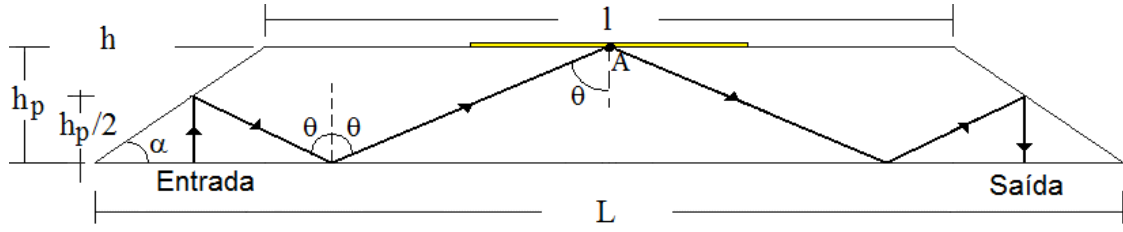


Figura 2.9: Acoplamento óptico do transdutor PPBIO.

## 2.3 Modelos matemáticos para refletância

O estudo teórico do SPR é realizado por meio de modelos matemáticos capazes de calcular os resultados de refletância para um determinado arranjo de camadas. Um modelo muito utilizado para análise da ressonância de plásmons de superfície é dado pelas equações de Fresnel.

### 2.3.1 Equações de Fresnel

Em 1821, Fresnel calculou os coeficientes de refletividade ( $r$ ) e transmissão ( $t$ ) de uma luz ao atingir uma interface entre dois meios tanto com polarização perpendicular (transverso-elétrica - TE) quanto com polarização paralela (transverso-magnética - TM) ao plano da interface. Neste texto apenas as equações para a polarização TM são descritas, pois apenas essa polarização da luz produz a ressonância.

O coeficiente de refletividade quantifica quanto da luz incidente foi refletida. Para a luz TM polarizada, é calculado como a razão da intensidade do campo elétrico refletido  $E_r$  e a intensidade do campo elétrico incidente  $E_i$ . Fresnel mostrou que esse coeficiente pode ser calculado se forem conhecidos os ângulos de incidência ( $\alpha$ ) e transmissão ( $\beta$ ) da luz:

$$r_p = \frac{E_r}{E_i} = |r_p|e^{j\phi} = \left| \frac{\operatorname{tg}(\alpha - \beta)}{\operatorname{tg}(\alpha + \beta)} \right| e^{j\phi} \quad (2.34)$$

O coeficiente de transmissão quantifica quanto da luz foi transmitida para o outro meio da interface. Para a luz TM polarizada é calculado como a razão da intensidade do campo elétrico transmitido ( $E_t$ ) e a intensidade do campo elétrico incidente ( $E_i$ ). Utilizando as equações de Fresnel, esse coeficiente também pode ser calculado utilizando os ângulos de

incidência e transmissão da luz;

$$t_p = \frac{E_t}{E_i} = |t_p|e^{j\phi} = \left| \frac{2 \sin(\alpha) \cos(\beta)}{\sin(\alpha + \beta) \cos(\alpha - \beta)} \right| e^{j\phi}, \quad (2.35)$$

A variável  $\phi$  representa a mudança de fase que ocorre entre o campo incidente e o campo refletido. Contudo, a mudança de fase da luz não é importante para os modo de interrogação angular e de comprimento de onda, por isso o cálculo dessa variável foi omitido.

A grandeza de interesse no estudo do efeito SPR é a refletância, definida na equação (2.33) como a razão do fluxo luminoso refletido e o incidente, podendo ser calculada como o quadrado do módulo do coeficiente de refletividade. Para indicar que esse resultado é válido para uma luz monocromática de comprimento de onda  $\lambda$ , a equação (2.33) foi reescrita com o sub-índice  $m$ :

$$R_{m,\lambda}(\alpha) = |r_p(\alpha)|^2. \quad (2.36)$$

Contudo, ao se tratar de um arranjo de camadas, existem algumas interfaces que propiciam reflexão e transmissão da luz. Um único feixe que é transmitido para o segundo meio, por exemplo sofre reflexão ao atingir a interface com o terceiro meio e retorna à primeira interface, sendo transmitido de volta para o meio original e refletido de volta para o segundo meio onde sofrerá mais reflexões e transmissões, gerando inúmeras componentes com menor energia. Assim, o feixe de luz refletido pelo arranjo, é formado por inúmeras componentes refletidas do meio 1 e outras componentes transmitidas do meio 2. O mesmo pode ser observado para o feixe transmitido pelo arranjo, no meio 4, é formado por componentes dos feixes refletidos e transmitidos nos meios anteriores. Essas reflexões e refrações estão ilustradas na Figura 2.10.

As pequenas espessuras das camadas 2 e 3, muito menores que o comprimento de onda, garantem que a diferença de posição de cada componente seja desprezível perante o tamanho dos sensores ópticos. Por isso o modelo matemático precisa contemplar o caso multi-camada [17].

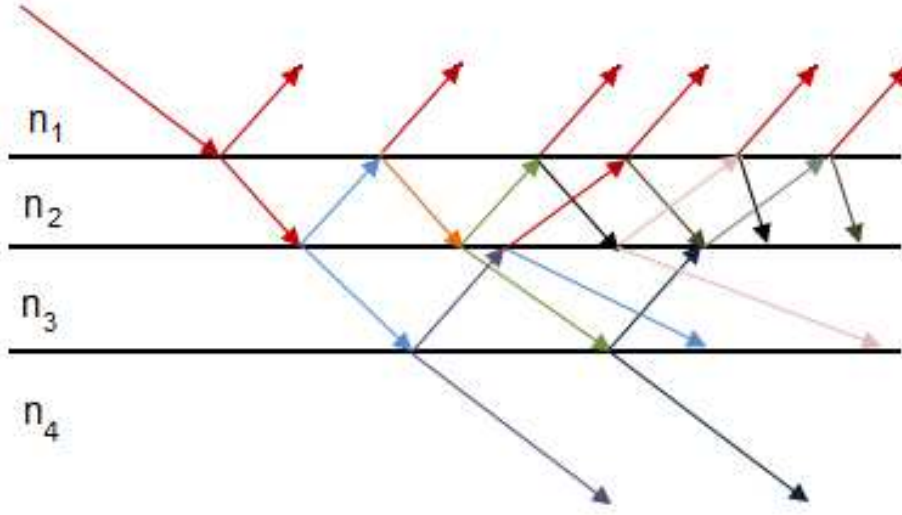


Figura 2.10: Ilustração dos fenômenos de reflexão e transmissão de um feixe de luz em um arranjo de quatro camadas.

### O modelo multi-camada

O sistema de equações de Fresnel permite o cálculo dos coeficientes de reflexão e refração de uma onda óptica incidente, com ângulo de incidência conhecido, em um sistema com  $N$  camadas de diferentes materiais, ou seja,  $N - 1$  interfaces. Têm sido utilizado para analisar as características e a excitação óptica da ressonância de plásmons de superfície [17, 24].

É possível calcular os coeficientes de reflexão e refração aplicando repetidamente as equações de Fresnel. O coeficiente de reflexão para um arranjo de  $N$  camadas com constante dielétrica  $\varepsilon_i$  e espessura  $d_i$ , sendo  $i = 1, 2, \dots, N$ , é dado por:

$$r_p = \frac{\left(M_{11} + M_{12} \frac{k_{y,N}}{\varepsilon_N}\right) \frac{k_{y,1}}{\varepsilon_1} - \left(M_{21} + M_{22} \frac{k_{y,N}}{\varepsilon_N}\right)}{\left(M_{11} + M_{12} \frac{k_{y,N}}{\varepsilon_N}\right) \frac{k_{y,1}}{\varepsilon_1} + \left(M_{21} + M_{22} \frac{k_{y,N}}{\varepsilon_N}\right)}, \quad (2.37)$$

sendo  $M_{jk}$  os termos da linha  $j$  e coluna  $k$  de uma matriz de transferência  $\mathbf{M}$  que depende das características das camadas internas do arranjo de camadas  $i = 2, 3, \dots, N - 1$ :

$$\mathbf{M} = \mathbf{M}_2 \cdot \mathbf{M}_3 \cdot \dots \cdot \mathbf{M}_{N-1} \quad (2.38)$$

sendo

$$\mathbf{M}_i = \begin{bmatrix} \cos(k_{y,i} d_i) & \frac{-j\varepsilon_i}{k_{y,i}} \sin(k_{y,i} d_i) \\ \frac{-jk_{y,i}}{\varepsilon_i} \sin(k_{y,i} d_i) & \cos(k_{y,i} d_i) \end{bmatrix}. \quad (2.39)$$

Com  $k_{y,i}$  expresso de modo análogo à equação (2.23)

$$k_{y,i} = n_1 \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\left(\frac{n_i^2}{n_1^2} - \sin^2(\alpha)\right)} \quad (2.40)$$

O vetor de onda  $k_{y,i}$  depende do ângulo  $\alpha$ , do comprimento de onda  $\lambda$  e do índice de refração  $n_i$ . A matriz transferência  $\mathbf{M}$  depende das espessuras  $d_i$ , portanto  $r_p$  é função de  $\alpha$ ,  $\lambda$ ,  $n_i(\lambda)$  e  $d_i$ , com  $i = 1, 2, \dots, N$ .

A refletância para o caso multi-camada também é calculada por meio equação (2.33).

### 2.3.2 O modelo de Fresnel modificado

O modelo de Fresnel tem limitações em seu uso, como as degenerações descritas por Phelps (1996) [29] e de Bruijn (1991) [25]. Uma forte limitação do modelo é considerar que a luz excitante do fenômeno possui um único comprimento de onda, como é exigido pelo modo de interrogação angular. Os filtros luminosos normalmente utilizados são precisos o suficiente para que componentes de comprimento de onda diferentes do valor de projeto sejam desconsideradas. Contudo, para soluções de bio-transdutor de baixo custo, como o SPREETA, esses filtros não são aplicados, de modo que, mesmo utilizando o modo de interrogação angular, o feixe de luz que excita o fenômeno não é monocromático. Para considerar as componentes do espectro luminoso, deve ser utilizado o modelo desenvolvido por Meléndez [30], que, neste trabalho, foi denominado de Fresnel modificado.

Para considerar os diferentes comprimentos de onda que compõem o feixe de luz que excita o SPR no cálculo da refletância, recorre-se à própria definição de refletância espectral como a razão entre os fluxos de irradiação eletromagnética no comprimento de onda  $\lambda$  incidente ( $\Phi_{i,\lambda}$ ) e refletida ( $\Phi_{r,\lambda}$ ) na interface metal/dielétrico:

$$R_{m,\lambda} = \frac{\Phi_{i,\lambda}}{\Phi_{r,\lambda}}, \quad \text{com} \quad \Phi_\lambda = \frac{\partial \Phi}{\partial \lambda}. \quad (2.41)$$

Assumindo, assim, um comportamento linear da refletância com relação ao comprimento de onda, é possível calcular a refletância resultante como a sobreposição das refletâncias individuais de cada comprimento de onda ponderadas pela intensidade  $\rho(\lambda)$  da luz no com-

primento de onda  $\lambda$  :

$$R_p^{[\lambda_I, \lambda_F]} = \frac{\int_{\lambda_I}^{\lambda_F} R_{m, \lambda} \rho(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_I}^{\lambda_F} \rho(\lambda) d\lambda}, \quad (2.42)$$

sendo  $R_p$  a refletância policromática na faixa de comprimentos de onda de  $\lambda_I$  a  $\lambda_F$  e  $R_{m, \lambda}$  a refletância monocromática devido a um comprimento de onda  $\lambda$ .

Como o meio sobre o qual a luz incide é homogêneo e semi-infinito, tem-se que a refletividade e a refletância se confundem, portanto  $R_m$  pode ser calculada como o quadrado do módulo do coeficiente de refletividade e, formalmente [30]:

$$R_p(\alpha, \lambda, n_1, d_1, \dots, \rho(\lambda)) = \frac{\int_{\lambda_I}^{\lambda_F} R_m(\alpha, \lambda, n_1(\lambda), d_1, \dots) \rho(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_I}^{\lambda_F} \rho(\lambda) d\lambda}, \quad (2.43)$$

em que  $N$  representa o número de camadas do arranjo, iniciando do prisma (meio 1) até o meio externo (meio  $N$ ),  $\lambda_I$  e  $\lambda_F$  sendo os limites inicial e final da faixa de comprimentos de onda considerados no espalhamento espectral da luz e  $\rho(\lambda)$  a intensidade do feixe de luz para cada comprimento de onda  $\lambda$  da luz excitante do SPR. Normalmente  $\rho(\lambda)$  pode ser aproximada por uma distribuição gaussiana. É importante ressaltar que os índices de refração dos metais variam com o comprimento de onda do feixe de luz que se propaga no meio. Na literatura está disponível dados experimentais dessa variação para o ouro e a prata [31], esses são os metais mais utilizados, pois neles o espectro de luz visível é suficiente para que ocorra o SPR [32].

O processo de formação da camada metálica é relativamente preciso, de modo que a camada pode ser considerada regular e com espessura conhecida. Já a membrana de reconhecimento tem um processo de formação não controlado e, para efeitos práticos, aleatório. Por isso é necessário conhecer o processo de adsorção por meio do qual essa membrana é formada.

## 2.4 Cobertura da camada e processo de adsorção em superfície

O processo de adsorção em uma superfície é o resultado de diversos processos físicos e químicos de interação das moléculas de uma solução aquosa entre si e com a superfície resultando em uma aderência das moléculas à superfície. O processo de adsorção em superfícies é descrito por Nakanishi [33] como um processo complicado, apesar de comum. Essa afirmação foi reiterada uma década depois por Rabe [2].

É por meio desse processo que a membrana de reconhecimento é formada sobre o filme metálico do arranjo. Para isso é necessário que a substância da membrana tenha afinidade com as partículas metálicas. Em uma aplicação de transdução SPR são utilizadas soluções com substâncias que têm afinidade apenas com o metal, com pouca ou nenhuma interação de adsorção entre si, de modo que não há empilhamento de moléculas e uma única camada é formada, denominada monocamada.

A formação da monocamada não acontece de forma ordenada, o que gera lacunas com espaço insuficiente para uma nova molécula, de modo a não serem preenchidas. Também ocorrem processos de deformação da molécula em contato com superfícies, interações elétricas, rotação, dessorção, entre outros processos que influenciam na camada resultante. Alguns desses processos estão apresentados na Figura 2.11a-b.

Assim, a camada formada não é homogênea, uniforme, nem regular como ilustrado na Figura 2.11c-d. De modo que sua espessura não é bem definida. Para melhor caracterizar essa membrana, é utilizado o conceito de cobertura da superfície, que quantifica a fração da superfície disponível para adsorção (absorvente) ocupada com o material a ser adsorvido (absorbato):

$$\Theta = \frac{\text{região ocupada}}{\text{região disponível}} = \frac{V_a}{V_m} = \frac{m_a}{m_m}, \quad (2.44)$$

sendo  $V_a$  o volume do absorbato aderido,  $V_m$  o volume máximo de absorbato em uma monocamada,  $m_a$  o número de moles aderidos e  $m_m$  o número máximo de moles do absorbato em uma monocamada. Sendo  $\Theta = 0$  quando não há formação de camada e  $\Theta = 1$  para o caso ideal em que toda a camada metálica é coberta.

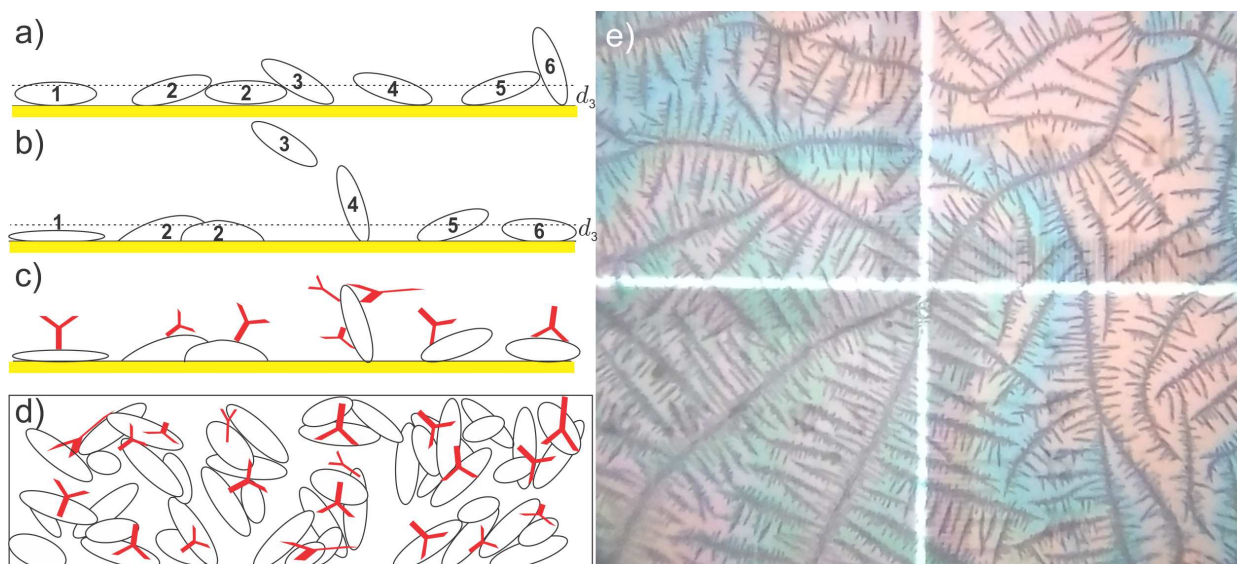


Figura 2.11: Representação da cobertura não homogênea da camada de reconhecimento do transdutor SPR (a) vista lateral das moléculas recém adsorvidas; (b) representação de alguns fenômenos de deformação da camada, sendo 1- pequena deformação, 2- deformação, 3- desorção, 4- rotação, 5- sem variação; (c) vista lateral após deposição de anticorpos; (d) vista superior após deposição de anticorpos (e) imagem microscópica de uma camada não-homogênea de albumina bovina.

Principalmente para as proteínas classificadas como *soft* por sofrerem grande deformação em contato com superfícies [33] a informação de cobertura é mais significativa, pois nem o conhecimento prévio do formato da molécula auxilia na determinação da espessura da camada. As proteínas utilizadas a parte experimental desse trabalho, neutravidina, albumina bovina e hemoglobina são do tipo *soft*.

Contemplar cada um dos fatores que influenciam o processo de adsorção aumenta a complexidade de um modelo matemático para a cinética de adsorção. Como o objetivo desse trabalho não é o estudo da cinética de adsorção em si, apenas modelos mais simples foram utilizados e serão apresentados a seguir.

### Isoterma de Langmuir

A descrição mais simples do processo de adsorção em monocamada é a isoterma de Langmuir [34], que considera as moléculas como esféricas que sofrem apenas adsorção ou desorção quando em contato com uma superfície. Não há consenso entre os pesquisadores de uma isoterma ideal para a adsorção, de modo que a isoterma de Langmuir foi escolhido



por sua simplicidade matemática. A isoterma de Langmuir considera que há uma adsorção das moléculas dependendo da cobertura da camada ( $\Theta$ ), da concentração da solução ( $c_S$ ) e de uma constante de formação da camada ( $k^{on}$ ):

$$\frac{d\Theta}{dt} = k^{on}c_S [1 - \Theta(t)] \quad (2.45)$$

A isoterma também considera que durante a formação da camada algumas moléculas já aderidas são perdidas, o que se denomina dessorção. Essa perda depende apenas da camada já formada ( $\Theta$ ) e de uma constante de perda ( $k^{off}$ ):

$$\frac{d\Theta}{dt} = -k^{off}\Theta(t). \quad (2.46)$$

Assim, a camada é formada como resultado da combinação dos processos de adsorção, equação (2.45), e dessorção, (2.46), resultando em:

$$\frac{d\Theta}{dt} = k^{on}c_S [1 - \Theta(t)] - k^{off}\Theta(t) \quad (2.47)$$

As constantes da isoterma podem ser escritas como funções da cobertura para considerar outros processos internos além de adsorção e dessorção na formação da camada:

$$k^{on,off} = f(\Theta) \quad (2.48)$$

O termo  $[1 - \Theta(t)]$  na equação (2.47) representa a redução contínua de regiões disponíveis para adsorção na superfície. Esse termo também pode ser escrito como uma função da cobertura  $\Phi(\Theta)$  para tornar o modelo mais completo. Utilizar essa função de superfície é uma forma eficiente para obter uma isoterma mais precisa para adsorção de proteínas sem elevar significativamente a complexidade do modelo.

O modelo de adsorção sequencial aleatória (*random sequential adsorption* - RSA) é muito utilizado para essa função da cobertura  $\Phi(\Theta)$  [2]. Este considera que uma molécula só adere à camada se não houver sobreposição com uma molécula já aderida. Para esse modelo, a função de superfície disponível  $\Phi^{RSA}(\Theta)$  é calculada por:

$$\Phi^{RSA}(\Theta) = \frac{\left(1 - \frac{\Theta}{\Theta_j}\right)^3}{1 - 0,812 \left(\frac{\Theta}{\Theta_j}\right) + 0,2336 \left(\frac{\Theta}{\Theta_j}\right)^2 + 0,0845 \left(\frac{\Theta}{\Theta_j}\right)^3} \quad (2.49)$$

Os parâmetros da equação são ajustados empiricamente. O valor máximo da atingido pela cobertura ( $\Theta_j$ ), quando há saturação da camada, foi calculada utilizando discos sólidos como modelo das partículas em um mecanismo de simulação da RSA, obtendo  $\Theta_j = 54,7\%$  [2]. Modelos mais precisos podem ser obtidos ao considerar o formato não esférico das moléculas, ao utilizar-se de um modelo de moléculas com outro formato deve-se considerar em que posição ela adere à superfície.

## 2.5 Considerações Gerais

A aplicação da ressonância de plásmons de superfície como técnica de transdução para interações bioquímicas agrega precisão, sensibilidade e seletividade a um bio-sensor sem a necessidade de marcadores. Contudo, esse transdutor é fortemente dependente do processo de adsorção que ocorre no arranjo de camadas para formar a membrana de reconhecimento. Esse processo de adsorção, é complexo [2, 33] e não controlado, por isso precisa ser monitorado para que seja possível avaliar a qualidade da membrana de reconhecimento da qual depende o transdutor.

Esse monitoramento também pode ajudar a: determinar o instante de término da formação da membrana de reconhecimento, de modo a cessar a aplicação de material biológico e reduzir custos; verificar o estado de limpeza do filme metálico antes de seu uso; detectar o envelhecimento da camada metálica do transdutor, entre outras possibilidades.

Contudo, apesar de existirem equações consolidadas para simular a refletância durante a ressonância de plásmons de superfície e inúmeros modelos matemáticos para a adsorção, não há disponível na literatura como associar esses modelos e simular a ressonância ao longo do processo de adsorção e gerar um sensorgrama esperado.

Por esse motivo o estudo descrito neste documento foi iniciado com o desenvolvimento de um modelo para o SPR que contemple camadas irregulares no arranjo, como a cobertura da camada, e como variar esse resultado no tempo para gerar um sensorgrama. Em seguida

esse modelo foi utilizado em um estudo da cobertura que auxiliou no desenvolvimento de um método de mensuração da cobertura da camada metálica em um transdutor SPR.

# Capítulo 3

## Revisão Bibliográfica

São apresentadas aqui revisões dos estudos realizados em cada uma das etapas do modelo proposto para simulação do bio-sensor SPR: transporte de fluidos, adsorção de proteínas, simulações SPR e tratamento dos dados para caracterização da membrana de reconhecimento.

### 3.1 Transporte de fluidos

Devido à quantidade de fluido necessária para detecção por bio-sensor SPR, o transporte de fluidos é estudado por meio de sistemas microfluídicos. A combinação da equação de fluxo convectivo difusivo (ECD) com a equação hidrodinâmica de Navier-Stokes (ENS) é utilizada para tratar esse tipo de sistema. O desenvolvimento temporal, a distribuição espacial da concentração do soluto e o perfil de velocidade de um sistema microfluídico podem ser calculados por meio dessas equações [34].

Contudo, a solução dessas equações não é trivial. A definição das condições iniciais de contorno adiciona grande complexidade ao problema por dependerem dos processos físicos e bioquímicos nas soluções. O sistema se torna ainda mais complexo em casos que envolvem uma região ativa de interação molecular, que é o caso da região sensível em um bio-sensor SPR.

Por isso, os sistemas microfluídicos têm atraído a atenção de pesquisadores por décadas. Vale destacar alguns dos principais resultados que interessam à aplicação em bio-sensores

SPR:

- Em 1984 foi publicado um tratamento matemático para transporte difusivo-convectivo de íons em canais retangulares [35];
- Em 1991 aproximações e conceitos analíticos foram utilizados para quantificar o transporte de soluto em canal de fluxo microfluídico [36];
- Em 1999 o coeficiente de difusão de moléculas foi determinado por meio de um sensor-T, microfluidico, em conjunto com um método óptico de detecção de partículas [37];
- Em 2003 e 2004 investigações experimentais de microfluxo foram realizadas revelando discrepâncias significativas com os resultados numéricos principalmente nas condições de fronteira [38]. Foram avaliados os efeitos de camadas limites, as oscilações de fluxo e movimentações de fluxo, para camadas menores que  $5 \mu m$  o perfil parabólico de fluxo foi validado [39, 40].
- Ainda em 2004 foi divulgada uma solução da ECD para um eletrodo de disco rotativo por meio de séries no domínio do tempo [41].
- Em 2007 foi publicado um método experimental para determinação dos parâmetros de transporte nas proximidades das paredes de um microcanal [42]. O processo convectivo próximo às paredes revelou um perfil de fluxo parabólico com distorções, indicando que uma condição de deslizamento deve ser utilizada para as paredes do microcanal em um modelo numérico [43].
- Em 2009 um método experimental foi publicado para medir a difusão mútua de soluções moleculares em um sistema microfluidico [44].
- Em 2015 foi publicado um método para determinação dos parâmetros de transporte, bem como o monitoramento de interações moleculares. Neste estudo foi proposto um método para avaliar as constantes cinéticas e termodinâmicas de ligações de substâncias (biotina, proteínas globulares, soro humano) na superfície sensível de um biosensor SPR [34].

## 3.2 Adsorção de proteínas

Não há dúvidas que a adsorção de proteínas é um fenômeno comum. Sempre que proteínas entra em contato com superfícies sólidas, muito provavelmente haverá a adsorção [45]. Contudo, é um fenômeno de "alta complexidade" e grande importância[2]. Por esse motivo a adsorção de proteínas vem atraindo a atenção de pesquisadores há mais de um século:

- Em um extenso trabalho publicado em duas partes (1916 e 1918) Langmuir faz um estudo teórico e experimental das propriedades de líquidos e sólidos enfatizando as forças químicas e físicas envolvidas entre as molécula e estuda o formato de grupos de moléculas para a adsorção de líquidos em sólidos [46, 47];
- Em 1918 foi publicado uma teoria de adsorção de gases em superfícies sólidas, neste trabalho Langmuir comprova suas teorias com experimentos de adsorção em vidro, mica, e platina. Os resultados experimentais comprovam a formação de monocamadas em superfícies sólidas [48];
- Em 1932 Langmuir desenvolveu uma teoria para a adsorção de moléculas de gás em uma superfície, essa teoria que considera apenas a adsorção e a desorção das moléculas na superfície é a famosa Isoterma de adsorção de Langmuir [49];
- Em 1937 Langmuir publicou alguns trabalhos comprovando que uma monocamada depositada em um filme produz uma variação perceptível na cor de uma luz incidente, esse resultado foi utilizado para medir a espessura da monocamada [50];
- Ainda em 1937 Langmuir publicou métodos para condicionar uma superfície para adsorção [51];
- Em 1939 os métodos de formação de uma monocamada, bem como sua estrutura e propriedades foram estudadas por Langmuir, contemplando viscosidade, espessura, anisotropia, compressibilidade e insolubilidade [52];
- Em 1980 Leo Vromam et. al. estudou a adsorção de amostras de sangue e explicou, por meio do hoje conhecido Efito Vromam, discrepâncias observadas entre a teoria de Langmuir e os resultados experimentais. Segundo sua teoria as proteínas com maior

mobilidade adsorvem primeiros, mas logo cedem espaço para proteínas com maior afinidade com a superfície. [53]

- Em 1986 Corsel et. al. publicou que a concentração superficial de uma proteína em processo de adsorção varia muito vagarosamente, por isso a concentração superficial pode ser considerada constante. [54]
- Ainda em 1986 Hinrichsen et. al. publicaram um modelo de adsorção que supera muitas das dificuldades do modelo de Langmuir. O modelo de adsorção sequencial aleatória (*Random Sequential Adsorption* - RSA) e versões refinadas são muito populares para descrever adsorção de proteínas [55].
- Em 1989 Lee e Belfort utilizaram medição das forças entre camadas protéicas para explicar a organização molecular durante um processo de adsorção. [56]
- Na década de 90 muitos estudos foram publicados contemplando a organização molecular de monocamadas adsorvidas em superfícies, com foco nas propriedades elétricas das proteínas [57, 58], nas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas da superfície [59–63] e nas mudanças estruturais sofridas pelas moléculas de proteína ao serem adsorvidas em superfícies sólidas [57–65]. Nesta década também foi publicado um modelo de adsorção mais complexo: a troca entre monômeros e dímeros [66].
- Na década seguinte mais modelos de adsorção foram propostos, como o modelo dos aglomerados [67], o modelo da adsorção e reorientação [68], o modelo de múltiplos estados [69], o modelo de três estados [70] e o modelo de rastreamento [71]. Desta década também podem ser encontradas inúmeras contribuições na área de simulação computacional em nível molecular, se destacam as simulações utilizando mecânica quântica [72], dinâmica molecular [73, 74] e simulações de Monte Carlo [75, 76].

### 3.3 Caracterização da membrana de reconhecimento

Caracterizar a camada de reconhecimento, quanto ao seu índice de refração e sua espessura, foi um importante assunto de pesquisa principalmente na década de 90. Foram

desenvolvidas técnicas para caracterizar a camada, mas todas dependiam de duas curvas SPR independentes ou tinha limitações em sua aplicação:

- de Bruijin et. al. (1991) [25] sugeriram a utilização de duas soluções diferentes na camada externa do arranjo para uma mesma camada de reconhecimento. Após formada a membrana de reconhecimento, uma primeira solução deve ser aplicada para obtenção de uma curva SPR. Em seguida, a solução é trocada e uma segunda curva adquirida. Assim, são gerados dois conjuntos de soluções possíveis para os valores de espessura ( $d$ ) e índice de refração ( $n$ ). A intersecção dos conjuntos permite determinar uma resposta única para o problema.

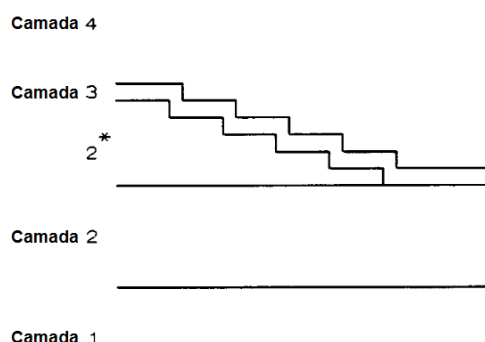


Figura 3.1: Modelo de camadas com o adicional 2\* ao filme metálico com espessura variante, variando  $\epsilon_2$ .

- No mesmo artigo de Bruijin et. al. (1991) [25] também sugerem a variação a espessura do filme metálico presente no arranjo, a camada 2 na Figura 3.1, assim diferentes curvas SPR podem ser geradas e aplicadas na caracterização da camada sensível.
- Phelps e Taylor (1996) [29] relataram o uso de técnicas de minimização por mínimos quadrados (Levenberg-Marquardt, por exemplo) para determinar a permissividade relativa e a espessura da camada por meio da aplicação das equações de Fresnel. Contudo, esse método só funciona para camadas com espessura menor que 2 nm, e dados devem ser adquiridos com precisão de 12-bits com ruído de potência menor que 0,5% da potência do sinal.
- Peterlinz (1996) utilizou feixes luminosos de diferentes comprimentos de onda para excitar o SPR no mesmo arranjo de camadas. A comparação dos resultados resulta



em um único par de espessura e índice de refração que descreve a membrana de reconhecimento [77, 78]. A variação do ângulo de incidência também pode ser aplicada [79].

- Chinowsky, Jung e Yee (1999) [80] propuseram uma técnica de análise linear que permite determinar a espessura da camada sensível com uma razão sinal-ruído ótima (teoricamente). Outros parâmetros de interesse independentes, como o índice de refração também podem ser determinados ao custo de uma redução na relação sinal ruído . Contudo, essa técnica tem como principal limitação sua sensibilidade ao ruído branco com elevada variância e ao ruído colorido [81].
- Chyou et al. (2006) [81] propuseram algumas técnicas de ajuste de curvas que se aplicam melhor para curvas de reflectância simétricas e estreitas, características pouco comuns nessas curvas.

A alta sensibilidade do SPR, evidenciada em vários estudos [21–23, 82–84], acentua as limitações das técnicas apresentadas. Essa sensibilidade também torna necessária uma caracterização precisa da camada. Há um consenso sobre a dificuldade de se determinar esses parâmetros e a utilização de duas fontes de luz com comprimentos de onda distintos [77] é o método mais aceito e utilizado desde então. Contudo, nenhum desses métodos trata da cobertura da camada, variável inerente ao processo de adsorção que forma a camada de reconhecimento.

Esse trabalho apresenta contribuições na caracterização e monitoramento da camada biológica em tempo real durante o processo de adsorção, gerando publicação em 2018 [85].

# Capítulo 4

## Modelos

Neste capítulo são apresentados os modelos desenvolvidos para representar e calcular parâmetros relacionados ao fenômeno da ressonância de plásmons.

### 4.1 Formulação do modelo

Um modelo matemático que representa a ressonância de plásmons de superfície deve ser regido pelas equações de Maxwell. Partindo dessas equações, pode-se assumir que no domínio há ausência de fonte e valem  $\vec{D} = \epsilon\vec{E}$ ,  $\vec{J} = \sigma\vec{E}$ ,  $\vec{B} = \mu\vec{H}$ ,  $\mu = \mu_0$ , assim, as equações de Maxwell são resumidas na forma da equação de Helmholtz apresentada na equação 2.15.

$$\nabla \times (\nabla \times \vec{E}) - k_0^2 \epsilon_r \vec{E} = 0$$

Essa equação rege o domínio no qual ocorre a ressonância de plásmons de superfície..

#### 4.1.1 Geometria

Foi definido um domínio  $V$  para modelar a ressonância de plásmons de superfície acontecendo em um arranjo de quatro camadas com constantes dielétricas  $\epsilon_j$  e espessuras  $d_j$ , com  $j = 1, 2, 3, 4$ . Esse domínio, representado na Figura 4.1, é um bloco retangular limitado pelas superfícies  $S_1$  (base inferior),  $S_2$  (lateral esquerda),  $S_3$  (lateral traseira),  $S_4$  (base

superior),  $S_5$  (lateral direita) e  $S_6$  (lateral dianteira) e contém as superfícies

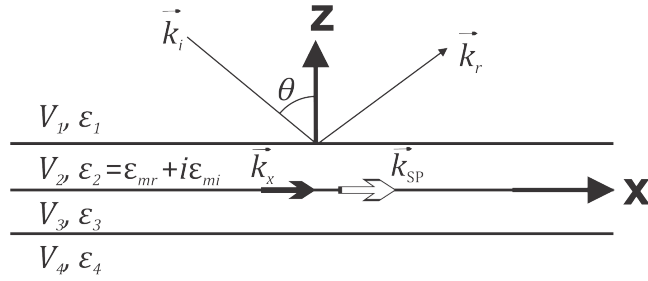
$$S_7 : z = 0, \quad S_8 : z = d_2, \quad \text{e} \quad S_9 : z = d_2 + d_3, \quad (4.1)$$

que delimitam os subdomínios

$$V_1 : z < S_1, \quad V_2 : S_1 < z < S_2, \quad V_3 : S_2 < z < S_3; \quad \text{e} \quad V_4 : S_3 < z, \quad (4.2)$$

sendo o subdomínio  $V_j$  correspondente à camada  $j$  do arranjo modelado.

(a)



(b)

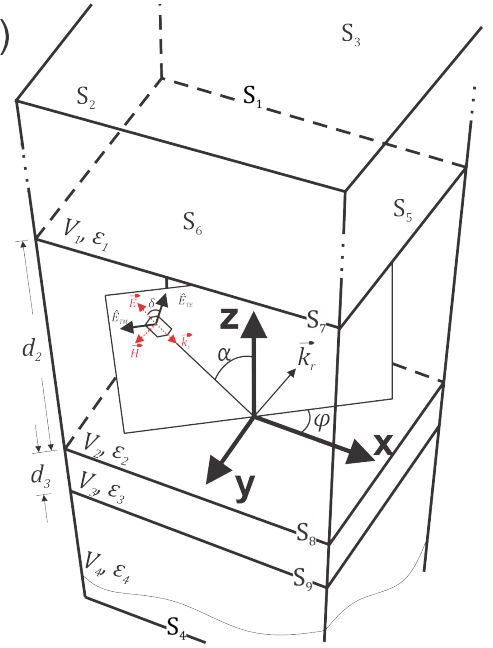


Figura 4.1: Arranjo óptico de quatro camadas para excitação a ressonância de plásmons de superfície (a) e modelo projetado para solução numérica (b). Os vetores de onda, constantes dielétricas, espessura das camadas estão indicadas.

### 4.1.2 Condições de contorno

Através de  $S_1$  incide um feixe de luz com campo elétrico em um ponto  $\vec{P}(x, y, z)$  dado por  $\vec{E}_i(\vec{P})$  definido por

$$\vec{E}_i(\vec{P}) = \hat{E}_i e^{i\vec{k}_i \cdot \vec{P} - i\omega t}, \quad (4.3)$$

sendo o vetor de onda

$$\vec{k}_i = (\phi_i, \beta_i, \gamma_i), \quad (4.4)$$

com

$$\phi_i = n_1 \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\alpha) \cos(\varphi), \quad \beta_i = n_1 \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\alpha) \sin(\varphi), \quad \gamma_i = n_1 \frac{2\pi}{\lambda} \cos(\alpha), \quad (4.5)$$

e  $\hat{E}_i$  o vetor unitário do campo elétrico incidente.

Este último pode ser escrito como a soma de uma componente  $\hat{E}_{TM}$  no plano de incidência e reflexão da luz e uma componente perpendicular  $\hat{E}_{TE}$  paralela à interface  $S_9$ :

$$\hat{E}_i = \hat{E}_{TE} \cos(\delta) + \hat{E}_{TM} \sin(\delta), \quad (4.6)$$

sendo

$$\hat{E}_{TE} = (\sin(\varphi), -\cos(\varphi), 0) \quad (4.7)$$

$$\hat{E}_{TM} = (\cos(\alpha) \sin(\varphi), \cos(\alpha) \cos(\varphi), \sin(\alpha)) \quad (4.8)$$

e  $\delta$  o ângulo de polarização da onda eletromagnética:

- $\delta = 0^\circ \Rightarrow \hat{E}_i = \hat{E}_{TE}$ , ocorre polarização s ou polarização transversa elétrica;
- $\delta = 90^\circ \Rightarrow \hat{E}_i = \hat{E}_{TM}$ , ocorre polarização p ou polarização transversa magnética.

Sabendo que apenas a componente transversa-magnética da luz excita a ressonância de plásmos de superfície, a polarização  $\delta = 90^\circ$  foi escolhida para modelar o SPR. Também é possível determinar, sem perda de generalidade, o plano de propagação da luz como o plano  $xz$ , ou seja  $\phi = 0^\circ$ .

Através de  $S_4$  se propaga a luz refratada do arranjo de camadas:

$$\vec{E}_R(\vec{P}) = \hat{E}_R e^{i\vec{k}_R \cdot \vec{P} - i\omega t}, \quad (4.9)$$

com

$$\vec{k}_R = (\varphi_R, \beta_R, \gamma_R), \quad (4.10)$$

sendo

$$\alpha_R = n_4 \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\alpha), \quad \beta_R = n_4 \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\alpha), \quad \text{e} \quad \gamma_R = n_4 \frac{2\pi}{\lambda} \cos(\alpha). \quad (4.11)$$

O arranjo de camadas no qual ocorre a ressonância costuma ter dimensões da ordem

de milímetros, enquanto algumas de suas camadas têm espessura da ordem de nanômetros. Para contornar essa diferença de dimensões, apenas uma seção nanométrica do comprimento, ao longo do eixo  $x$ , é modelado. Assumindo que a ressonância ocorre de forma similar no resto da peça, a condição de periodicidade de Floquet foi escolhida para as superfícies  $S_2$  e  $S_5$ , assim, o modelo é capaz de representar uma peça muito maior do que os limites do seu domínio.

Usando a periodicidade de Floquet pode-se definir o campo na superfície  $S_5$  em função do campo na superfície  $S_2$ :

$$E_{S_5} = E_{S_2} e^{-i\vec{k} \cdot \vec{d}_{S_2 S_5}} \quad (4.12)$$

sendo  $\vec{d}_{S_2 S_5}$  a diferença entre os vetores posição dos dois planos.

Para as superfícies  $S_3$  e  $S_6$  foi escolhida uma condição que não interfere nas ondas no interior do domínio. Como nenhuma onda eletromagnética incidente, refratada ou refletida deve ser propagar na direção  $y$ , a condição  $\hat{n} \times \vec{H} = 0$  pode ser estabelecida. Sendo  $\hat{n}$  o vetor unitário na direção normal à superfície,  $\hat{n} = (1, 0, 0)$  para  $S_3$  e  $\hat{n} = (-1, 0, 0)$  para  $S_6$ . Essa escolha significa que a largura do modelo tem pouca ou nenhuma influência sobre o resultado calculado.

### 4.1.3 O método de Solução

Dadas a geometria e o conjunto de equações que regem o modelo, é possível calcular os campos elétrico e magnético ao longo de todo o domínio. A complexidade da equação que rege o domínio implica na necessidade de aplicação de métodos numéricos para o cálculo da solução. A escolha correta do método evita erros de resultado e pode reduzir consideravelmente o tempo de cálculo.

Os principais métodos numéricos aplicados ao eletromagnetismo são basicamente três: O método dos momentos (MoM - *Method of Moments*), o método das diferenças finitas no domínio do tempo (FDTD - *Finite-difference time-domain*) e o método dos elementos finitos (FEM - *Finite Element Method*) [86]. O primeiro é bem condicionado para problemas com pequena razão superfície/volume. E o segundo é bem condicionado para superfícies regulares. Como o domínio SPR não se encaixa em nenhuma dessas condições, o método dos elementos finitos foi escolhido.

A escolha do método, contudo, não é o único problema para sua aplicação. Descrever o problema, escolher suas condições de contorno, discretizar o domínio e escolher os métodos de solução, de inversão de matriz têm grande influência sobre o resultado e o tempo de cálculo.

Seis passos são necessários à aplicação do MEF:

- **Discretização:** O domínio do modelo deve ser dividido em uma quantidade finita de elementos. Esses elementos devem ser pequenos o suficiente para que, entre os seus vértices, as equações diferenciais que regem o domínio possam ser escritas como equações de diferença.
- **Equações dos Elementos:** Se os elementos forem definidos corretamente, é possível definir equações, geralmente polinomiais, para aproximar as soluções nestes elementos. Em seguida os coeficientes do polinômio devem ser determinados para que a aproximação seja ótima.
- **Montagem:** Nesse passo as equações devem ser agrupadas, ou montadas, em um sistema para caracterizar o comportamento unificado do sistema inteiro. O conceito de continuidade governa o processo de montagem.
- **Condições de Contorno:** O sistema de equações deve ser ajustado para considerar as condições de contorno do modelo.
- **Solução:** O sistema de equações deve ser resolvido numericamente por métodos iterativos ou diretos.
- **Pós-processamento:** Havendo o interesse, variáveis secundárias devem ser calculadas neste passo final.

O *software* COMSOL Multiphysics <sup>®</sup> foi utilizado para implementação do modelo proposto e aplicação do MEF na sua solução. Desse modo, os passos de gerar as equações dos elementos, agrupá-las em um sistema, adicionar as condições de contorno e calcular a solução são todos realizados pelo *software*. O usuário deve modelar o sistema, configurar a discretização, selecionar o método de solução (iterativo ou direto) e realizar o pós-processamento.

## Discretização

A regra geral para aplicação em sistemas ópticos é o tamanho máximo dos elementos de até um terço do menor comprimento de onda da luz envolvida.

Devido à discrepância de dimensões dos diferentes subdomínios do modelo, uma malha irregular deve ser utilizada. Desse modo, o limite de tamanho dos elementos só é significativo para os subdomínios  $V_1$  e  $V_4$ . Nas regiões em que a ressonância ocorre efetivamente é necessário maior precisão, por isso os elementos dos subdomínios  $V_2$  e  $V_3$  foram escolhidos com tamanho máximo e mínimo de um décimo da espessura do filme metálico e da camada dielétrica respectivamente. Com taxa máxima de crescimento entre elementos vizinhos em 30%.

Essas configurações geram em torno de 30 mil elementos no domínio completo.

## Método de solução

O COMSOL Multiphysics <sup>®</sup> permite que o usuário selecione o método de solução do sistema de equações. Podendo ser uma solução direta, baseada em decomposição LU, ou interativa. A primeira é mais robusta, contudo requer maior memória dinâmica.

Para os métodos diretos as opções disponíveis são *MUltifrontal Massively Parallel sparse direct Solver* (MUMPS), *Parallel Direct Sparse Solver* (PARDISO) e *SParse Object Oriented Linear Equations Solver* (SPOOLES). Todos esses métodos são adequados para o modelo em questão, variando apenas os requisitos de memória e tempo de solução, sendo o SPOOLES mais lento com menor requisito de memória e o PARDISO mais rápido com maior requisito de memória. O método MUMPS foi escolhido por utilizar ser mais adequada para a memória disponível no computador utilizado: um processador *i7* octa-core com 8 Gb de memória RAM, sendo necessários 4 h de processamento.

## Pós-processamento

Os parâmetros de dispersão (*Scattering parameters* ou *S-parameters*) são, por definição, matrizes, dependentes da frequência, que descrevem a transmissão e reflexão de ondas eletromagnéticas. Para baixas frequências os parâmetros S são calculados com base na tensão refletida, mas para o caso de altas frequências estudado o campo elétrico é utilizado. Como

o modelo utilizado consiste em calcular o campo elétrico em todo o domínio, então o cálculo tanto do parâmetro  $S$  que a porta em  $S_2$  exerce sobre ela mesma ( $S_{S_2,S_2}$ ), quanto do parâmetro  $S$  que a porta em  $S_2$  exerce sobre  $S_1$  ( $S_{S_2,S_1}$ ) é realizado por meio de simples integrais numéricas:

$$S_{S_2,S_2} = \frac{\int_{S_2} \left( (\vec{E}_c - \vec{E}_2) \vec{E}_2^* \right) dS_2}{\int_{S_2} \left( \vec{E}_2 \vec{E}_2^* \right) dS_2} \quad S_{S_2,S_1} = \frac{\int_{S_1} \left( \vec{E}_c \vec{E}_1^* \right) dS_1}{\int_{S_1} \left( \vec{E}_1 \vec{E}_1^* \right) dS_1}, \quad (4.13)$$

sendo  $\vec{E}_2$  o campo elétrico definido para a porta em  $S_2$ ,  $\vec{E}_1$  o campo elétrico definido para a porta em  $S_1$ , e  $\vec{E}_c$  o campo elétrico resultante calculado para o contorno de integração.

Assim, definidos  $S_{S_2,S_2}$  e  $S_{S_2,S_1}$ , os coeficientes de interesse são:

$$R = |S_{S_2,S_2}|^2 \quad T = |S_{S_2,S_1}|^2, \quad (4.14)$$

sendo  $R$  a refletância e  $T$  a transmitância.

Já para representar o campo evanescente, basta traçar a curva da intensidade de campo elétrico  $|\vec{E}_c|$  calculado ao longo de uma reta perpendicular às portas passando pelo centro do domínio.

#### 4.1.4 Estudo comparativo

Como processo para verificar a corretude das curvas refletância ( $R$ ) calculadas de do modelo do transdutor baseado no método dos elementos finitos (modelo MEF) foram realizadas comparações ponto a ponto de curvas SPR resultantes do modelo proposto com curvas oriundas do modelo baseado nas equações de Fresnel, considerado como referência. Para isso foram simuladas estruturas cujas camadas são todas perfeitamente lisas e uniformes, já que esta é uma limitação do método utilizado como referência. Diferentes configurações do arranjo de camadas foram simuladas, variando as substâncias do filme metálico, sua espessura, o comprimento de onda da luz incidente e quantidade de camadas.

Foram realizadas simulações para estruturas de três camadas (Figs. 4.2 (a) e (d)), quatro camadas (Figs. 4.2 (b) e (e)) e cinco camadas (Figs. 4.2 (c) e (f)). Na Tabela 4.1 estão apresentados os valores dos parâmetros utilizados nas simulações. Para todas



essas configurações, o erro médio quadrático máximo obtido é menor que  $8,5 \times 10^{-4}$ . Esse resultado é um forte indício da precisão do modelo MEF dada a confiabilidade do modelo Fresnel.

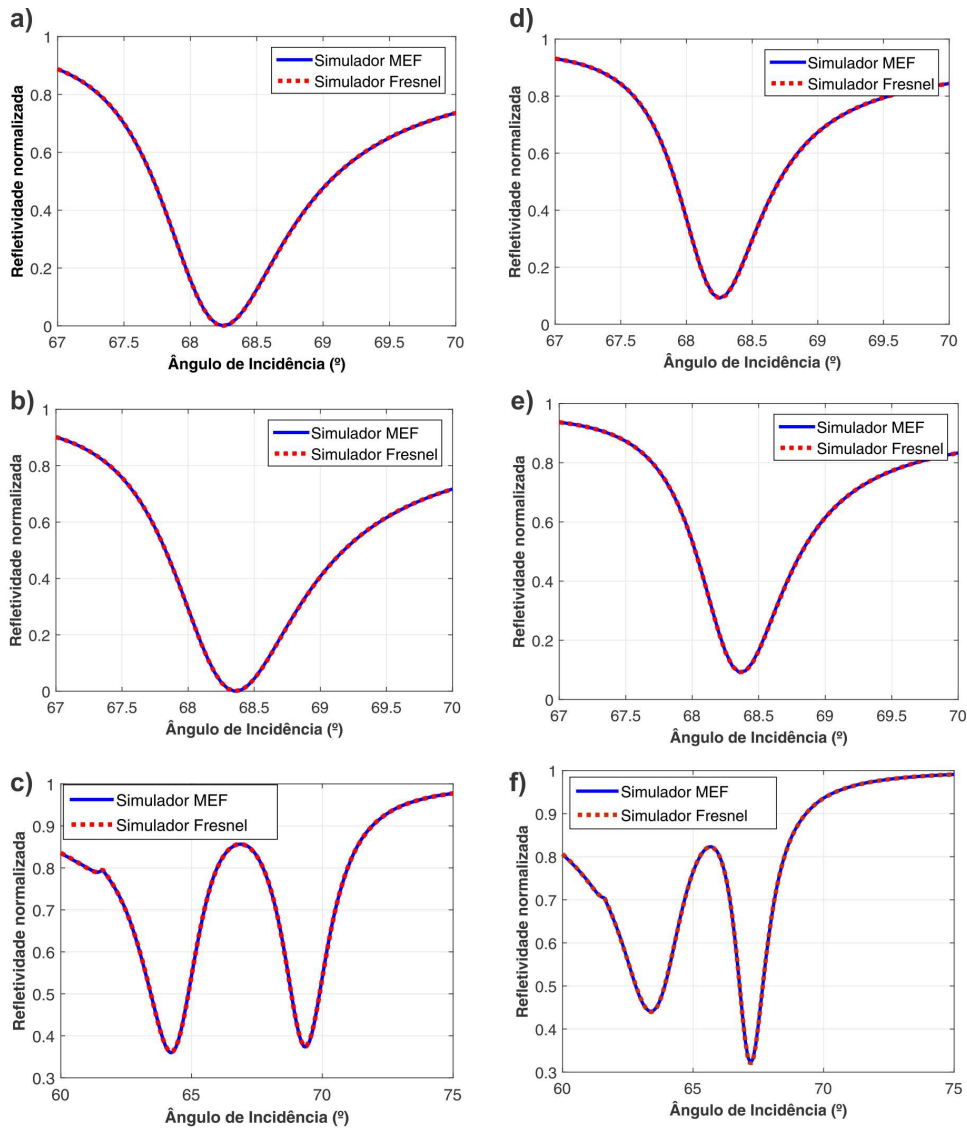


Figura 4.2: Comparação das curvas teóricas de refletância SPR obtidos com as equações de Fresnel e com o modelo proposto. Os parâmetros simulados em cada gráfico estão apresentados na Tabela 4.1.

A complexidade e o tempo de processamento necessários ao uso do modelo MEF não justificam seu uso em casos que podem ser simulados com as equações de Fresnel. Contudo, o modelo proposto tem uma capacidade de modelamento muito maior, podendo abranger casos que o modelo de Fresnel não é capaz. O modelo MEF pode ser aprimorado para re-

Tabela 4.1: Valores dos parâmetros utilizados para gerar as curvas SPR na figura 4.2. As espessuras da primeira e última camadas são irrelevantes por serem muito maior que as demais.

Figura	$\lambda$	Arranjo de camadas
4.2(a)	850 nm	BK7 / ouro (50 nm) / água
4.2(b)	850 nm	BK7 / ouro (50 nm) / PBS (10 nm) / água
4.2(c)	720 nm	BK7 / teflon (410 nm) / ouro (50 nm) / PBS (10 nm) / água
4.2(d)	800 nm	BK7 / prata (60 nm) / água
4.2(e)	800 nm	BK7 / prata (60 nm) / PBS (10 nm) / água
4.2(f)	720 nm	BK7 / teflon (410 nm) / prata (60 nm) / PBS (10 nm) / água

presentar com maior precisão a realidade, como é o caso de representar camadas irregulares. A seção a seguir trata de algumas avaliações do transdutor SPR utilizando o modelo MEF que não poderiam ser realizadas utilizando o modelo Fresnel apresentado.

#### 4.1.5 Aplicação

Explorando a capacidade do MEF em representar geometrias irregulares, é possível aplicar o modelo proposto no estudo da cobertura da camada de reconhecimento.

#### Representação da cobertura de uma camada

A principal aplicação desse método de simulação é a representação de camadas não homogêneas, sendo necessário incluir o conceito de cobertura da camada para serem corretamente caracterizadas.

Para considerar a cobertura da camada, é preciso redefinir a superfície  $S_9$  do modelo para uma superfície  $S_{9*}$  tal que a razão dos volumes original  $V_3$  e o volume redefinido  $V_{3*}$  estejam de acordo com a definição de cobertura dada na equação (2.44):

$$\Theta = \frac{V_{3*}}{V_3}. \quad (4.15)$$

A isoterma de adsorção de Langmuir foi aplicada para calcular a cobertura  $\Theta$  esperada. Redefinindo a superfície  $S_9$  para ser aplicada no modelo proposto é possível determinar a condição de ressonância  $\alpha_R$ .

Para estimar a cobertura da superfície a partir de uma dada curva de refletância  $R$

teórica ou experimental, foi utilizado um resultado publicado pela equipe do laboratório, uma aproximação da cobertura por meio da variação do índice de refração [87]. Seja  $\Delta n_3^{max}$  a maior variação possível de índice de refração entre a ausência de camada dielétrica e a camada ideal com  $\Theta = 1$ , seja também  $\Delta n_3^{exp}$  o desvio real medido experimentalmente. Calcula-se, então, cobertura  $\Theta$  como a razão dos desvios máximo e experimental:

$$\Theta \approx \frac{\Delta n_3^{exp}}{\Delta n_3^{max}}. \quad (4.16)$$

Essa equação foi utilizada como referência para calcular a cobertura  $\Theta^{ref}$  de acordo com  $\alpha_R$ . A comparação da cobertura esperada  $\Theta$  e a cobertura calculada  $\Theta^{ref}$  foi utilizada para validar o modelo. O procedimento de validação consiste em: 1- a concentração da solução  $c_0$ , seu coeficiente de difusão  $D$  e a velocidade de fluxo  $v$  são utilizadas em um modelo de transporte de fluido para calcular a concentração imediatamente sobre a superfície  $c_S$ . 2- a isoterma de Langmuir é utilizada como modelo de adsorção para calcular a cobertura  $\Theta$  da camada de reconhecimento. 3- a superfície  $S_9$  é redefinida de acordo com  $\Theta$ . 4- o modelo MEF proposto é aplicado para determinar o ângulo de ressonância  $\alpha_R$ . O modelo de cobertura de (Laborde, 2013) é aplicado para calcular a cobertura medida  $\Theta^{ref}$ , um fluxograma desse procedimento pode ser visto na Figura 4.3.

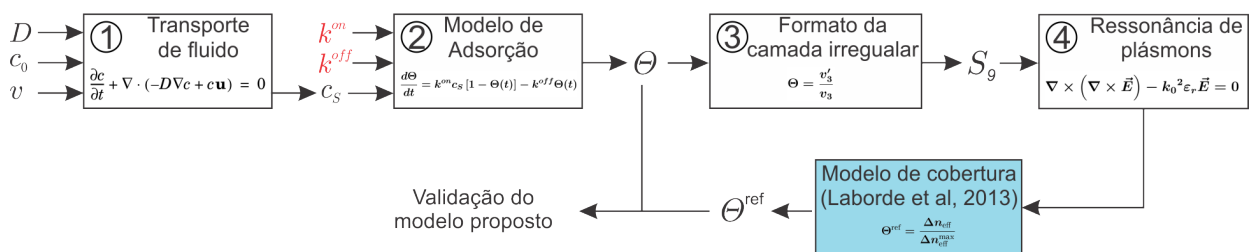


Figura 4.3: Fluxograma do processo de validação do modelo MEF proposto.

Para definir como representar a superfície  $S_9$ , foi realizado um estudo da organização das moléculas de proteína na superfície metálica.

## Organização das moléculas na superfície

Além do modelo utilizado para as moléculas, é importante pensar em sua organização na superfície aderida. A camada de analito pode estar organizada em multicamadas ou em monocamadas. A multicamada ocorre em condições em que a agregação das proteínas

é favorecida ou a repulsão das mesmas é inibida. Já as monocamadas ocorrem quando a atração entre duas proteínas é fraca ou negativa, havendo repulsão. A segunda estrutura é o caso da neutravidina, substância utilizada neste estudo.

A interação de atração, ou repulsão, entre as moléculas também ocorrem lateralmente, influenciando no que se denomina cooperação positiva ou cooperação negativa. A primeira ocorre quando o potencial hidrogeniônico (pH) da solução é igual ao potencial isoeletrico da molécula, resultando em moléculas sem carga elétrica e uma cinética de adsorção observada maior do que a esperada pela teoria de Langmuir. Isso porque as moléculas já adsorvidas no metal facilitam a adsorção de novas moléculas, atraem as moléculas ainda não agregadas para próximo à superfície, mas quando a distância diminui, as forças de repulsão, no caso da monocamada, tornam-se mais significativas e redirecionam a molécula para uma posição lateral [2]. Nesse caso há a ocorrência de agrupamentos de moléculas na superfície, ver Figura 4.4(a).

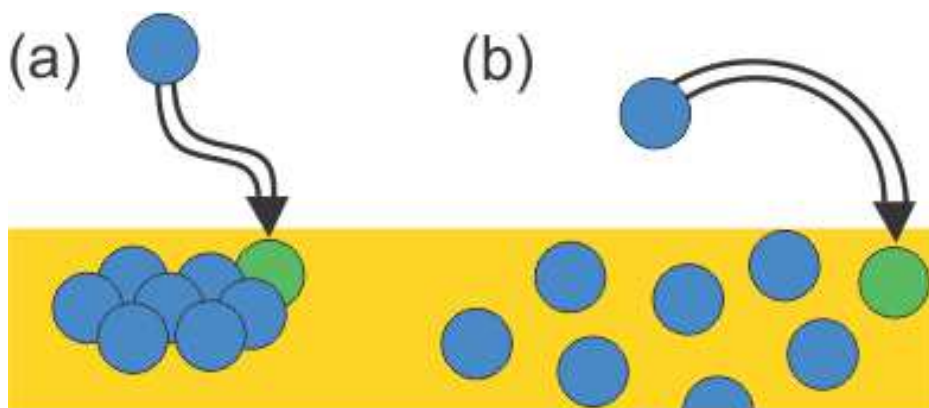


Figura 4.4: Adsorção cooperativa: (a) cooperação positiva, as moléculas já aderidas atraem as demais melhorando a cinética de adsorção; (b) cooperação negativa, as moléculas aderidas repelem as demais, dificultando a cinética de adsorção.

Quando o potencial isoeletrico da molécula é diferente do pH da solução, as moléculas ficam eletricamente carregadas, de modo que as moléculas já aderidas repelem as demais, dificultando a sua adsorção e evitando o agrupamento de moléculas, ver Figura 4.4(b). Quando isso ocorre a cinética de adsorção observada é menor do que a esperada pela teoria de Langmuir. Nos casos em que a isoterma de Langmuir corresponde ao caso observado, pode ter ocorrido uma adsorção não cooperativa. Outra possibilidade é que as interações de cooperação positiva e negativa tenham se equilibrado [2].

Algumas geometrias foram utilizadas para redefinir  $S_9$  para que o volume da membrana de reconhecimento variasse de acordo com a equação (4.15), essas geometrias estão apresentadas na Figura 4.5, sendo  $S_9^i$  e  $S_9^{ii}$  utilizadas para representar uma cobertura resultante de adsorção com cooperação negativa e  $S_9^{iii}$ ,  $S_9^{vi}$ ,  $S_9^v$  e  $S_9^{iv}$  para coberturas resultantes de adsorção com cooperação positiva.

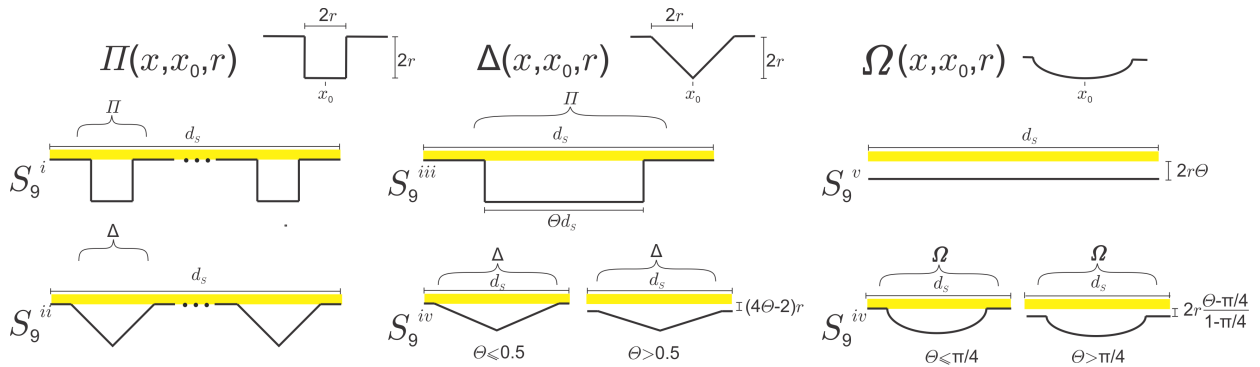


Figura 4.5: Geometrias utilizadas para redefinir a superfície  $S_9$  no modelo MEF proposto. As equações estão apresentadas no apêndice A.

As proteínas utilizadas neste estudo apresentam formato esférico ou elipsoidal, contudo foram utilizados os formatos retangular e triangular por simplicidade de cálculo da cobertura e de discretização do domínio para simulação.

Definidos o procedimento de estimação da cobertura, e as superfícies que simulam os resultados para as duas condições de adsorção, foram feitos experimentos de adsorção com diferentes concentrações ( $c_1 = 0,21 \mu\text{M/L}$  e  $c_2 = 3,3 \mu\text{M/L}$ ) da proteína NeutrAvidina, o protocolo experimental está detalhado no apêndice B.

Nos experimentos com ambas as concentrações da proteína, o processo de adsorção foi monitorado. Em dez diferentes instantes de tempo desse processo de adsorção, a cobertura medida foi utilizada para gerar as superfícies  $S_9^i$  e  $S_9^{ii}$  como cooperação negativa e as superfícies  $S_9^{iii}$  e  $S_9^{iv}$  como cooperação positiva. A variação do índice de refração efetivo foi simulada e a cobertura equivalente calculada considerando as duas organizações moleculares para cada instante  $t_n$  de tempo,  $n = 1, \dots, 10$ . Os resultados das simulações e dos experimentos podem ser observados na Figura 4.6.

Este resultado parece ser um indicativo de que a organização das moléculas como um único aglomerado resultante de uma adsorção com cooperação positiva é o mais próximo da realidade, mas é importante lembrar da simplificação do modelo da molécula de NeutrAvi-

dina, ainda é necessário um estudo para ter dimensão da influência dessa simplificação do modelo molecular.

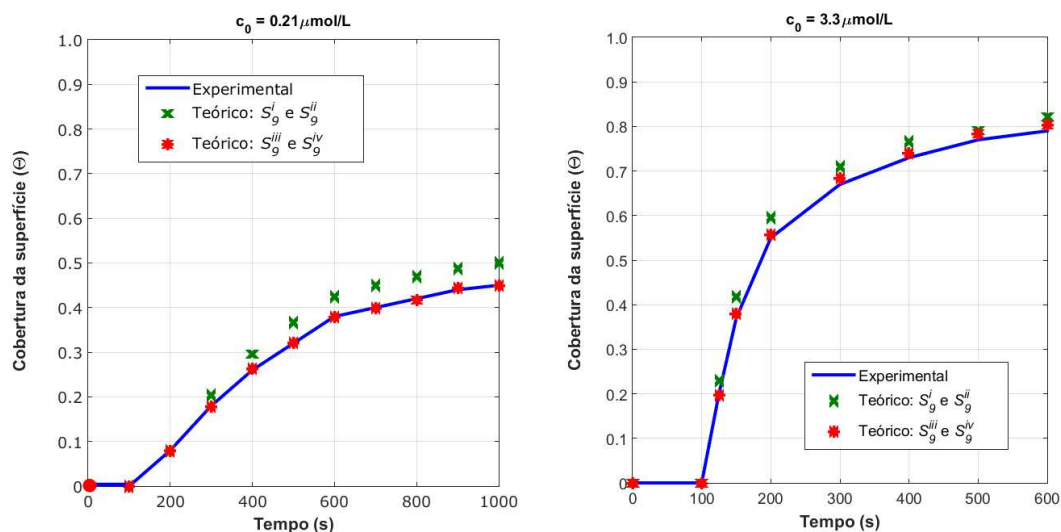


Figura 4.6: Sensorgrama do processo de adsorção provocado por uma solução de Neutravidina com concentração  $0,21 \mu\text{M/L}$  (esquerda) e  $3,3 \mu\text{M/L}$  (direita).

Para verificar a influência da forma do aglomerado de moléculas, foram testadas algumas geometrias para simular esse aglomerado resultante de uma adsorção cooperativa. As superfícies  $S_9^v$  e  $S_9^{vi}$  foram também utilizadas. Apenas variações da cobertura ao longo do eixo  $x$  foram contempladas porque o feixe de luz incidente o faz de forma pontual nos eixo  $y$  e  $z$  como retratado na Figura 4.7.

Os resultados das simulações, utilizando as superfícies descritas, ver Figura 4.8, sugerem que a geometria utilizada no modelo do material dielétrico têm pouca influência na curva SPR resultante. O modelo foi testado para cada uma das superfícies  $S_9^{iii}$ ,  $S_9^{iv}$ ,  $S_9^v$  e  $S_9^{vi}$ , obtendo curvas SPR similares para os mesmos valores de cobertura  $\Theta$ .

Conclui-se que a fração do volume do material dielétrico é significativamente mais influente na ressonância de plásmons de superfície do que a forma ou distribuição desse material.

Desse modo pode ser definida a constante dielétrica equivalente  $\varepsilon_{eq}$  da monocamada como sendo o valor da associação dos dielétricos que a formam.

Ou seja, se uma proteína qualquer de constante dielétrica conhecida  $\varepsilon_p$  forma uma mo-

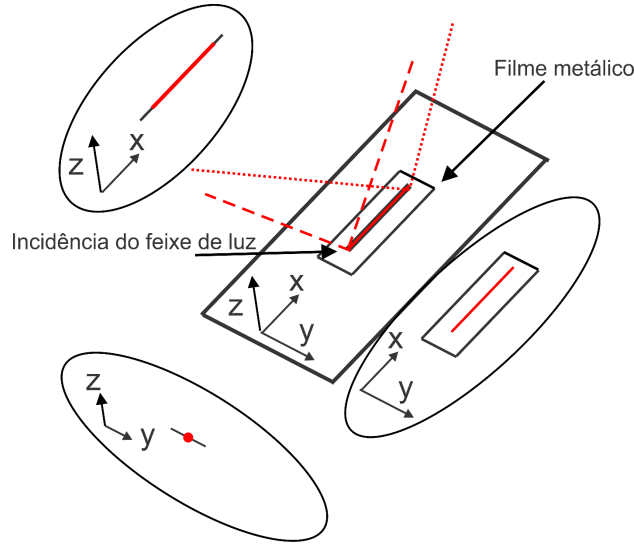


Figura 4.7: Vistas da região de incidência da luz.

nocamada incompleta em um meio aquoso ( $\varepsilon_w$ ), sendo:

$$\varepsilon_{eq}(\Theta = 0, \varepsilon_p, \varepsilon_w) = \varepsilon_w \leq \varepsilon_{eq}(\Theta, \varepsilon_p, \varepsilon_w) \leq \varepsilon_p = \varepsilon_{eq}(\Theta = 1, \varepsilon_p, \varepsilon_w) \quad (4.17)$$

## 4.2 Cálculo da constante dielétrica equivalente

Admitindo que o formato dos subdomínios não exerce influência significativa, pode-se escolher qualquer geometria para cálculo das grandezas de interesse.

Por facilidade de cálculo, a geometria mais simples foi escolhida, aquela definida pela superfície  $S_9^{vi}$ . Esse resultado é compatível com o que é feito para o filme metálico, pois este também é irregular e não homogêneo [88], mas é representado como regular e homogêneo.

Para calcular a constante dielétrica equivalente, foi aplicado o conhecimento de associação paralela de dielétricos, normalmente aplicada a capacitores:

$$\frac{1}{C_{eq}} = \frac{1}{C_1} + \frac{1}{C_2} \quad (4.18)$$

com

$$C_{eq} = \varepsilon_{eq} \frac{A}{d}; \quad C_3 = \varepsilon_3 \frac{A}{\Theta d}; \quad C_4 = \varepsilon_4 \frac{A}{(1 - \Theta)d}. \quad (4.19)$$

sendo  $A$  a área da peça,  $\Theta d$  e  $(1 - \Theta)d$  as espessuras das duas camadas de diferentes materiais

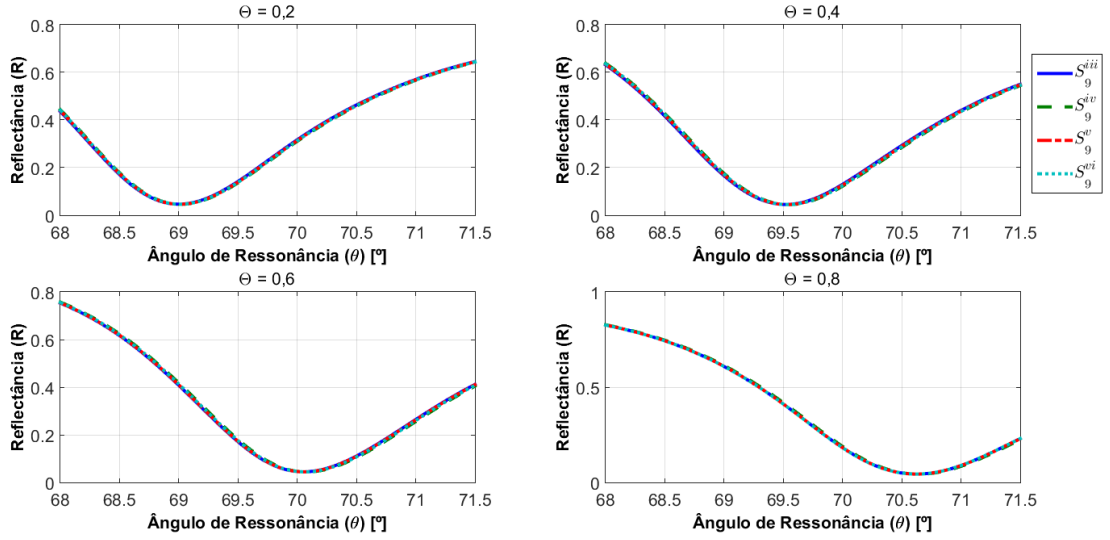


Figura 4.8: Comparação entre as curvas SPR simuladas com diferentes geometrias para quatro valores de cobertura distribuídos de forma uniforme espaçados entre 0 a 1.

e  $\varepsilon_3$  e  $\varepsilon_4$  as suas constantes dielétricas, de acordo com a Figura 4.9.

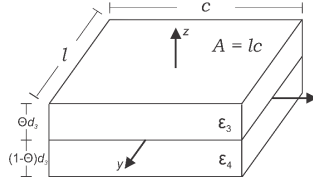


Figura 4.9: Associação paralela de dielétricos

Substituindo:

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{C_{eq}} &= \frac{\Theta d}{\varepsilon_3 A} + \frac{(1 - \Theta)d}{\varepsilon_4 A} \\
 \frac{d}{\varepsilon_{eq} A} &= \frac{\Theta d}{\varepsilon_3 A} + \frac{(1 - \Theta)d}{\varepsilon_4 A} \\
 \frac{1}{\varepsilon_{eq}} &= \frac{\Theta}{\varepsilon_3} + \frac{1 - \Theta}{\varepsilon_4} \\
 \frac{\varepsilon_3 \varepsilon_4}{\varepsilon_{eq}} &= (1 - \Theta)\varepsilon_3 + \Theta\varepsilon_4 \\
 \varepsilon_{eq} &= \frac{\varepsilon_3 \varepsilon_4}{(1 - \Theta)\varepsilon_3 + \Theta\varepsilon_4} \tag{4.20}
 \end{aligned}$$

Com o valor da constante dielétrica equivalente é possível obter uma expansão das



equações de Fresnel para calcular a curva SPR resultante para qualquer valor de cobertura da camada metálica, na Figura 4.10 estão apresentadas as curvas teóricas para diferentes coberturas obtidas com o modelo proposto para ser computado por meio de elementos finitos  $R_{MEF}(\alpha)$ , e obtidas com o modelo de Fresnel expandido  $R_{FE}(\alpha)$ , também proposto. O desvio entre as equações foi calculado por meio do desvio médio quadrático:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (R_{MEF}(\alpha_i) - R_{FE}(\alpha_i))^2}. \quad (4.21)$$

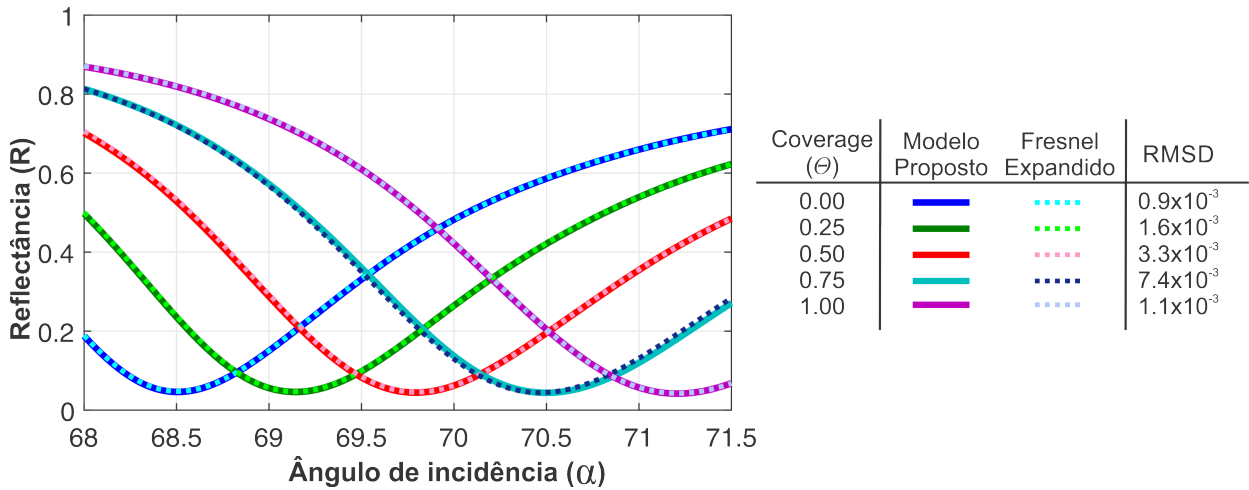


Figura 4.10: Comparação dos resultados obtidos de simulações para diferentes valores de cobertura, utilizando o modelo MEF proposto e solucionado utilizando o Comsol e o modelo de Fresnel expandido: as equações de Fresnel com o dielétrico equivalente. O desvio médio quadrático (RMSD) é apresentado para cada par de curvas para a mesma cobertura.

### 4.3 Constante dielétrica resultante $\varepsilon_R$ e comprimento de onda resultante $\lambda_R$

Durante a ressonância de plásmons de superfície, a componente do vetor de onda da luz excitante que se propaga ao longo da superfície metálica  $\vec{k}_x$  possui a mesma direção e magnitude do vetor de onda da onda de superfície  $\vec{k}_{SP}$  gerada. Assim, dado

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin(\alpha), \quad (4.22)$$

pode-se utilizar a aproximação deduzida por [11] para o modelo de três camadas:

$$k_{SP} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\varepsilon_{mr} + n_3^2}{\varepsilon_{mr} + n_3^2}}, \quad (4.23)$$

para definir a igualdade e calcular a parte real da constante dielétrica do material metálico:

$$\varepsilon_{mr} = \frac{n_3^2(n_1 \sin \alpha)^2}{n_3^2 - (n_1 \sin \alpha)^2}, \quad (4.24)$$

sendo  $\alpha$  o ângulo de incidência e  $n_1$  e  $n_3$  os índices de refração do substrato óptico e da solução na célula de fluxo, respectivamente.

Com este resultado, é possível utilizar a ressonância de plásmos de superfície para medir o valor da constante dielétrica de um filme metálico. Para isso, basta excitar o fenômeno com água no meio externo, assim  $n_3$  pode ser conhecido. Uma aplicação imediata é a calibração do equipamento bio-sensor baseado na ressonância em questão.

A constante dielétrica do metal é fortemente dependente do comprimento de onda da luz que o atravessa. Assim, mesmo se houver a utilização de uma fonte policromática, a equação (4.24) representa a constante dielétrica resultante  $\varepsilon_R$ , ou seja, um único valor da constante que produz o mesmo efeito da composição de todos os valores relacionados à excitação policromática.

Utilizando dados experimentais, como os apresentados em [31], é simples encontrar um único valor de comprimento de onda  $\lambda_R$  para o qual o  $\varepsilon_{mr}(\lambda_R) = \varepsilon_R$ , este é o comprimento de onda resultante.

# Capítulo 5

## Caracterização da camada dielétrica

Neste capítulo, será apresentado um procedimento completo para estimação dos parâmetros físico e óptico da camada dielétrica formada sobre o filme de ouro.

### 5.1 Plataforma experimental

Toda a teoria em que se baseia este estudo é independente da configuração, acoplamento óptico e sensoriamento óptico do equipamento utilizado. Desse modo, qualquer bio-sensor poderia ser escolhido para gerar os dados experimentais. Para mostrar que a resolução do equipamento também é pouco relevante, foi escolhido o módulo SPREETA para coleta de dados, ver Figura 5.1.

O SPREETA utiliza a configuração Kretschmann-Raether no modo AIM, sendo encapsulado em epoxy modelado (Ciba-Geisy, Los Angeles, CA) com um LED de AlGaAs de 830 nm (Infratech, Garland, TX) e um polarizador para a luz. No encapsulamento também há um sensor de temperatura para detectar e posteriormente corrigir desvios causados pela variação dessa grandeza. Um fino filme de ouro de 50 nm compõe a superfície do sensor. Esta superfície fica em contato com um bloco de Teflon<sup>TM</sup> com três canais de  $2 \times 10$  mm com 0,762 mm de profundidade feitos a laser. O SPREETA é capaz de medir índices de refração na faixa de 1,32 a 1,368, com precisão de  $5 \times 10^{-6}$  RIU, com frequência de operação de 5 a 2000 kHz. [89, 90]. A instrumentação inclui um arranjo de fotodetectores com resolução de  $1 \times 128$ . Neste trabalho será chamado de pixel ao sinal individual de cada um desses

## Módulo de aquisição de dados

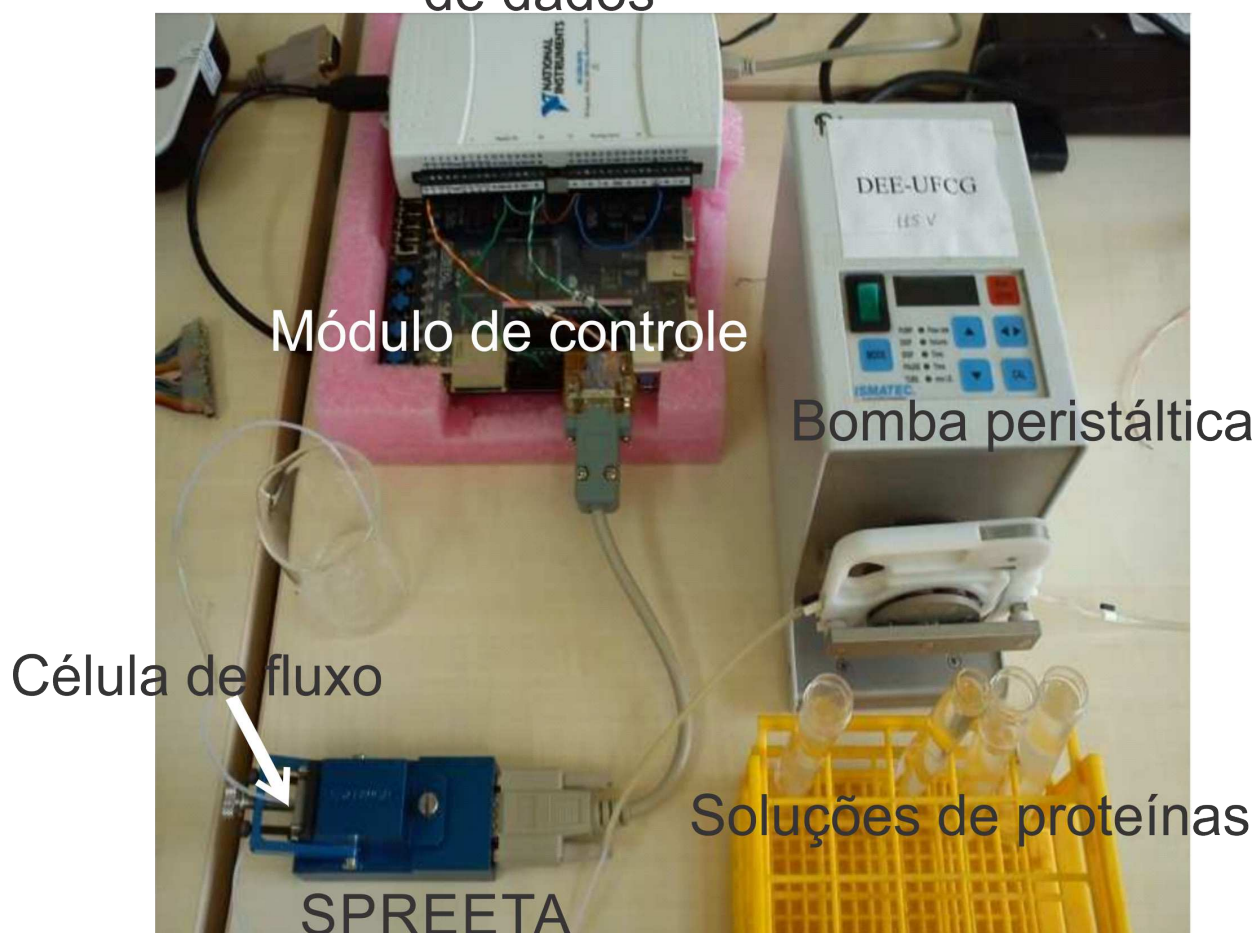


Figura 5.1: Plataforma experimental desenvolvida sobre o bio-chip SPREETA.

fotodetectores.

No sinal captado com o SPREETA pode ser percebida a não uniformidade dos fotodiodos através de padrões constantes de perturbação no sinal independente da intensidade do sinal medido; perturbações temporais podem ser percebidas por meio da variação aleatória de até 0,8% do sinal nos valores de cada pixel medidos para o mesmo sinal; e perturbações espaciais foram observadas quando pixels vizinhos apresentam perturbações similares, com amplitude de até 2% do sinal e influência de dois a três pixels vizinhos. Contudo, um filtro passa-baixas minimiza o efeito desses ruídos de modo suficiente [91].

## 5.2 Calibração do equipamento

A discrepância entre as curvas experimentais e teóricas atrapalham o uso combinado destas para a estimação de parâmetros desconhecidos. Pois não é simples obter uma curva experimental para uma combinação qualquer de parâmetros.

Muitas vezes os dados de projeto de um equipamento podem variar no caso real pela própria margem de seus componentes. No equipamento SPREETA, por exemplo, o seu manual informa que a fonte de luz é monocromática com comprimento de onda de 840 nm, o *datasheet* do fotodiodo utilizado informa 830 nm e ao medir utilizando um espectrômetro, percebe-se uma distribuição gaussiana da luz com pico em 850 nm como apresentado na Figura 5.2.

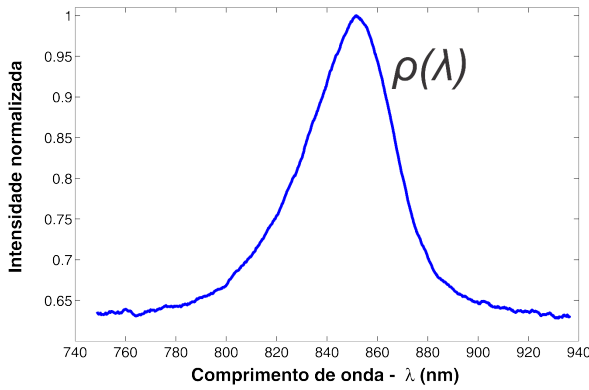


Figura 5.2: Espalhamento espectral da luz excitante do SPREETA medida com o espectrômetro USB4000 da Ocean Optics (detector TCD1304AP com sensibilidade de 60 fótons/count).

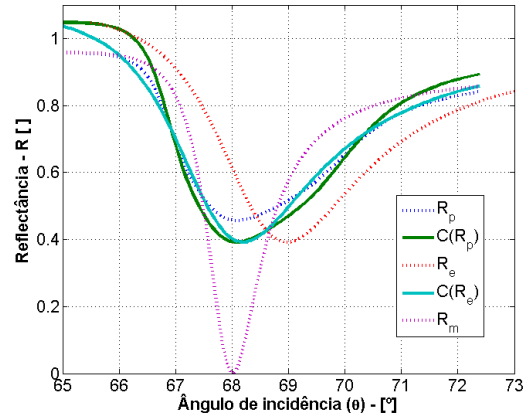


Figura 5.3: Curvas SPR simuladas: com o modelo de Fresnel ( $R_m$ ) e com o modelo de Fresnel Modificado ( $R_p$ ). Curvas SPR experimentais: sem calibração ( $R_e$ ) e com calibração  $C(R_p)$  e  $C(R_e)$ .

Portanto, é necessária uma calibração do equipamento para ajustar a faixa de ângulos correspondente ao sinal captado e ajustar determinados ganhos à curva simulada para que esteja compatível com a curva experimental.

Para simulação, foi utilizada a equação de Fresnel modificada definida por [30]

$$Rp(\theta, \lambda, n_1, d_1, \dots, n_N(\lambda), d_N, \rho(\lambda)) = \frac{\int_{\lambda_I}^{\lambda_F} R_m(\alpha, \lambda, n_1(\lambda), d_1, \dots, n_N(\lambda), d_N) \rho(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_I}^{\lambda_F} \rho(\lambda) d\lambda}, \quad (5.1)$$

sendo  $n_i$  e  $d_i$  o índice de refração e a espessura da camada  $i$  com  $i = 1, 2, \dots, N$ ,  $R_m$  a reflectância calculada utilizando as equações de Fresnel para o ângulo de incidência  $\alpha$  e o comprimento de onda  $\lambda$ , e  $\rho(\lambda)$ .

Considerando, desse modo, a imperfeição da fonte de luz, o desvio da teoria com a experimentação é reduzida consideravelmente, como pode ser percebido na Figura 5.3. O processo de calibração garante um desvio ainda menor.

Para o processo de calibração considera:

- A temperatura e imperfeições do encapsulamento alteram o percurso da luz refletida causando uma incidência deslocada nos fotodetectores;
- A curva simulada detém o valor verdadeiro do ângulo de ressonância esperado da ressonância;
- A curva simulada não contempla atenuações sofridas pela luz e imperfeições dos fotodetectores.

Portanto, assim, como um sensor de temperatura deve ser calibrado para medir  $0^\circ\text{C}$  na temperatura de fusão da água, o sinal experimental também deve ser calibrado para ter como ângulo de ressonância para a água o mesmo valor calculado teoricamente. A relação  $^\circ/\text{pixel}$  também deve ser ajustada no sinal experimental, como referência é utilizada a largura da curva simulada.

Já a curva simulada deve ter sua amplitude e valor de mínimo ajustados para que a profundidade da curva experimental seja refletida, para isso calcula-se um ganho aditivo  $g_a$  e um ganho multiplicativo  $g_m$  para a curva simulada.

A curva experimental da água também deve ser utilizada para calcular a constante dielétrica resultante do metal através da Eq. 4.24 e o comprimento de onda resultante comparando o valor da constante dielétrica com dados experimentais. Um fluxograma do procedimento de calibração pode ser visto na Figura 5.4.

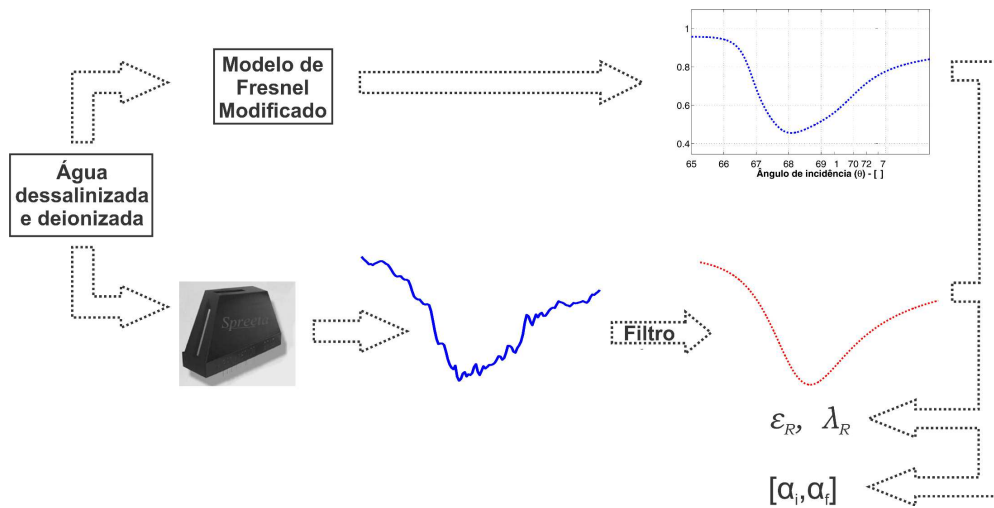


Figura 5.4: Fluxograma apresentando o procedimento de calibração do bio-transdutor.

### 5.3 Estimativa da constante dielétrica equivalente

Um conceito consolidado no uso da ressonância de plásmons de superfície é a constante dielétrica efetiva  $\varepsilon_{eff}$ . Definido por [20],

$$\varepsilon_{eff} = \frac{\varepsilon_R \varepsilon_1 \sin(\alpha)^2}{\varepsilon_R - \varepsilon_1 \sin(\alpha)^2}, \quad (5.2)$$

é o valor da constante dielétrica na camada externa de um modelo de três camadas que resulta em uma curva SPR equivalente à curva resultante de um modelo de quatro camadas.

Para calcular essa constante, é necessário definir:

- $k_2$  o módulo do vetor de onda que se propaga na camada 2 (metálica) com constante dielétrica  $\varepsilon_2$ ;
- $k_{eff}$  o módulo do vetor de onda no modelo de três camadas para o raio que se propaga na camada 3 (meio externo) com constante dielétrica  $\varepsilon_{eff}$ ;
- $k_3$  o módulo do vetor de onda no modelo de quatro camadas para o raio que se propaga na camada 3 (dielétrico) com constante  $\varepsilon_{eq}$ ;
- $k_4$  o módulo do vetor de onda no modelo de quatro camadas para o raio que se propaga na camada 4 (meio externo)  $\varepsilon_4$ .

Assim, o coeficiente de refletividade observado no modelo de 3 camadas é calculado por:

$$r_{2eff} = \frac{k_2/\varepsilon_2 - k_{eff}/\varepsilon_{eff}}{k_2/\varepsilon_2 + k_{eff}/\varepsilon_{eff}} \quad (5.3)$$

e o coeficiente de refletividade, observado no modelo de 4 camadas, é calculado por:

$$r_{234} = \frac{r_{23} + r_{34} \exp(2ik_3d_3)}{1 + r_{23}r_{34} \exp(2ik_3d_3)}, \quad (5.4)$$

sendo

$$r_{23} = \frac{k_2/\varepsilon_2 - k_3/\varepsilon_{eq}}{k_2/\varepsilon_2 + k_3/\varepsilon_{eq}} \quad (5.5)$$

e

$$r_{34} = \frac{k_3/\varepsilon_3 - k_4/\varepsilon_4}{k_3/\varepsilon_3 + k_4/\varepsilon_4}. \quad (5.6)$$

Definidas estas variáveis, o problema de estimação da constante dielétrica equivalente da camada dielétrica consiste em encontrar  $\varepsilon_{eq}$  que satisfaça a igualdade

$$r_{234} = r_{2eff}. \quad (5.7)$$

Para isso foi definida uma função de erro

$$\xi = \sqrt{(r_{234} - r_{2eff})^2} \quad (5.8)$$

e aplicado o método de programação quadrática sequencial (*Sequential quadratic programming* - SQP) para encontrar  $\varepsilon_{eq}$  que minimiza  $\xi$ :

$$\begin{aligned} & \underset{(\widehat{\varepsilon}_{eq}, \widehat{d}_3)}{\text{minimizar}} && \xi(\widehat{\varepsilon}_{eq}, \widehat{d}_3, \alpha_{RES}, \lambda, \varepsilon_2) = \sqrt{(r_{234}(\alpha_i) - r_{2eff}(\alpha_i))^2} \\ & \text{sujeito a} && \varepsilon' < \widehat{\varepsilon}_{eq} < \varepsilon'' \\ & && d' < \widehat{d}_3 < d'' \end{aligned} \quad (5.9)$$



## 5.4 Estimativa da cobertura e constante dielétrica da proteína

Se for conhecido o valor da constante dielétrica  $\varepsilon_3$  da proteína, determinar a cobertura da camada através da Eq. 4.20 é um problema simples dado que a constante dielétrica equivalente foi estimada corretamente:

$$\varepsilon_{eq} = \frac{\varepsilon_3 \varepsilon_4}{(1 - \Theta)\varepsilon_3 + \Theta\varepsilon_4} \quad (5.10)$$

$$\varepsilon_{eq} (\varepsilon_3 + \Theta(\varepsilon_4 - \varepsilon_3)) = \varepsilon_3 \varepsilon_4 \quad (5.11)$$

$$\Theta(\varepsilon_4 - \varepsilon_3)\varepsilon_{eq} = \varepsilon_3 \varepsilon_4 - \varepsilon_3 \varepsilon_{eq} \quad (5.12)$$

$$\Theta = \frac{\varepsilon_3 \varepsilon_4 - \varepsilon_3 \varepsilon_{eq}}{\varepsilon_4 \varepsilon_{eq} - \varepsilon_3 \varepsilon_{eq}}, \quad (5.13)$$

assim, o procedimento descrito pode ser aplicado em tempo real durante uma análise utilizando o bio-sensor baseado na ressonância de plásmons. Um fluxograma deste procedimento está ilustrado na Figura 5.5, em pontilhado está um método de estimação da constante dielétrica  $\varepsilon_3$  da proteína, para ser aplicado se esta não for conhecida. Esse procedimento em pontilhado só deve ser aplicado uma vez para cada proteína antes de sua aplicação on-line e será descrito a seguir.

Para esta estimação mais um problema de otimização deve ser definido. Dado um conjunto de  $M$  amostras da curva SPR adquiridas durante a formação da camada, devem ser estimados  $M$  valores da constante dielétrica equivalente  $\varepsilon_{eq}$ . Contudo, o valor da constante dielétrica da proteína  $\varepsilon_3$  deve ser único para todas as amostras. A cobertura ( $\Theta$ ) da camada em formação deve variar ao longo do tempo, formando o conjunto  $\Upsilon$  com  $M$  valores de cobertura:

$$\Upsilon = [\Theta_1, \Theta_2, \dots, \Theta_{M-1}, \Theta_M]. \quad (5.14)$$

sendo  $\Theta_i = \Theta(t_i)$ .

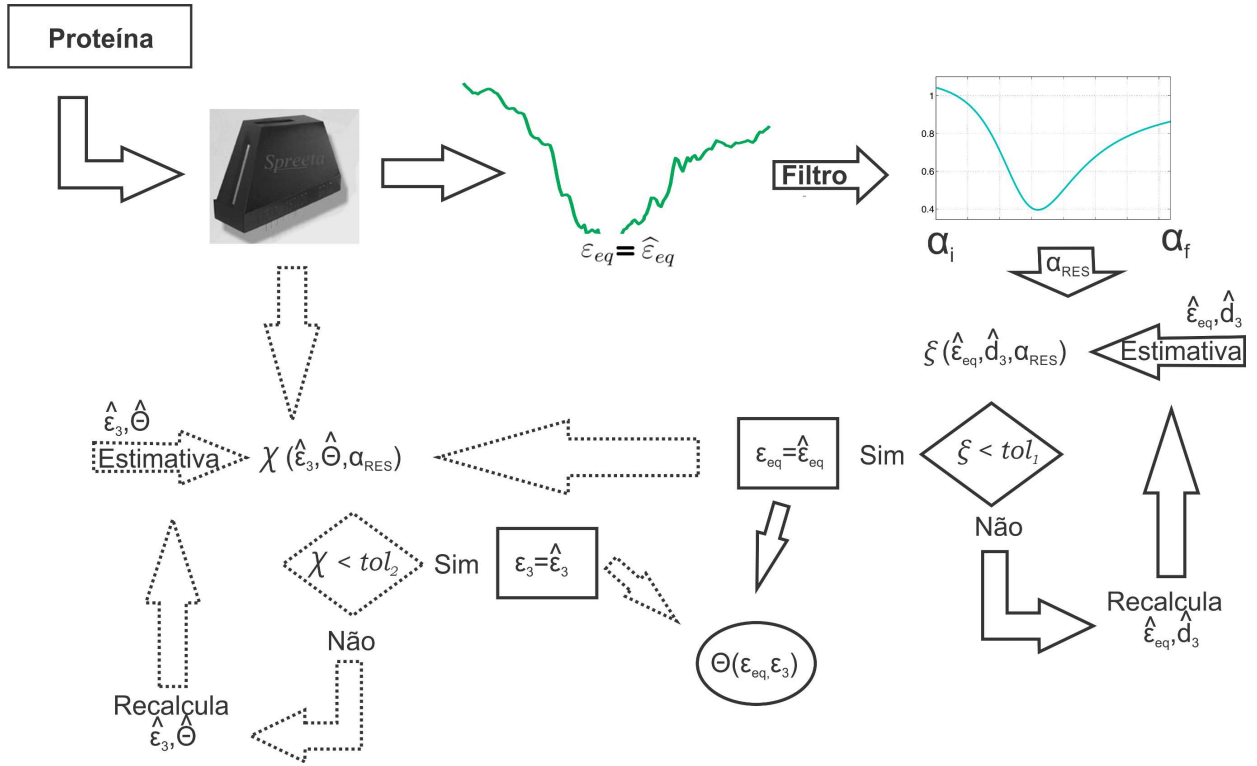


Figura 5.5: Fluxograma apresentando o procedimento desenvolvido para calcular os valores de cobertura da camada em formação. Caso a constante dielétrica da proteína em processo de adsorção não seja conhecida, o procedimento em pontilhado deve ser realizado.

Definida uma função de custo

$$\chi(\varepsilon_3, \Upsilon) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \left( \frac{\varepsilon_{eq} - \varepsilon_3 \varepsilon_4 / (\varepsilon_3 - \Theta_i \varepsilon_3 + \Theta_i \varepsilon_4)}{\varepsilon_{eq}} \right)^2}, \quad (5.15)$$

é possível definir o problema de otimização como:

$$\begin{aligned} \text{minimizar}_{(\varepsilon_3, \Upsilon)} \quad & \chi(\varepsilon_3, \Upsilon) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \left( \frac{\varepsilon_{eq} - \varepsilon_3 \varepsilon_4 / (\varepsilon_3 - \Theta_i \varepsilon_3 + \Theta_i \varepsilon_4)}{\varepsilon_{eq}} \right)^2} \\ \text{sujeito a} \quad & \varepsilon'_p < \varepsilon_3 < \varepsilon''_p, \\ & 0 \leq \Theta \leq 1. \end{aligned} \quad (5.16)$$

## 5.5 Resultados

O método de estimação da cobertura, espessura e índice de refração da camada foi aplicado a dados obtidos por meio de experimentos de adsorção realizados com as proteínas neutravidina e albumina bovina (BSA). O procedimento experimental aplicado foi o mesmo descrito no apêndice B.

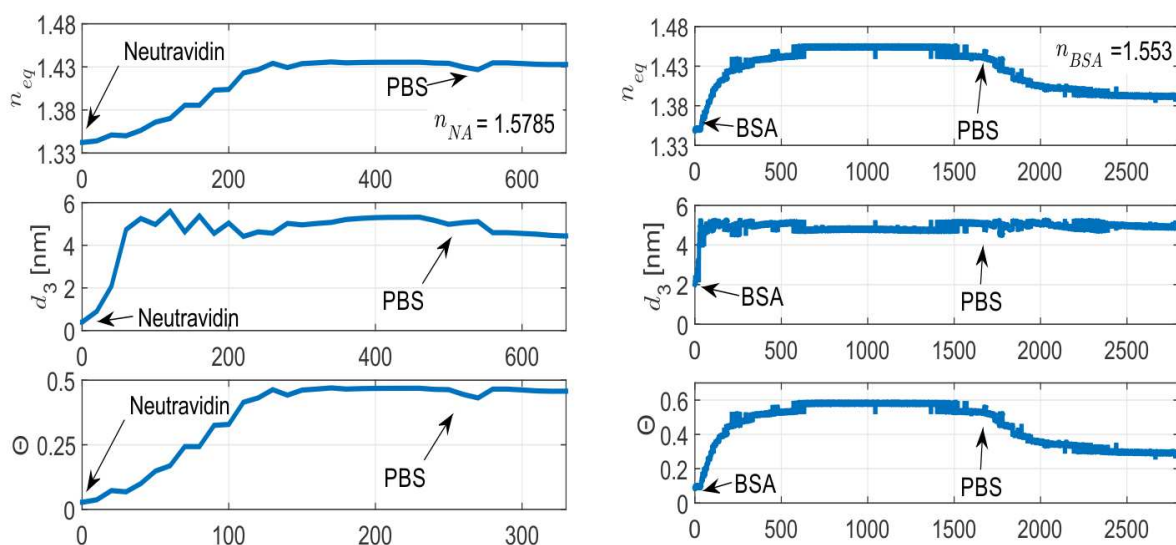


Figura 5.6: Valores estimados utilizando dados oriundos de experimentos com neutravidina ( $n_{NA} = 1,5785$ ) e albumina bovina ( $n_{BSA} = 1,5530$ ).

Como resultados foram obtidas as estimativas de índice de refração equivalente, espessura da camada, cobertura e índice de refração da proteína apresentados na Figura 5.6. Valores encontrados na literatura e os valores estimados estão apresentados na Tabela 5.1 para comparação.

Tabela 5.1: Resumo dos parâmetros teóricos e calculados para a camada de proteína.

	Teórico			Calculado		
	$n_3$	$d_3$ (nm)	$\Theta^{\text{ref}}[87]$	$n_3$	$d_3$ (nm)	$\Theta$
Neutravidina	1.55 [92]	$5.8 \pm 1.8$ [93]	0.39	1.58	4.4	0.46
BSA	1.57 [94, 95]	$4 \pm 2$ [33]	0.32	1.53	4.9	0.29
Hemoglobina	1.485 [95]	4[95]	0.41	1.60	5	0.39

Os valores estimados em ambos os experimentos são compatíveis com os esperados. Ambos os materiais apresentam sua menor dimensão em torno de 5 nm, como foi estimado,

e a baixa cobertura observada no experimento com BSA pode ser explicado por que a proteína disponível em laboratório é antiga o suficiente para que a proteína tenha sofrido degeneração. É importante também ressaltar que os valores da literatura são estimativas obtidas em experimentos.

O método desenvolvido também foi testado em uma plataforma experimental baseada no bio-chip VIR. Esta plataforma trabalha em comprimento de onda de 670 nm e tem resolução de  $1024 \times 1024$  pixels. A proteína hemoglobina foi utilizada nessa plataforma, gerando o resultado apresentado na Figura 5.7.

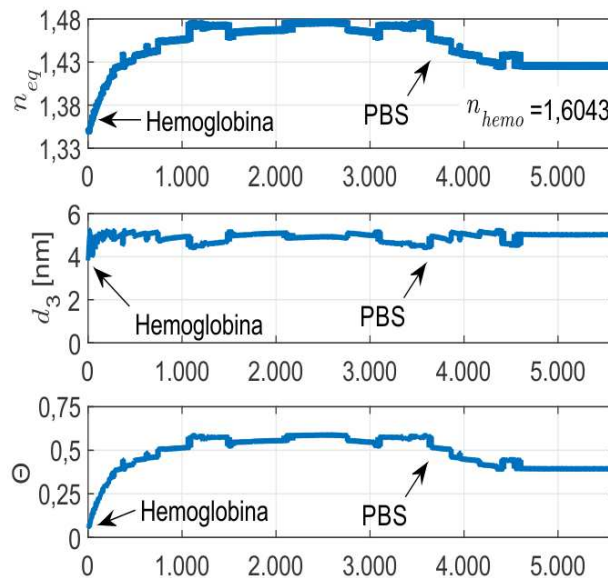


Figura 5.7: Valores estimados utilizando dados oriundos de experimentos com hemoglobina ( $n_{hemo} = 1,6043$ ).

## 5.6 Conclusão

Um modelo mais complexo do que as equações de Fresnel foi desenvolvido para o estudo teórico da ressonância de plásmons de superfície. Podendo contemplar imperfeições nas camadas, rugosidade, ou uma cobertura incompleta.

Resultados obtidos com esse modelo sugerem que a distribuição das moléculas na superfície têm maior influência na ressonância do que a forma que as moléculas assumem ao

aderirem ou se aglomerarem sobre a superfície. Essa conclusão possibilita o uso de associação de dielétricos para relacionar as constantes dielétricas das substâncias que compõem uma monocamada e calcular uma constante dielétrica equivalente de uma camada hipotética uniforme. Esse valor equivalente torna possível utilizar as equações de Fresnel para simular diferentes valores de cobertura da camada.

Por fim, um problema de otimização foi definido para determinar os valores da constante dielétrica equivalente e da espessura dessa camada hipotética que melhor se enquadram na ressonância observada.

No caso de a constante dielétrica do material ser conhecida, pode-se utilizar uma equação desenvolvida para calcular a cobertura da camada. Contudo, um segundo problema de otimização pode ser definido para estimar essa constante.

É, portanto, possível caracterizar uma camada em processo de adsorção quanto à sua espessura, seu índice de refração, e sua cobertura.

# Capítulo 6

## Conclusões

Como principal contribuição da pesquisa, foi apresentado um método de caracterização da membrana de reconhecimento de um transdutor SPR por meio da análise da curva de refletância obtida como resposta do transdutor, caracterização esta que era considerada difícil ou impossível de caracterizar [25] simultaneamente e separadamente. Alcançando, desse modo, o objetivo traçado ao iniciar a pesquisa. O método foi testado em uma plataforma experimental baseada no SPREETA, mas não foi desenvolvido para essa plataforma específica, de modo que pode ser adaptado para outros equipamentos sem necessidade de modificações da plataforma.

Também foi desenvolvido um modelo de simulação da SPR que contemple a difusão do fluido na célula de fluxo e o processo de adsorção da membrana de reconhecimento. Para isso foram desconsideradas mudanças de polarização da luz durante o fenômeno e assumidas hipóteses de isotropia e linearidade dos materiais, além da separação dinâmica do processo de adsorção e a ressonância de plásmons, considerando que a ressonância acontece em uma escalada de tempo quase que instantânea quando comparado à adsorção. A validade dessas hipóteses é confirmada por meio da congruência entre os sensorgramas obtidos com o modelo proposto e com os experimentais.

A organização molecular da membrana de reconhecimento foi estudada por meio de simulações teóricas resultando na proposição de mais um modelo para a teoria do meio efetivo. O modelo proposto difere dos demais por considerar o meio efetivo sobre a uma superfície.

Por fim, foi proposto um método de calibração do transdutor para medir a propriedade dielétrica do filme metálico por meio da curva de refletância do transdutor com água ou outra substância conhecida na célula de fluxo.

## 6.1 Perspectivas de trabalhos futuros

Como continuidade da pesquisa desenvolvida são sugeridos:

- Expandir o método de caracterização da membrana de reconhecimento para aplicação com outros materiais metálicos;
- Explorar a aplicação do método ao sobrepor camadas de diferentes moléculas;
- Estudar a penetração da SPW para expandir a aplicação do meio efetivo para incluir camada externa;
- Aplicar o conhecimento da cobertura para qualificar o processo de limpeza da superfície metálica após o uso de transdutor;
- Aplicar o conhecimento da cobertura para monitorar o envelhecimento do filme metálico.

# Apêndice A

## Equações simuladas no modelo proposto

$$\Pi(x, x_0, r) = \begin{cases} 0, & \text{se } |x - x_0| > r \\ 1, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (\text{A.1})$$

$$\Delta(x, x_0, r) = \begin{cases} 0, & \text{if } |x - x_0| > 2r \\ 2r - |x - x_0|, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (\text{A.2})$$

$$\Omega(x, x_0, a, b) = \sqrt{b^2 - x^2 b^2 / a^2} \quad (\text{A.3})$$

$$S_9^i(x, \Theta, d_S, r) = \sum_{k=0}^{k < 1 + d_S \Theta / 2r} 2r \Pi(x, \text{mod}(d_S, 2r/\Theta)/2 - r(1 - 2k)/\Theta, r) \quad (\text{A.4})$$

$$S_9^{ii}(x, \Theta, d_S, r) = \sum_{k=0}^{k < 1 + d_S \Theta / 4r} 2r \Delta(x, \text{mod}(d_S, 4r/\Theta)/2 - r(2 - 4k)/\Theta, r) \quad (\text{A.5})$$

$$S_9^{iii}(x, \Theta, d_S, r) = \Pi(x, d_S/2, \Theta d_S) \quad (\text{A.6})$$

$$S_9^{iv}(x, \Theta, d_S, r) = \begin{cases} \Delta(x, d_S/2, 2\Theta d_S), & \text{if } \Theta \leq 0.5 \\ 2r(2\Theta - 1) + 2(1 - \Theta)\Delta(x, d_S/2, 2\Theta d_S), & \text{otherwise} \end{cases} \quad (\text{A.7})$$



$$S_9^v(x, \Theta, d_S, r) = 2r\Theta \quad (\text{A.8})$$

$$S_9^{vi}(x, \Theta, d_S, r) = \begin{cases} 0, & \text{if } \Theta \leq \frac{\pi}{4} \text{ and } |x - \frac{r}{2}| > \frac{2\Theta d_S}{\pi} \\ \Omega(x, d_S/2, 2r, 2\Theta d_S/\pi), & \text{if } \Theta \leq \frac{\pi}{4} \text{ and } |x - \frac{r}{2}| \leq \frac{2\Theta d_S}{\pi} \\ 2r \left( \frac{\Theta - \pi/4}{1 - \pi/4} \right) + \Omega(x, \frac{d_S}{2}, \frac{2r(1-\Theta)}{1 - \pi/4}, \frac{d_S}{2}), & \text{otherwise} \end{cases} \quad (\text{A.9})$$

# Apêndice B

## Protocolo Experimental

Para garantir confiabilidade e repetibilidade aos dados obtidos em experimentos laboratoriais, um protocolo de experimentação é seguido ao utilizar um bio-sensor SPR. O protocolo consiste em duas etapas, a de limpeza e a de experimentação em si.

### Procedimento de limpeza da superfície

Na etapa de limpeza são utilizados: água deionizada, hipoclorito de sódio e uma solução tampão fosfato-salina (PBS).

### Procedimento Completo

Um procedimento completo de limpeza deve ser aplicado na primeira vez que se utiliza um transdutor. O procedimento completo consiste em:

1. Com a célula de fluxo seca, capturar curva de referência;
2. Aplicar água e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 3 min;
3. Aplicar PBS e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 1 min;
4. Aplicar uma solução de 12,5% de hipoclorito de sódio e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 2 min;

5. Aplicar uma solução de 25% de hipoclorito de sódio e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 2 min;
6. Aplicar uma solução de 50% de hipoclorito de sódio e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 2 min;
7. Aplicar uma solução de 25% de hipoclorito de sódio e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 2 min;
8. Aplicar uma solução de 12,5% de hipoclorito de sódio e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 2 min;
9. Aplicar PBS e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 2 min;
10. Verificar se ao fim dos itens 3 e 9; dos itens 4 e 8; e dos itens 5 e 7 as condições de ressonância correspondem. Em caso negativo, é necessário repetir o procedimento a partir do item 3.
11. Aplicar água e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável , tempo médio: 1 min;
12. Anotar a variação da condição de ressonância ao aplicar água e PBS para uso posterior no procedimento resumido:  $\Delta\theta_R = \theta_{PBS} = \theta_a$ ;
13. Secar a célula de fluxo para captação de uma nova curva de referência.

## Procedimento de Experimentação

Após a limpeza da superfície, a proteína pode ser aplicada para adsorção de acordo com o seguinte procedimento:

1. Aplicar água e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável para calibração do transdutor, tempo médio: 3 min;
2. Aplicar PBS e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 1 min;

3. Aplicar por dois segundos etanol para tornar a superfície hidrofílica , tempo médio: 1 s;
4. Aplicar a proteína para adsorção e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 3 min;
5. Aplicar PBS para remoção das ligações reversíveis e aguardar até que a resposta do bio-sensor fique estável, tempo médio: 2 min.

# Referências Bibliográficas

- 1 SADANA, A.; SADANA, N. Handbook of Biosensors and Biosensor kinetics. Elsevier, 2011.
- 2 RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 162, p. 87 – 106, 2011. ISSN 0001-8686.
- 3 KURKCUOGLU, S. S.; KURKCUOGLU, O.; GÜNER, F. S. A multiscale investigation on controlling bovine serum albumin adsorption onto polyurethane films. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 135, n. 2, p. 45669–n/a, 2018. ISSN 1097-4628. 45669.
- 4 OMBELLI, M.; COMPOSTO, R. J.; MENG, Q. C.; ECKMANN, D. M. A quantitative and selective chromatography method for determining coverages of multiple proteins on surfaces. *Journal of Chromatography B*, v. 826, p. 198 – 205, 2005.
- 5 FILBRUN, S. L.; DRISKELL, J. D. A fluorescence-based method to directly quantify antibodies immobilized on gold nanoparticles. *Analyst*, The Royal Society of Chemistry, v. 141, p. 3851–3857, 2016.
- 6 NEJADNIK, M. R.; JISKOOT, W. Measurement of the average mass of proteins adsorbed to a nanoparticle by using a suspended microchannel resonator. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 104, n. 2, p. 698 – 704, 2015. ISSN 0022-3549.
- 7 LIU, S.; HORAK, J.; HÖLDRICH, M.; LÄMMERHOFER, M. Accurate and reliable quantification of the protein surface coverage on protein-functionalized nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, v. 989, n. Supplement C, p. 29 – 37, 2017. ISSN 0003-2670.

- 8 FULCHINI, F.; ZAFAR U.; HARE, C.; GHADIRI, M.; TANTAWY, H.; AHMADIAN, H.; POLETTI, M. Relationship between surface area coverage of flow-aids and flowability of cohesive particles. *Powder Technology*, v. 322, n. Supplement C, p. 417 – 427, 2017. ISSN 0032-5910.
- 9 POUR-ALI, S.; KIANI-RASHID, A.; BABAKHANI, A.; VIRTANEN, S.; ALLIETA, M. Correlation between the surface coverage of severe shot peening and surface microstructural evolutions *Surface and Coatings Technology*, 2017. ISSN 0257-8972.
- 10 WOOD, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Proceedings of the Physical Society of London*, v. 18, n. 1, p. 269, 1902.
- 11 RAETHER, H. Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. *Springer Tracts in Modern Physics*, v. 111, 1988.
- 12 OLIVEIRA, L. C. *Sistema Computacional para biossensor baseado na ressonância de plásmons de superfície*. Dissertação de Mestrado — UFCG - Universidade Federal de Campina Grande, Fevereiro 2011.
- 13 OLIVEIRA, L.; LIMA, A.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Surface plasmon resonance sensors - a materials guide to design and optimization. Springer, 2015. p. 180. ISBN 978-3-319-14925-7.
- 14 CHINOWSKY, T. M. *Combining surface plasmon resonance sensing with electrochemistry. Instruments, experiments and data analysis*. Dissertação (Mestrado) — University of Washington, Junho 1997.
- 15 FONTANA, E. Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media. *Applied Optics*, v. 45, n. 29, p. 7632 – 7642, 2006.
- 16 FASSARELLA, L. Lei de snell generalizada. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 29, n. 2, 2007. ISSN 1806-9126.
- 17 SCHASFOORT, R. B. M.; TUDOS, A. J. (Ed.). *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. University of Twente, Enschede, The Netherlands.: RSC Publishing, 2008.

- 18 SOUZA FILHO, C. A. *Desenvolvimento de um Sistema Eletrônico de Aquisição e Processamento para Biosensores*. Dissertação de Mestrado — UFCG - Universidade Federal de Campina Grande, Novembro 2006.
- 19 MOREIRA, C. S. Projeto e realização de um biochip óptico para aplicações biológicas baseado no princípio de ressonância de plásmons de superfície. Tese de Doutorado - UFCG - Universidade Federal de Campina Grande, 2010.
- 20 THIRSTRUP, C.; ZONG, W.; BORRE, M.; NEFF, H.; PEDERSEN, H.; HOLZHÜTER, G. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 100, n. 3, p. 298 – 308, 2004. ISSN 0925-4005.
- 21 HOMOLA, J. On the sensitivity of surface plasmon resonance sensors with spectral interrogation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 41, n. 1-3, p. 207–211, 1997. ISSN 0925-4005.
- 22 KOOYMAN, R.; KOLKMAN, H.; GENT, J.; GREVE, J. Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations. *Analytica Chimica Acta*, v. 213, p. 35 – 45, 1988. ISSN 0003-2670.
- 23 YEATMAN, E. M. Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 11, n. 6-7, p. 635–649, 1996. ISSN 0956-5663.
- 24 NEFF, H.; ZONG, W.; LIMA, A.; BORRE, M.; HOLZHÜTER, G. Optical properties and instrumental performance of thin gold films near the surface plasmon resonance. *Thin Solid Films*, v. 496, n. 2, p. 688 – 697, 2006. ISSN 0040-6090.
- 25 BRUIJN, H. E.; ALTENBURG, B.; KOOYMAN, P.; GREVE, J. Determination of thickness and dielectric constant of thin transparent dielectric layers using surface plasmon resonance. *Optics Communications*, v. 82, n. 5-6, p. 425–432, 1991. ISSN 0030-4018.
- 26 TIAN, Y.; GAO, H.; WU, Z.; LI, M. Temperature characteristics of near infrared spr sensors with kretschmann configuration. *Optoelectronics Letters*, Tianjin University of Technology, v. 11, n. 3, p. 191–194, 2015. ISSN 1673-1905.

- 27 OLIVEIRA, L.; GRILO, L.; LIMA, A.; MELCHER, E. Controller for surface plasmons resonance based biosensor using reconfigurable computing and virtual instruments. *IX International Congress on Electrical Metrology*, 2011.
- 28 OLIVEIRA, L.; MOREIRA, C.; THIRSTRUP, C.; MELCHER, E.; LIMA, A.; NEFF, H. A surface plasmon resonance biochip that operates both in the angular and wavelength interrogation modes. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, v. 62, n. 5, p. 1223–1232, 2013. ISSN 0018-9456.
- 29 PHELPS, J. M.; TAYLOR, D. M. Determining the relative permittivity and thickness of a lossless dielectric overlayer on a metal film using optically excited surface plasmon polaritons. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 29, n. 4, p. 1080, 1996.
- 30 MELÉNDEZ, J.; CARR, R.; BARTHOLOMEW, D.; TANEJA, T.; YEE, S.; JUNG, C.; FURLONG, C. Development of a surface plasmon resonance sensor for commercial applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 39, p. 375 – 379, 1997. ISSN 0925-4005.
- 31 JOHNSON, P. B.; CHRISTY, R. W. Optical constants of the noble metals. *Physical Review B*, v. 6, n. 12, 1972.
- 32 KANSO, M.; CUENOT, S.; LOUARN, G. J. Roughness effect on the spr measurements for an optical fibre configuration: experimental and numerical approaches. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, n. 9, p. 586-592, 2007.
- 33 NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 3, p. 233–244, 2001. ISSN 1389-1723. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172301801274>>.
- 34 LOUREIRO, F. C. C. L. *Uso de biossensor óptico no estudo de sistemas microfluídicos com, e sem, adsorção biomolecular*. Tese de Doutorado — UFCG - Universidade Federal de Campina Grande, Dezembro 2015.
- 35 MOLDOVEANU, S.; ANDERSON, J. Amperometric response of a rectangular channel electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 175, n. 1-2, p. 67-77, 1984.



- 36 SJOELANDER, S.; URBANICZKY, C. Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 20, p. 2338-2345, 1991.
- 37 WEIGL, B. H.; YAGER, P. Microfluidic diffusion-based separation and detection. *Science*, v. 283, n. 5400, p. 346-347, 1999.
- 38 SHINOHARA, K.; SUGII, Y.; AOTA, A.; HIBARA, A.; TOKESHI, M.; KITAMORI, T.; OKAMOTO, K. High-speed micro-piv measurements of transient flow in microfluidic devices. *Measurement Science and Technology*, v. 15, n. 10, p. 1965, 2004.
- 39 PARK, H.; PAK, J. J.; SON, S. Y.; LIM, G.; SONG, I. Fabrication of a microchannel integrated with inner sensors and the analysis of its laminar flow characteristics. *Sensors and Actuators A: Physical*, v. 103, n. 3, p. 317 - 329, 2003. ISSN 0924-4247
- 40 SINTON, D.; LI, D. Electroosmotic velocity profiles in microchannels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 222, n. 1, p. 273-283, 2003.
- 41 SANTHANAGOPALAN, S.; WHITE, R. Series solution to the transient convective diffusion equation for a rotating disk electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, Electrochemical Soc. Inc., v. 151, n. 8, p. J50-J53, 2004.
- 42 LOUREIRO, F.; LIMA, A.; NEFF, H. Optical monitoring of micro fluidic flow conditions, employing surface plasmon resonance sensing *Journal of Physics: Conference Series* n. 85, 2007.
- 43 NEFF, H.; LIMA, A.; LOUREIRO, F.; ALMEIDA, L. Transient response analysis and modeling of near wall flow conditions in a micro channel: evidence of slip flow. *Microfluid Nanofluid*, v. 3, p. 591-602, 2007.
- 44 LOUREIRO, F.; BARRETO NETO, A.; LIMA, A.; MOREIRA, C.; TEJO, F. Molecular transport and mutual diffusion measurement method in a micro-fluidic system, based on surface plasmon resonance spectroscopy. *Procedia Chemistry* v. 1, p. 1099-1102, 2009.
- 45 HORBETT, T.; BRASH, J. Proteins at Interfaces II Fundamentals and Applications *American Chemical Society*, 1995.

- 46 LANGMUIR, I. The Constitution and Fundamentals Properties of Solids and Liquids. Part I. Solids, *Journal of the American Chemical Society* v. 38(11), p. 2221-2295, 1916. <<https://doi.org/10.1021/ja02268a002>>.
- 47 LANGMUIR, I. The Constitution and Fundamentals Properties of Solids and Liquids. Part II. Liquids, *Journal of the American Chemical Society* v. 39(9), p. 1848-1906, 1917. <<https://doi.org/10.1021/ja02254a006>>.
- 48 LANGMUIR, I. The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica and Platinum, *Journal of the American Chemical Society* v. 40(9), p. 1361-1403, 1918. <<https://doi.org/10.1021/ja02242a004>>.
- 49 LANGMUIR, I. Vapor Pressures, Evaporation, Condensation and Adsorption, *Journal of the American Chemical Society* v. 54(7), p. 2798-2832, 1932. <<https://doi.org/10.1021/ja01346a022>>.
- 50 LANGMUIR, I.; SCHAEFER, V. Optical Measurement of the Thickness of a film Adsorbed from a Solution, *Journal of the American Chemical Society* v. 59(7), p. 1406, 1937. <<https://doi.org/10.1021/ja01286a510>>.
- 51 LANGMUIR, I; SCHAEFER, V. Improved Methods of Conditioning Surfaces for Adsorption, *Journal of the American Chemical Society*, v. 59(9), p. 1762-1763, 1937. <<https://doi.org/10.1021/ja01288a503>>.
- 52 LANGMUIR, I; SCHAEFER, V. Properties and Structure of Protein Monolayers, *Chemical Reviews*, v. 24(2), p. 181-202, 1939. <<https://doi.org/10.1021/cr60078a002>>.
- 53 VROMAN, L.; ADAMS, A.; FISCHER, G.; MUNOZ, P. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces, *American Society of Hematology*, 55(1), p. 156-159, 1980. <<http://www.bloodjournal.org/content/55/1/156>>.
- 54 CORSEL, J.; WILLEMS, G.; KOP, J.; CUYPERS, P.; HERMENS, W. The role of intrinsic binding rate and transport rate in the adsorption of prothrombin, albumin, and fibrinogen to phospholipid bilayers, *Journal of Colloid and Interface Science* v. 111(2), p. 544-554, 1986. <[https://doi.org/10.1016/0021-9797\(86\)90058-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(86)90058-5)>.

- 55 HINRICHSEN, E.; FEDER, J.; JØSSANG, T. Geometry of random sequential adsorption, *Journal of Statistical Physics* v. 44(5), p. 793-827, 1986. <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01011908>>.
- 56 LEE, C.; BELFORT, G. Changing activity of ribonuclease A during adsorption: a molecular explanation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* v. 86(12), p. 8392-8396, 1989. <<https://doi.org/10.1073/pnas.86.21.8392>>.
- 57 ASTHAGIRI, D.; LENHOFF, A. Influence of Structural Details in Modeling Electrostatically Driven Protein Adsorption, *Langmuir* v. 13(25), p. 6761-6768, 1997. <<http://dx.doi.org/10.1021/la970608u>>.
- 58 HÖÖK, F.; RODAHL, M.; KASEMO, B.; BRZEZINSKI, P. Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: Effects of pH, ionic strength, and ligand binding, *Proceedings of the National Academy of Sciences* v. 95(21), p. 12271-12276, 1996. <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.21.12271>>.
- 59 LU, J.; SU, T.; THOMAS, R.; PENFOLD, J.; WEBSTER, J. Structural conformation of lysozyme layers at the air/water interface studied by neutron reflection, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* v. 94, p. 3279-3287, 1998. <<http://dx.doi.org/10.1039/A805731A>>.
- 60 SU, T.; THOMAS, R.; CUI, Z.; PENFOLD, J. The Conformational Structure of Bovine Serum Albumin Layers Adsorbed at the Silica-Water Interface, *The Journal Physical Chemistry B* v. 102(41), p. 9100-8108, 1998. <<http://dx.doi.org/10.1021/jp981239t>>.
- 61 LU, J.; SU, T.; HOWLIN, B. The Effect of Solution pH on the Structural Conformation of Lysozyme Layers Adsorbed on the Surface of Water, *The Journal Physical Chemistry B* v. 103(28), p. 5903-5909, 1999. <<http://dx.doi.org/10.1021/jp990129z>>.
- 62 LU, J.; SU, T.; THOMAS, R. Structural Conformation of Bovine Serum Albumin Layers at the Air-Water Interface Studied by Neutron Reflection, *Journal Colloid Interface Science* v. 213(2), p. 426-437, 1999. <<http://dx.doi.org/10.1006/jcis.1999.6157>>.

- 63 SU, T.; LU, J.; THOMAS, R.; CUI, Z. Effect of pH on the Adsorption of Bovine Serum Albumin at the Silica/Water Interface Studied by Neutron Reflection, *The Journal Physical Chemistry B* v. 103(28), p. 5903-5909, 1999. <<http://dx.doi.org/10.1021/jp983580j>>.
- 64 BILLSTEN, P.; FRESKGÅR, P.; CARLSSON, U.; JONSSON, B.; ELWING, H. Adsorption to silica nanoparticles of human carbonic anhydrase II and truncated forms induce a molten-globule-like structure, *FEBS Letters* v. 402(1), p. 67-72, 1997. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01431-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01431-7)>.
- 65 WERTZ, C.; SANTORE, M. Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen on Hydrophobic Surfaces: Single-Species and Competitive Behavior, *Langmuir* v. 15(26), p. 8884-8894, 1999. <<http://dx.doi.org/10.1021/la990089q>>.
- 66 WAHLGREN, M.; ELOFSSON, U. Simple Models for Adsorption Kinetics and Their Correlation to the Adsorption of b-Lactoglobulin A and B, *Journal of Colloid and Interface Science* v. 188(1), p. 121-129, 1997. <<https://doi.org/10.1006/jcis.1996.4715>>.
- 67 MINTON, A. Effects of excluded surface area and adsorbate clustering on surface adsorption of proteins. II. Kinetic models., *Biophysical Journal* v. 80(4), p. 1641-1648, 2001. <[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76136-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76136-X)>.
- 68 WERTZ, C.; SANTORE, M. Adsorption and Reorientation Kinetics of Lysozyme on Hydrophobic Surfaces, *Langmuir* v. 18(4), p. 1190-1199, 2002. <<https://doi.org/10.1021/la0108813>>.
- 69 SZÖLLŐSI G.; DERÁLNÍYI, I.; VÖRÖS, J.; Reversible mesoscopic model of protein adsorption: From equilibrium to dynamics, *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* v. 343, p. 359-375, 2004. <<https://doi.org/10.1016/j.physa.2004.06.062>>.
- 70 RABE, M.; VERDES, D.; RANKL, M.; ARTUS, G.; SEEGER, S. A Comprehensive Study of Concepts and Phenomena of the Nonspecific Adsorption of beta-Lactoglobulin, *The European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* v. 8(6), p. 862-872, 2007. <<https://doi.org/10.1002/cphc.200600710>>.

- 71 RABE, M.; VERDES, D.; ZIMMERMANN, J.; SEEGER, S. Surface Organization and Cooperativity during Nonspecific Protein Adsorption Events, *The Journal of Physical Chemistry B* v. 112(44), p. 13971-13980, 2008. <<https://doi.org/10.1021/jp804532v>>.
- 72 GAMBINO, G.; LOMBARDO, G.; GRASSI, A.; MARLETTA, G. Molecular Modeling of Interactions between l-Lysine and a Hydroxylated Quartz Surface, *The Journal of Physical Chemistry B* v. 108(8), p. 2600-2607, 2004. <<https://doi.org/10.1021/jp035991s>>.
- 73 NONELLA, M.; SEEGER, S. Investigating Alanine-Silica Interaction by Means of First-Principles Molecular-Dynamics Simulations, *The European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* v. 9(3), p. 414-421, 2008. <<https://doi.org/10.1002/cphc.200700546>>.
- 74 COSTA, D.; TOUGERTI, A.; TIELENS, F.; GERVAIS, C.; STIEVANO, L.; LAMBERT, J. DFT study of the adsorption of microsolvated glycine on a hydrophilic amorphous silica surface, *The European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* v. 10(42), p. 6360-6368, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1039/B806501B>>.
- 75 QUINN, A.; MANTZ, H.; JACOBS, K.; BELLION, M.; SANTEN, L. Protein adsorption kinetics in different surface potentials, *EPL (Europhysics Letters)* v. 81(5), p. 56003, 2008. <<http://stacks.iop.org/0295-5075/81/i=5/a=56003>>.
- 76 BELLION, M.; SANTEN L.; MANTZ, H.; HÄHL, H.; QUINN, A.; NAGEL, A.; GILOW, C.; WEITENBERG, C.; SCHMITT Y.; JACOBS, K. Protein adsorption on tailored substrates: long-range forces and conformational changes, *Journal of Physics: Condensed Matter* v. 20(40), p. 404226, 2008. <<http://stacks.iop.org/0953-8984/20/i=40/a=404226>>.
- 77 PETERLINZ, K.; GEORGIADIS, R. Two-color approach for determination of thickness and dielectric constant of thin films using surface plasmon resonance spectroscopy. *Optics Communications*, n. 130, p. 260-266, 1996.
- 78 ZHANG, J.; WANG, G. P. Determination of thickness and dielectric constant of thin

- films by dual-wavelength light beaming effect of a metal nanoslit. *Journal of Applied Physics*, AIP, v. 106, n. 3, p. 034305, 2009.
- 79 JOHNSTON, K.; KARLSEN, S.; JUNG, C.; YEE, S. ONew analytical technique for characterization of thin films using surface plasmon resonance. *Materials Chemistry and Physics*, n. 4, p. 242 - 246, 1995.
- 80 CHINOWSKY, T. M.; JUNG, L. S.; YEE, S. S. Optimal linear data analysis for surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, n. 54, p. 89–97, 1999.
- 81 CHYOU, J.; CHU, C.; CHIEN, F.; LIN, C.; YEH, T.; HSU, R.; CHEN, S. Precise determination of the dielectric constant and thickness of a nanolayer by use of surface plasmon resonance sensing and multiexperiment linear data analysis. *Applied Optics*, Vol. 45, No. 23, p. 6038–6044, 2006.
- 82 SHALABNEY, A.; ABDULHALIM, I. Electromagnetic fields distribution in multilayer thin film structures and the origin of sensitivity enhancement in surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators A: Physical*, v. 159, n. 1, p. 24 – 32, 2010. ISSN 0924-4247.
- 83 WATANABE, K. Sensitivity optimization of surface plasmon sensors for detection of intermediate layers. *Sensors and Actuators A: Physical*, v. 173, n. 1, p. 36 – 40, 2012. ISSN 0924-4247.
- 84 HOMOLA, J.; KOUDELA, I.; YEE, S. S. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 54, n. 1-2, p. 16 – 24, 1999. ISSN 0925-4005.
- 85 SOUSA, T.; OLIVEIRA, L.; NEFF, F.; LABORDE, H.; LIMA, A. Numerical tool for estimating the dielectric constant, the thickness, and the coverage of immobilized inhomogeneous protein films on gold in aqueous solution, *Applied Optics* v. 57(24), p. 6866-6875, 2008. <<https://doi.org/10.1364/AO.57.006866>>.
- 86 DAVIDSON, D. B. *Computational Electromagnetics for RF and Microwave Engineering..* Cambridge University Press. 2005.

- 87 LABORDE, H.; LIMA, A.; LOUREIRO, F.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Adsorption, kinetics and biochemical interaction of biotin at the gold-water interface. *Thin Solid Films*, v. 540, p. 221 – 226, 2013. ISSN 0040-6090.
- 88 OLIVEIRA, L.; LIMA, A.; NEFF, H.; SOUSA, T; THIRSTRUP, C.; HOLZHÜTER, G. Co-existence of radiative and non-radiative surface plasmon resonance modes: Power balance and influence of film morphology. *Plasmonics*, v. 12, n. 5, p. 1561–1569, 2017. ISSN 1557-1963. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11468-016-0419-7>>.
- 89 ELKIND, J.; STIMPSON, D.; STRONG, A.; BARTHOLOMEW, D.; MELENDEZ, J. Integrated analytical sensors: the use of the TISPR-1 as a biosensor. *Sensors and Actuators B*, v. 54, p. 182–190, 1999.
- 90 SPREETA. *TSPR1A170100: Spreeta™ Liquid Sensor*. Dallas, Texas, 2000.
- 91 T. A. T. de Sousa, L. C. Oliveira, F. C. C. Loureiro, A. M. N. Lima, and H. Neff. Evaluating the signal processing chain employed in surface plasmon resonance biosensing. In *2014 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC) Proceedings*, pages 1606–1611, May 2014.
- 92 DMITRIEV, A. Nanoplasmonic sensors. Springer, 2012. cap. 3, p. 71.
- 93 BERNDT, M.; LORENZ, M.; ENDERLEIN, J.; DIEZ, S. Axial nanometer distances measured by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nano Letters*, v. 10, n. 4, p. 1497–1500, 2010. PMID: 20218702. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/nl100593x>>.
- 94 TEICHROEB, J.; FORREST, J.; NGAI, V.; JONES, L. Anomalous thermal denaturing of proteins adsorbed to nanoparticles. *The European Physical Journal E*, v. 21, n. 1, p. 19–24, 2006. ISSN 1292-895X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1140/epje/i2006-10040-2>>.
- 95 ARWIN, H. Optical properties of thin layers of bovine serum albumin,  $\gamma$ -globulin, and hemoglobin. *Applied Spectroscopy*, v. 40, n. 3, p. 313–318, 1986. Disponível em: <<https://doi.org/10.1366/0003702864509204>>.