

Projeto e realização de um biochip óptico para
aplicações biológicas baseado no princípio de
ressonância de plásmons de superfície

Cleumar da Silva Moreira

Tese de Doutorado submetida à Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande - Campus de Campina Grande como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências no Domínio da Engenharia Elétrica.

Área de Concentração: Processamento da Informação

Antonio Marcus Nogueira Lima, Dr.

Orientador

Helmut Neff, Dr.

Orientador

Campina Grande, Paraíba, Brasil

©Cleumar da Silva Moreira, Agosto de 2010

Projeto e realização de um biochip óptico para
aplicações biológicas baseado no princípio de
ressonância de plásmons de superfície

Cleumar da Silva Moreira

Tese de Doutorado apresentada em Agosto de 2010

Antonio Marcus Nogueira Lima, Dr.

Orientador

Helmut Neff, Dr.

Orientador

Carsten Thirstrup, Dr., Coloplast, Denmark

Componente da Banca

Nilton Itiro Morimoto, Dr., USP/LSI

Componente da Banca

Luiz Alberto Luz de Almeida, D.Sc., UFBA

Componente da Banca

José Sérgio da Rocha Neto, D.Sc., UFCG

Componente da Banca

José Ewerton Pombo de Farias, Dr., UFCG

Componente da Banca

Campina Grande, Paraíba, Brasil, Agosto de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

M838p Moreira, Cleumar da Silva.
 Projeto e realização de um biochip óptico para aplicações biológicas baseado no princípio de ressonância de plásmons de superfície /Cleumar da Silva Moreira. — Campina Grande, 2010.
 122 f.: il.

 Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Engenharia Elétrica e Informática.
 Orientadores: Prof. Dr. Antonio Marcus Nogueira Lima e Prof. Dr. Helmut Neff.
 Referências.

 1. Ressonância de Plásmons de Superfície. 2. Biochip. 3. Biosensor Óptico. I. Título.

CDU 575.133(043)

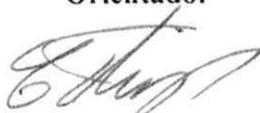
**PROJETO E REALIZAÇÃO DE UM BIOCHIP ÓPTICO PARA APLICAÇÕES
BIOLÓGICAS BASEADO NO PRINCÍPIO DE RESSONÂNCIA DE
PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE**

CLEUMAR DA SILVA MOREIRA

Tese Aprovada em 17.08.2010


ANTONIO MARCUS NOGUEIRA LIMA, Dr., UFCG
Orientador

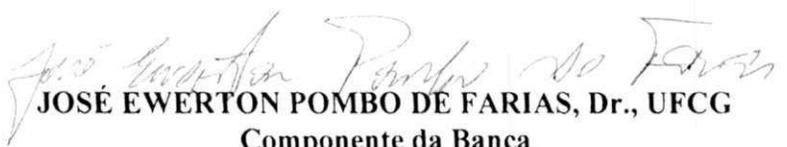

HELMUT FRANZ- NEFF, Dr., UFCG
Orientador


CARSTEN THIRSTRUP, Dr., Coloplast A/S – Denmark
Componente da Banca


NILTON ITIRO MORIMOTO, Dr., USP
Componente da Banca


LUIZ ALBERTO LUZ DE ALMEIDA, D.Sc., UFBA
Componente da Banca


JOSÉ SÉRGIO DA ROCHA NETO, D.Sc., UFCG
Componente da Banca


JOSÉ EWERTON POMBO DE FARIAS, Dr., UFCG
Componente da Banca

CAMPINA GRANDE – PB
AGOSTO - 2010

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha esposa, Danielle, e minhas três filhas, Sarah, Sophia e Suellen, por sua paciência e amor durante a realização deste trabalho. Se elas não estivessem comigo em Campina Grande, durante esses quatro anos de trabalho, creio que eu não teria chegado aonde estou chegando. Elas são realmente anjos em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço aos professores Antonio Marcus Nogueira Lima, Dr., e Helmut Neff, Dr., pelas oportunidades de aprendizado e da genuína atenção dispensada ao longo desses anos de trabalho. Agradeço pela paciência, pelo carinho e pelas palavras de incentivo e apoio.

Agradeço a Arlindo, Carlos Alberto, Fernanda, Leiva Casemiro, Luis Hermano, Alfranque, Jadsonlee, Jaidilson, Valter, entre outros, pelo companheirismo, pelo bom humor e pelas oportunidades de trabalho em equipe.

Agradeço ao professor Severino Jackson do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal da Paraíba pela gentil cessão, sempre quando necessário, do equipamento de pulverização catódica existente em seu laboratório.

Agradeço também aos funcionários e professores do Departamento de Engenharia Elétrica. Agradeço aos companheiros do Instituto Federal de Alagoas, pelo apoio e incentivo durante a realização desse trabalho.

Também agradeço ao CNPq que proporcionou durante esses anos o suporte financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais Valdemar e Creusa e irmãos Anderson e Cristiane, que durante esses anos de trabalho foram fundamentais com seu apoio, incentivo e amor. Meus pais tem sido, ao longo de minha vida, constantes incentivadores para que eu persevere em meus estudos.

Agradeço também aos meus sogros Daniel e Josélia por sua grande ajuda e colaboração comigo e minha família. Agradeço aos meus cunhados Débora, Daysiane, Dayvisson, Daniel Jr., Juliana e Kelsi pelo apoio e carinho durante meu trabalho.

Queria agradecer também ao Pai Celestial, pela grande confiança, misericórdia e amor durante esses anos de trabalho. Foram momentos não muito fáceis e Ele sempre esteve ao meu lado, mostrando-me que a família e o amor são realmente mais importantes.

Resumo

O trabalho apresenta um biochip óptico para aplicações biológicas (PPBIO) baseado no princípio de ressonância de plásmons de superfície ou SPR (*Surface Plasmon Resonance*). O PPBIO usa um prisma polimérico como substrato óptico, fabricado com uma máquina de moldagem por injeção. O PPBIO é um dispositivo de baixo custo (\approx U\$1,00), descartável e com possibilidade de uso com fontes de entrada monocromáticas e policromáticas. O PPBIO é o primeiro biochip óptico SPR construído no Brasil. O prisma polimérico possui uma geometria simples trapezoidal, sem elementos internos, como graticulas de difração holográficas ou elementos eletro-ópticos integrados. Além disso, no PPBIO não é utilizado óleo ou gel e nenhum elemento mecânico rotativo para variação do ângulo de incidência dos feixes luminosos de entrada. Prismas de diferentes larguras (10 mm e 20 mm) foram fabricados e cobertos com filmes finos de ouro de 50 nm. Testes experimentais preliminares são apresentados. Os resultados desses testes são promissores e revelaram a ocorrência do fenômeno SPR e da variação do parâmetro de ressonância (θ_{RES} ou λ_{RES}) com a mudança do analito (água destilada, etanol ou hidróxido de sódio).

Palavras-chave: Ressonância de Plásmons de Superfície, Biochip, Biosensor Óptico

Abstract

This work presents an optical biochip for biologic applications (PPBIO), based on the surface plasmon resonance (SPR) principle. PPBIO uses a polymeric prism as the optical substrate, fabricated using injection molding methods. PPBIO is a low-cost ($\approx U\$1,00$), disposable device and also it can be used with monochromatic and polychromatic light sources. PPBIO is the first SPR optical biochip made in Brasil. The polymeric prism has a simple trapezoidal geometry, without internal elements, as holographic diffraction gratings or integrated electro-optical elements. Also, PPBIO excludes the need for use of index-matching oil or gel and any mechanical arrangement to the variation of the incidence angle. Optical prisms of different widths (10 mm and 20 mm) have been fabricated and covered with a 50 nm thin gold film. Preliminary experimental tests have been done. The obtained results are promising and they have indicated the occurrence of the SPR phenomenon and the resonance minimum displacement with introduction of different analytes (distilled water, ethanol and sodium hydroxide).

Keywords: Surface Plasmon Resonance, Biochip, Optical Biosensor

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Imunoensaio	2
1.2	ELISA	4
1.3	Biosensores	6
1.3.1	Tipos de Biosensores	7
1.3.2	Biosensores ópticos baseados no princípio SPR	9
1.4	Objetivos e metodologia	11
1.5	Sinopse dos Capítulos	12
2	Fundamentos teóricos dos biosensores SPR	13
2.1	Histórico do fenômeno SPR	13
2.2	Fenômeno SPR	15
2.3	Sensores e biosensores SPR	17
2.4	Condições necessárias para excitação dos plásmons de superfície	18
2.5	Substratos ópticos utilizados para a excitação dos plásmons de superfície	19
2.5.1	Prisma óptico	19
2.5.2	Guia de onda óptico e fibra óptica	19
2.5.3	Gratícula ou grade de difração	20
2.6	Configurações de um biosensor SPR	20
2.7	Desempenho de um biosensor SPR	21
2.8	Características e operação de um biosensor SPR	23
2.8.1	Exemplo de operação de um biosensor SPR	24
2.8.2	Cálculo do Índice de Refração	27

2.9	Biosensores SPR comerciais	28
2.9.1	BIACORE	28
2.9.2	Biosensor SPREETA	29
2.9.3	VIR	31
2.10	Limitações operacionais de um biosensor SPR	33
2.10.1	Adsorção não-específica	33
2.10.2	Efeitos da variação da temperatura ambiente no desempenho do biosensor SPR	34
2.11	Estudo dos efeitos da variação da temperatura ambiente	35
2.11.1	Cálculos baseados na condição de ressonância - modo AIM	35
2.11.2	Cálculos baseados na condição de ressonância - modo WIM	36
2.11.3	Cálculos baseados nas equações de Fresnel	37
2.11.4	Determinação do efeito da temperatura	38
2.11.5	Experimento usando o biosensor SPREETA	40
2.11.6	Discussões dos estudos dos efeitos da temperatura em um biosensor SPR	44
2.12	Considerações finais	48
3	Biochip SPR PPBIO: projeto e construção	49
3.1	Prisma óptico: considerações iniciais	49
3.1.1	Polímero TOPAS COC	49
3.1.2	Aspectos técnicos do projeto do prisma óptico	50
3.1.3	Projeto do prisma óptico SPR	52
3.2	Simulações ópticas	53
3.2.1	Projeto da lente cilíndrica	55
3.2.2	Resultados e análise das simulações	57
3.3	Fabricação dos prismas ópticos	65
3.3.1	Moldagem por injeção	65
3.3.2	Construção dos moldes dos prismas poliméricos	68
3.3.3	Fabricação dos prismas poliméricos	71
3.3.4	Pré-tratamento dos prismas fabricados	73

3.3.5	Deposição do filme fino de ouro	73
3.4	Comentários Finais	75
4	Testes experimentais: resultados e discussões	78
4.1	Plataformas de testes experimentais	79
4.1.1	Modo de Interrogação Espectral	79
4.1.2	Modo de Interrogação Angular	82
4.2	Resultados e Discussões	85
4.2.1	Resultados utilizando os biochips SPR fabricados com o molde de bronze	86
4.2.2	Resultados utilizando os biochips SPR fabricados com o molde de aço	91
4.2.3	Discussões	93
5	Conclusões e trabalhos futuros	96
5.1	Trabalhos Futuros	99
6	Publicações realizadas durante o período do doutorado	101
A	Princípios da física e matemática do fenômeno SPR	103
B	Definições de alguns termos da Óptica	107
B.1	Óptica geométrica, traçado de raios e outros conceitos	107
B.2	Polarização	108
	Referências Bibliográficas	110

Lista de Símbolos e Abreviaturas

AIM	<i>Angular Interrogation Mode</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i>
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
COC	<i>Cyclo-olefin Copolymer</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DOCE	<i>Diffractive Optical Coupling Elements</i>
EBR	<i>Entrance Beam Radius</i>
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
Ig	Imunoglobulina
IIM	<i>Intensity Interrogation Mode</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LOC	<i>Lab-on-Chip</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
PC	<i>Polycarbonate</i>
PIM	<i>Phase Interrogation Mode</i>
PMMA	<i>Poly-Methyl Methacrylate</i>

QCM *Quartz-Crystal Microbalance*

SPR *Surface Plasmon Resonance*

TE *Transverse Electric*

TLR *Testes Laboratoriais Remotos*

TM *Transverse Magnetic*

WIM *Wavelength Interrogation Mode*

Lista de Tabelas

3.1	Quadro comparativo de propriedades de certos polímeros	50
3.2	Valores da posição (x,y) do foco em relação ao raio de curvatura R da lente cilíndrica	64
3.3	Valores da posição (x,y) do foco em relação à espessura t da lente cilíndrica .	64
3.4	Valores da posição (x,y) do foco em relação à distância D	65

Lista de Figuras

1.1	(a) Estrutura de um anticorpo, apresentando a ligação com um antígeno específico; (b) Exemplo de um imunoensaio, com a descrição das etapas da interação antígeno-anticorpo e detecção/quantificação usando método colorimétrico.	2
1.2	(a) Prato de poliestireno com 96 poços, ilustrando a reação enzimática e a mudança de cor com a adição do substrato; (b) Tipos de ELISA.	5
1.3	Diagrama de blocos de um biosensor	7
1.4	Diagrama de blocos de um biosensor SPR, onde o biochip é formado pelo substrato óptico e o filme fino metálico	10
2.1	Estruturas de excitação dos plásmons de superfície, propostas por (a) Otto e (b) Kretschmann-Raether.	14
2.2	Diagrama de blocos de uma interface metal-dielétrico na situação de ressonância dos plásmons de superfície. A onda de plásmons de superfície (SPW) é excitada pelo campo elétrico evanescente E_{ev}	16
2.3	Curva de refletividade, com o mínimo de refletividade na condição de ressonância SPR e parâmetros característicos da curva.	16
2.4	Estrutura de um biosensor SPR, usando uma fibra óptica como substrato óptico.	19
2.5	Estrutura da gráticula ou grade de difração	20
2.6	Estruturas de um biosensor nos modos de interrogação (a) angular e (b) espectral. Os elementos de geração e detecção luminosa também são apresentados.	22

2.7	Etapas do processo de funcionalização da superfície metálica de um biosensor SPR, usando moléculas de BSA	25
2.8	(a) Configuração do biosensor, contido no sistema BIACORE. Uma tira descartável (b), contendo o filme fino de ouro é acoplada opticamente ao prisma de vidro (interno ao sistema BIACORE) usando um hidrogel.	28
2.9	Estrutura do biosensor SPREETA	30
2.10	Estrutura do biosensor VIR SPR, (a) com mudanças na estrutura de uma configuração baseada em prisma e (b) uma visão superior do biochip VIR . . .	32
2.11	Sensibilidade calculada no modo AIM para um modelo de três camadas, para diferentes valores do índice de refração do analito. Também é exibido a variação de S^θ , para o comprimento de onda fixo de 670nm, em função do índice de refração do analito.	39
2.12	Sensibilidade calculada no modo WIM para um modelo de três camadas, para diferentes valores do índice de refração do analito. Também é exibido a variação de S^λ , para o comprimento de onda fixo de 670nm, em função do índice de refração do analito.	39
2.13	Efeito da temperatura na sensibilidade no modo AIM, baseados (a) na condição de ressonância e (b) nas equações de Fresnel	41
2.14	Módulo da sensibilidade de um biosensor SPR no Modo WIM, considerando os procedimentos de cálculo baseados (a) na condição de ressonância e (b) nas equações de Fresnel.	42
2.15	Arranjo experimental para a determinação da sensibilidade no modo AIM, usando o biosensor SPREETA	43
2.16	Sensibilidade determinada com experimentos usando o biosensor SPREETA	44
2.17	Influência da temperatura na largura de banda da curva SPR para o (a) modo AIM e (b) modo WIM. Internamente, nesses gráficos estão as curvas SPR para várias temperaturas.	46
2.18	Largura de banda calculada apresentando a dependência com a temperatura, morfologia e espessura do filme fino de ouro	47
3.1	Estrutura do biosensor SPR proposto pela patente.	51

3.2	Estrutura do prisma óptico SPR, apresentando os dados de projeto.	52
3.3	Seção longitudinal e vista superior do prisma, com os valores das dimensões calculados.	54
3.4	(a) Disposição espacial do prisma e demais componentes ópticos utilizados nas simulações; (b) Lente cilíndrica plano-convexa, apresentando os parâmetros de projeto.	56
3.5	Efeitos da variação do raio de curvatura da lente cilíndrica no ponto de focalização do biosensor SPR. São mostrados os resultados para três diferentes raios R.	58
3.6	Efeitos da variação da espessura da lente cilíndrica na focalização dos feixes luminosos de entrada. São mostrados os resultados para três diferentes espessuras t	59
3.7	Efeitos da variação da posição da lente cilíndrica na horizontal, 2 mm para a direita (a) e 2 mm para a esquerda (b)	60
3.8	Efeitos da variação da distância D da lente cilíndrica ao prisma	61
3.9	Efeitos da abertura do sistema (EBR) num biosensor SPR no modo WIM.	63
3.10	Estrutura de uma máquina de moldagem por injeção, onde as temperaturas críticas são apresentadas.	66
3.11	(a) Molde de bronze com um ponto de injeção; (b) Ampliação da cavidade do ponto de injeção.	69
3.12	Bloco de aço da parte extratora, onde são apresentadas as três cavidades e os pontos de injeção e retirada de excesso do polímero e ampliação de uma cavidade.	70
3.13	(a) Foto do prisma fabricado, destacando as fissuras e bolha presentes; (b) Imagem microscópica da superfície superior do prisma; (c) Imagem microscópica de um vidro polido (imagem de referência).	72
3.14	(a) Foto do prisma fabricado; (b) Imagem microscópica da superfície superior do prisma; (c) Imagem microscópica de um vidro polido (imagem de referência).	74
3.15	<i>Sputtering</i> utilizado na deposição do filme fino de ouro.	76
3.16	Curva utilizada na deposição do filme fino de ouro.	76

4.1	Estrutura da plataforma de testes utilizada para o modo WIM, apresentando (a) o diagrama de blocos e (b) uma foto com os elementos utilizados para geração e adequação dos feixes luminosos, a fibra óptica. Na foto, o espectrômetro não é ilustrado.	80
4.2	Distribuição espectral do sinal de saída do diodo de luz branca utilizado nos experimentos.	81
4.3	Estrutura da plataforma de testes utilizada para o modo AIM, apresentando (a) o diagrama de blocos e (b) uma foto com os elementos utilizados para geração e adequação dos feixes luminosos e a câmera CCD utilizada.	83
4.4	Espectro do sinal refletido de um prisma SPR, após a normalização.	87
4.5	Refletividades normalizadas de 4 prismas SPR.	88
4.6	Espectro de um prisma SPR para as polarizações tipo p e tipo s	89
4.7	Refletividades normalizadas calculadas para as soluções de água destilada, etanol a 10% e 0,20M de NaOH.	90
4.8	Refletividade normalizada para o prisma óptico no modo AIM.	91
4.9	Interface gráfica do programa desenvolvido em LABVIEW.	92
4.10	Resultados para dois prismas ópticos polidos, um que passou pelo processo de recozimento (prisma 1) e outro que não (prisma 2).	93
4.11	Resultados para soluções de água destilada, etanol e NaOH.	94
A.1	Interface metal-dielétrico mostrando o perfil do campo elétrico evanescente.	104
B.1	Plano de incidência de uma onda luminosa com componentes paralelo e perpendicular ao plano do campo elétrico. Um polarizador é utilizado para remover a componente perpendicular.	109

Capítulo 1

Introdução

As técnicas, métodos e procedimentos de diagnóstico de doenças, patógenos e contaminantes na área da medicina, indústria de alimentos e monitoramento do meio ambiente, respectivamente, são realizadas normalmente em laboratórios de grandes universidades, empresas e órgãos governamentais. Geralmente são processos com um tempo de análise de dias a semanas, com um alto custo associado e a necessidade de profissionais experientes e capacitados para a sua operação, tendo em vista à clara necessidade de um correto diagnóstico. No caso das epidemias virais ou bacterianas, infecção de corpos d'água, infestação de pragas em plantações agrícolas, pesticidas em corpos d'água destinados ao consumo e outros problemas emergenciais de saúde pública que exigem ações imediatas, o diagnóstico convencional pode não ser adequado e suficiente para atender a demanda. Por outro lado, um diagnóstico errado pode ocasionar a progressão da doença ou da infecção para formas mais graves.

O Ministério da Saúde no Brasil tem envidado esforços, nos últimos anos, na pesquisa de técnicas de diagnóstico mais precisas e rápidas para o vírus H1N1 (gripe A), o vírus da dengue, a bactéria da leptospirose, entre outras doenças [1]. Esses novos testes usam substratos descartáveis, à semelhança de um teste de gravidez, em que uma gota de sangue do paciente é coletada e utilizada para os testes de diagnóstico. Esses testes são genericamente chamados Imunoensaios e se baseiam na interação antígeno-anticorpo. Em relação aos testes convencionais de laboratório, os imunoensaios, além de serem eficientes e possuírem menor custo, propiciam a redução do tempo de diagnóstico [2].

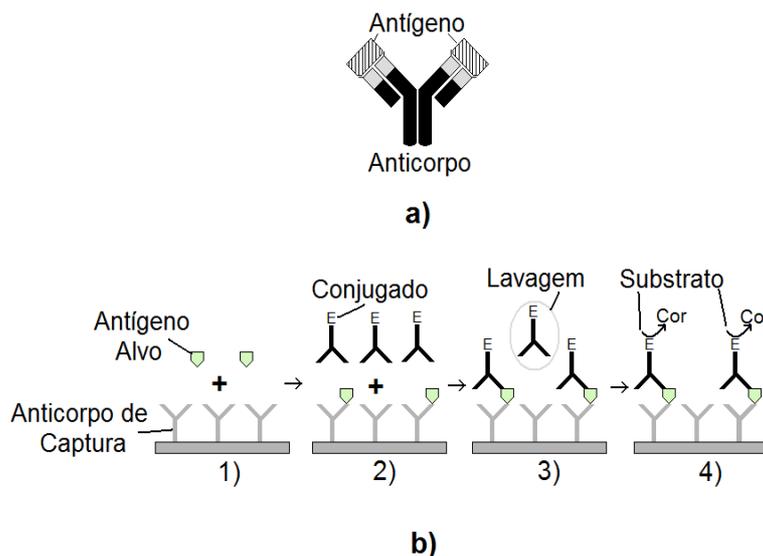


Figura 1.1: (a) Estrutura de um anticorpo, apresentando a ligação com um antígeno específico; (b) Exemplo de um imunoensaio, com a descrição das etapas da interação antígeno-anticorpo e detecção/quantificação usando método colorimétrico.

1.1 Imunoensaio

O imunoensaio (*immunoassay*) é um método de diagnóstico que utiliza a capacidade de um anticorpo ligar-se química e especificamente a uma única molécula ou um grupo muito limitado de moléculas, que é denominada de antígeno. Um anticorpo, ou imunoglobulina ou gamaglobulina, é uma proteína¹ em forma de Y [4,5], conforme é mostrado na Fig. 1.1a. Num organismo vivo, os antígenos correspondem a partículas estranhas (vírus, bactéria, toxinas, fungos, entre outras macromoléculas), que são identificadas pelo organismo. O sistema imunológico (células brancas) produz os anticorpos específicos para os determinados antígenos. Esses anticorpos se ligam aos antígenos e os destroem, eliminando a doença. Os anticorpos podem ser de cinco tipos, basicamente, dependendo das diferenças das sequências dos aminoácidos presentes no anticorpo, que são comumente detectadas por testes sorológicos [4, 5]: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A sigla “Ig” significa Imunoglobulina.

Num imunoensaio, a ligação antígeno-anticorpo, altamente específica e sensível, é uti-

¹É uma macromolécula, formada de aminoácidos, que participa de funções vitais dos organismos vivos, tais como na replicação e reparação do DNA (*Deoxyribonucleic Acid*), no transporte de sangue e na regulação do metabolismo, entre outras funções [3]

lizada para a detecção de proteínas, vírus, bactérias entre outras substâncias que estão presentes em uma amostra fluídica, que pode ser de sangue, saliva, solução aquosa, entre outras. Neste sentido, o anticorpo ou antígeno do vírus, bactéria, etc., é imobilizado e o antígeno ou o anticorpo a ser detectado é imerso ou entra em contato e uma ligação não-covalente ocorre. Para identificação e quantificação da substância em análise (analito), normalmente é associado um marcador fosforescente, luminescente, radioativo, enzimático, molecular e nano-particular, que se liga a um substrato e geralmente uma mudança físico-química é observada, como a alteração da cor. Utilizando esse procedimento, a presença ou não do analito e a quantidade (massa ou concentração) da mesma pode ser medida [2,4–6].

O procedimento de detecção de um antígeno por um anticorpo num imunoensaio típico é ilustrado na Fig. 1.1b. As etapas de realização podem ser assim descritas:

1. Sobre uma superfície plástica ou vítrea, os anticorpos de detecção ou captura são imobilizados. Tal imobilização envolve, normalmente, etapas anteriores de limpeza da superfície, imobilização dos anticorpos, e retirada de excesso de material de captura. Isso se realiza usando processos de lavagem com soluções aquosas adequadas para a determinada aplicação. Esse procedimento inicial é também conhecido na literatura como **funcionalização da superfície**. Há nessa etapa também a captura do antígeno na solução analítica;
2. Um segundo anticorpo que é ligado a uma enzima (o chamado conjugado) é adicionado. Outro tipo de marcador poderia ser aqui utilizado. Esse anticorpo liga-se com o antígeno alvo;
3. Nessa etapa ocorre uma limpeza da superfície, através de um processo de lavagem, para remover componentes não ligados;
4. O substrato é adicionado e uma reação química ocorre com o substrato e uma cor é produzida. Finalmente, a reação enzimática para e o nível de coloração (associado à massa ou concentração do antígeno alvo) é medida.

Vale ressaltar que na estrutura do imunoensaio da Fig. 1.1b, caso o antígeno alvo não esteja presente na solução, as etapas (2), (3) e (4) não ocorrem, o que atesta a alta especificidade e sensibilidade desse método de diagnóstico.

Vários métodos e técnicas de diagnóstico são baseadas nos procedimentos dos imunoenaios. Entre eles, o teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é o método mais tradicional de diagnóstico e o mais preciso e sensível [7,8].

1.2 ELISA

O teste imunológico ELISA ou EIA (*Enzyme Immunoassay*), é um ensaio imunológico usado para detectar e quantificar analitos tais como proteínas, anticorpos e hormônios [9]. O procedimento do ELISA é semelhante ao apresentado no esquema da Fig. 1.1b, onde um antígeno é imobilizado a uma superfície. Depois ele é ligado a um anticorpo que possui uma enzima. Um substrato é acrescentado ao sistema e a reação enzimática é convertida num produto detectável e que normalmente apresenta coloração [9].

Geralmente, o ELISA é realizado em pratos de poliestireno de 96 ou 384 poços. O exemplo de um ELISA, para um prato de 96 poços, é ilustrado na Fig. 1.2a para um prato de 96 poços. Nesta figura, também são apresentados os elementos do imunoensaio, ou seja, o anticorpo imobilizado, o antígeno, a enzima e o substrato que, sob a ação da reação enzimática, muda a coloração do poço. Isso indica a presença do analito e usando um espectrômetro, fluorímetro, luminômetro ou outro instrumento adequado, a quantidade de analito pode ser medida. A escolha do substrato depende da sensibilidade desejada e dos instrumentos utilizados. Além disso, embora no presente diagrama o anticorpo tenha sido imobilizado, geralmente o antígeno é imobilizado e, neste caso, a enzima é ligada no anticorpo. Conforme o modo de ligação da enzima ao par antígeno-anticorpo, há vários tipos de ELISA, sendo que as mais comuns usam ligação [9]:

1. Direta, em que a enzima é ligada diretamente ao anticorpo primário (Fig. 1.2b-1);
2. Indireta, onde um segundo anticorpo (anticorpo de detecção), ligado a enzima, reconhece o anticorpo de captura (Fig. 1.2b-2);
3. Com proteínas como a estreptavidina, que se liga a um anticorpo de captura que é ligado a outra proteína, a biotina (Fig. 1.2b-3).

Os anticorpos monoclonal ou mono-específico e policlonal podem ser utilizados como

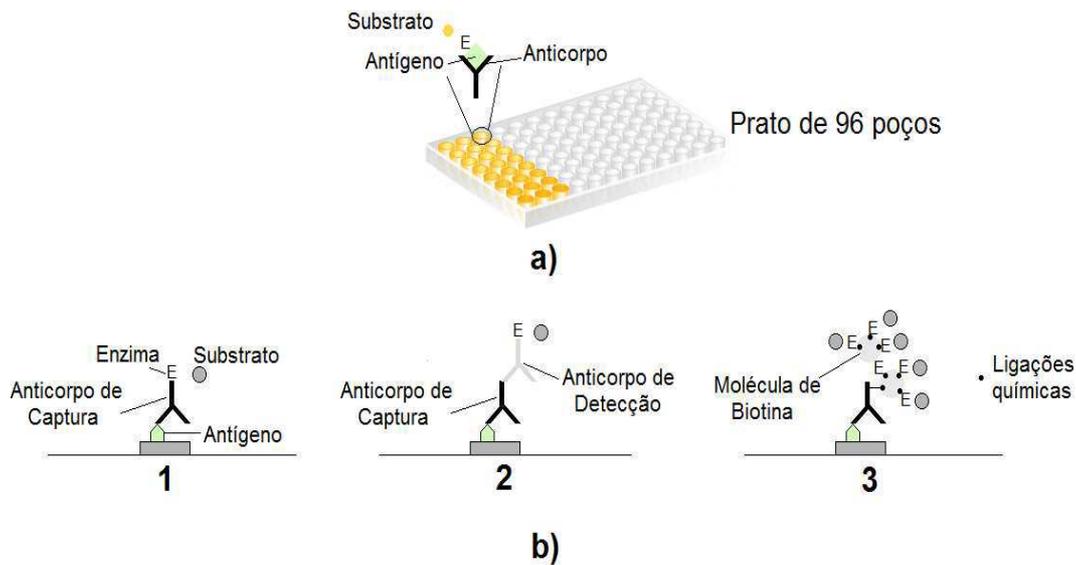


Figura 1.2: (a) Prato de poliestireno com 96 poços, ilustrando a reação enzimática e a mudança de cor com a adição do substrato; (b) Tipos de ELISA.

anticorpos de captura e detecção [9]. Na produção dos anticorpos monoclonais, os mesmos anticorpos são sempre produzidos para o mesmo antígeno, o que não ocorre com os policlonais. Portanto, os monoclonais são preferidos para uso como anticorpos de detecção, enquanto que os policlonais são usados como anticorpos de captura [9, 10]. Todavia, devido ao custo do anticorpo policlonal ser bem maior do que os monoclonal, os anticorpos monoclonais são, normalmente, escolhidos para realizar ambas as etapas de captura e detecção num ELISA [9, 10].

A simplicidade, a especificidade e a sensibilidade associadas ao processo de ligar uma enzima a um anticorpo de detecção e produzir uma reação colorida na solução, tem levado, ao longo dos anos, o ELISA a ser amplamente explorado para as mais variadas aplicações [8]. Contudo, o ELISA apresenta algumas desvantagens:

- O tempo de diagnóstico é alto (em torno de dias, desde a coleta da amostra), requerendo múltiplas etapas de lavagem e incubação;
- A superfície do poliestireno não é homogênea e as proteínas podem ter ligações diferentes em poços do mesmo prato;
- A presença de materiais contaminantes na amostra pode levar a erros no sistema de

detecção [10];

- A necessidade de se ter um equipamento (espectrômetro, fluorímetro, entre outros) para quantificar o patógeno detectado limita sua utilização para aplicações portáteis e *online*, além de ter um custo relativamente alto;
- Os marcadores modificam a medida precisa das constantes cinéticas, como o equilíbrio químico e interferem nas ligações ou outras interações moleculares. Podem, inclusive, ser tóxicas para as células (células tronco ou primárias, por exemplo), além de promover reações cruzadas de anticorpos [11, 12];
- Para medidas repetitivas, como as necessárias para a detecção de certos patógenos, os poços podem ser deteriorados ou mesmo as substâncias em análise podem sofrer alterações [6]. Neste caso, faz-se recorrência a utilização de vários kits para uma mesma medição, o que encarece o custo final. O kit usado para a detecção do vírus da dengue custa em torno de U\$300,00 [9].

Métodos sem marcadores, como os biosensores, vem sendo pesquisados e utilizados para substituir o ELISA [6].

1.3 Biosensores

Os biosensores são dispositivos analíticos, sem marcadores, que integram uma biocamada, um transdutor elétrico, elementos de condicionamento e processamento do sinal elétrico (Fig. 1.3). Na biocamada, uma substância, denominada bioreceptor, é imobilizada. Os bioreceptores podem ser: enzimas, micróbios, organelas, células de animais ou plantas, tecidos de plantas ou animais, anticorpos, receptores, ácidos nucleicos, DNA, entre outras substâncias [13–15].

O diagrama de blocos de um biosensor é ilustrado na Fig. 1.3. O analito, contido em uma amostra fluídica (gás ou líquido) ou sólida (filme fino, por exemplo), ao entrar em contato com o bioreceptor, imobilizado na superfície do biosensor, produz uma mudança físico-química (variação de calor, índice de refração, resistência, capacitância, etc.) que pode ser identificada por um transdutor elétrico (Fig. 1.3). O sinal elétrico resultante é então

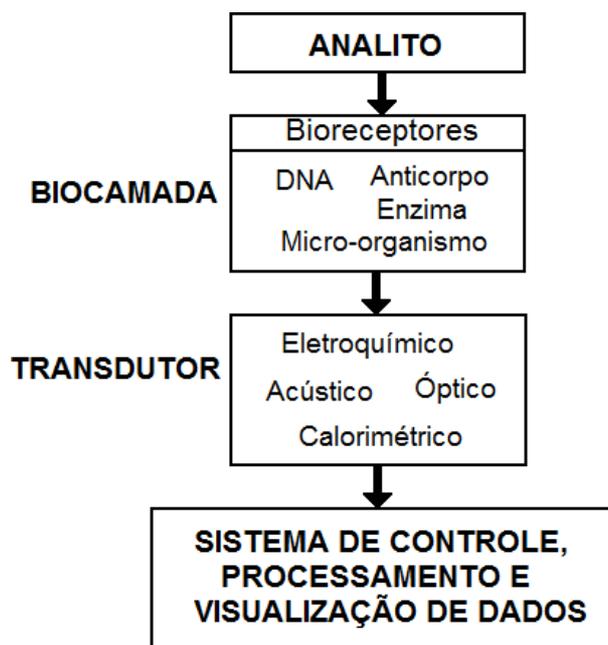


Figura 1.3: Diagrama de blocos de um biosensor

adquirido e processado. O sistema de aquisição, processamento e visualização dos dados informa ao usuário se o analito foi ou não detectado e também informa a quantidade de analito na amostra [13, 16].

1.3.1 Tipos de Biosensores

Conforme a biocamada utilizada, os biosensores podem ser classificados em [13]:

- Biosensores enzimáticos: usam enzimas como elementos bioreceptores, como é o caso da oxidase de glicose utilizada na medição de glicose no sangue. Além do uso de oxidase de glicose, várias outras enzimas são utilizadas na construção de biosensores, tais como a urase, a penicilinase e a dehidrogenase de álcool [13, 14, 17];
- Imunobiosensores: são biosensores que monitoram as interações do par anticorpo-antígeno, nas quais o anticorpo ou o antígeno são imobilizados na superfície [5]. Esses biosensores têm revolucionado as técnicas convencionais de imunoenaios, pois não necessitam de marcadores e têm habilidade para investigar a reação dinâmica na ligação anticorpo-antígeno. Ademais, os imunobiosensores podem facilitar a regeneração do componente imobilizado, maximizando, assim, o uso do reagente, que no caso dos

dispositivos convencionais pode ser utilizado apenas uma única vez. A sensibilidade de um imunobiossensor depende da afinidade e da especificidade da ligação e do ruído do sistema transdutor. Entre os analitos que podem ser investigados pelos imunobiossensores estão os hormônios (esteróides e hormônios pituitários), drogas, vírus, bactérias e poluentes ambientais (pesticidas, por exemplo) [5].

- Biosensores celulares: Estes biosensores utilizam microorganismos, especialmente, para o monitoramento ambiental de poluentes. As células são incorporadas à superfície de um eletrodo, sendo o princípio de operação muito semelhante aos biosensores enzimáticos, contudo apresentam custo reduzido, maior atividade catalítica e estabilidade [13, 14].

Já conforme o transdutor, os biosensores podem ser classificados em [13]:

- Biosensores eletroquímicos: Os biosensores eletroquímicos consistem de dois componentes - um elemento biológico que reconhece o analito alvo e o transdutor (eletrodo) que "traduz" o evento de bio-reconhecimento em um sinal elétrico útil [18]. Os biosensores eletroquímicos podem ser de três tipos [13, 19]: **Biosensor potenciométrico:** realiza o monitoramento da diferença de potencial entre um indicador e um eletrodo de referência ou dois eletrodos de referência separados por uma membrana, na condição de corrente zero fluindo entre eles. Os biosensores eletroquímicos mais comuns são aqueles baseados nos eletrodos pH; **Biosensor amperométrico:** monitora a corrente resultante da oxidação eletroquímica ou da redução de uma espécie eletro-ativa em um potencial constante; **Biosensor condutométrico:** monitora as mudanças nas concentrações iônicas;
- Biosensores ópticos: são biosensores que se baseiam em mudanças nas propriedades ópticas das substâncias, com o fito de monitorar a concentração do analito. Entre as propriedades ópticas que podem ser utilizadas estão: absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência, refletividade e comprimento de onda. Assim, há os seguintes tipos de biosensores ópticos decorrentes [14, 20, 21]: biosensores de fibra óptica; biosensores baseados no princípio de ressonância de plásmons de superfície (SPR - *Surface Plasmon Resonance*); biosensores de absorção; biosensores de luminescên-

cia; biosensores baseados no espalhamento da luz. Entre as vantagens dos biosensores ópticos, em relação aos outros tipos já apresentados estão o seu tamanho reduzido, a velocidade de resposta, a facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético, boa biocompatibilidade e não-necessidade de elementos ativos na biocamada. Devido a essas vantagens, os biosensores ópticos, atualmente, estão sendo utilizados nas mais variadas aplicações [21, 22].

- Biosensores acústicos: Esses biosensores são baseados na propriedade da piezo-eletricidade que os cristais anisotrópicos (quartzo, por exemplo) possuem. Quando é aplicada uma tensão alternada a este biossensor, o cristal oscila com uma determinada frequência, sendo tal frequência relacionada à massa e às constantes elásticas do cristal. O mais antigo e conhecido biossensor acústico é a Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM - *Quartz-Crystal Microbalance*), que é utilizada em várias aplicações e é também facilmente integrável [23].
- Biosensores calorimétricos: Os biosensores calorimétricos usam o calor gerado por reações catalisadoras de enzimas exotérmicas para medir a concentração do analito. As mudanças de temperatura são geralmente determinadas por termistores de alta sensibilidade [24].

1.3.2 Biosensores ópticos baseados no princípio SPR

Dentre os biosensores, os biosensores ópticos baseados no princípio de Ressonância de Plásmons de Superfície ou SPR (*Surface Plasmon Resonance*) são bastante utilizados atualmente [25, 26]. O diagrama de blocos de um biosensor SPR é ilustrado na Fig. 1.4. A integração do elemento de acoplamento (substrato óptico) e o filme fino metálico formam o **biochip**. Adicionado a estes, há os elementos de geração e detecção da fonte luminosa p-polarizada, componentes ópticos e sistema de aquisição, processamento e visualização.

Eles são assim caracterizados [25, 27–29]:

- Elevada sensibilidade, sendo uma alternativa interessante ao ELISA na detecção de doenças [30], de proteínas em bebidas lácteas [31], no monitoramento de pesticidas [32], entre outros [22, 33];

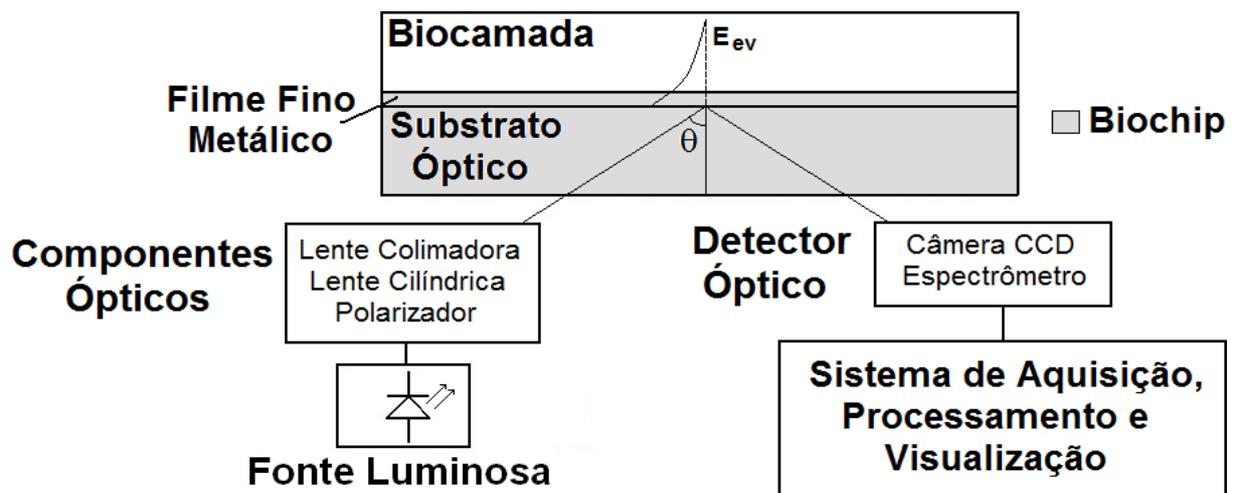


Figura 1.4: Diagrama de blocos de um biosensor SPR, onde o biochip é formado pelo substrato óptico e o filme fino metálico

- Não requer a utilização de marcadores fosforescentes, luminescentes, colorimétricos e radioativos, entre outros, para identificação e quantificação do analito;
- Possibilidade de integração em um chip, possibilitando a construção dos Testes Laboratoriais Remotos (TLR) ou *point-of-care diagnosis* e dos *Lab-On-Chip* ou LOC, cuja pesquisa nas últimas décadas tem propiciado ferramentas de diagnóstico de menores dimensões e com possibilidade de medição em tempo real no local de coleta do material para diagnóstico [34,35]. Usando um processo de telemetria, por exemplo, um usuário (médico, operador ou outro profissional) pode visualizar os resultados e monitorar o paciente ou ambiente que esteja sob investigação. Além disso, a precisão e sensibilidade das medidas é alta e comparável aos testes ELISA [30–32,36].

Diante das características supracitadas, os biosensores SPR tem sido já utilizados nos últimos anos para o diagnóstico de doenças [37–39], patógenos em alimentos [25,40] e contaminantes em água [41–43]. Estudos comparativos da tecnologia SPR com o ELISA tem indicado que o desempenho do biosensor SPR para diagnóstico é bastante similar ao obtido pelo ELISA. Portanto, os biosensores SPR constituem-se em ótimas ferramentas de diagnóstico.

1.4 Objetivos e metodologia

Este trabalho tem como objetivo principal apresentar o projeto e a realização de um biochip óptico, denominado PPBIO (Prisma Polimérico para aplicações BIOLógicas), descartável e de baixo custo para aplicações biológicas, baseado no princípio SPR.

O substrato óptico do PPBIO é um prisma fabricado com um polímero usando métodos de moldagem por injeção. A geometria do prisma é trapezoidal, onde as faces laterais inclinadas são especulares. O filme fino de ouro de 50 nm é depositado na face superior do prisma, usando o método de pulverização catódica ou *sputtering*.

O biochip óptico SPR apresentado nesta tese, usando como substrato um prisma óptico, é o primeiro construído no Brasil.

Para a construção do prisma foi utilizada uma máquina de moldagem por injeção, na qual prismas de 10 e 20 mm de largura foram construídos. Sob a parte central superior do prisma foi depositado um filme fino de ouro de 50 nm. Além disso, o PPBIO apresenta uma estrutura simples e pode ser usado com fontes luminosas incidentes policromática (diodo de luz branca) ou monocromática (diodo laser).

Para avaliar os dispositivos construídos, foram realizados testes experimentais preliminares usando plataformas de testes, com fontes luminosas policromática e monocromática. Nessas plataformas, não estavam inclusos quaisquer mecanismos de manipulação de fluidos e outros componentes normalmente presentes em biosensores SPR [25,26]. Nos testes preliminares, o biochip entrou em contato com três substâncias diferentes: água destilada, etanol e hidróxido de sódio. O objetivo principal desses experimentos foi verificar a ocorrência do fenômeno SPR para as três substâncias e, conseqüentemente, comprovar a mudança da refletividade da curva SPR com a mudança do índice de refração da substância depositada sob o filme fino de ouro. Usando os dados desses testes preliminares e do projeto, dois artigos foram aceitos para publicação em duas conferências internacionais, especializadas na área de biosensores, em setembro e em maio de 2010.

Portanto, a geometria simples aliada ao método de fabricação usando moldagem por injeção são fatores que reduzem sobremaneira o custo de fabricação, que fica em torno de U\$1,00 para cada prisma. Além disso, o PPBIO é descartável e, dessa forma, é um forte candidato como ferramenta de diagnóstico e na construção de dispositivos do tipo TLR.

1.5 Sinopse dos Capítulos

O trabalho aqui proposto está assim organizado:

- **Capítulo 2 - Fundamentos teóricos dos Biosensores SPR:** neste capítulo serão apresentados os fundamentos teóricos dos biosensores SPR, com as definições, características básicas, biosensores comerciais, vantagens, operação e limitações operacionais.
- **Capítulo 3 - Prisma óptico SPR: projeto e construção:** este capítulo apresentará os detalhes da arquitetura para o substrato óptico do biosensor SPR proposto. Resultados de simulações ópticas de traçado de raios são apresentados. A metodologia de fabricação dos prismas ópticos SPR, usando uma máquina de moldagem por injeção, e o processo de deposição do filme de ouro fino sobre o biosensor SPR serão delineados neste capítulo.
- **Capítulo 4 - Testes experimentais: resultados e discussões:** este capítulo apresentará os resultados experimentais obtidos na realização deste trabalho usando fontes luminosas policromática e monocromática e as discussões associadas.
- **Capítulo 5 - Conclusões e trabalhos futuros:** finalmente serão apresentadas as conclusões e trabalhos futuros do trabalho aqui proposto.
- **Capítulo 6 - Publicações realizadas durante o período do doutorado:** aqui são apresentadas as publicações em periódicos e conferências nacionais e internacionais aprovadas durante o período do doutorado.
- **Apêndice A - Princípios da física e matemática do fenômeno SPR:** apresenta os fundamentos físicos e matemáticos do fenômeno de ressonância de plásmons de superfície.
- **Apêndice B - Definições de alguns termos da óptica:** aqui são apresentados conceitos utilizados na tese, como traçado de raios e polarização.

Capítulo 2

Fundamentos teóricos dos biosensores

SPR

Neste capítulo serão apresentados um breve histórico e a descrição do fenômeno SPR, a definição de um biosensor óptico SPR, suas configurações, exemplos de biosensores comerciais, características de desempenho, procedimentos e limitações operacionais.

2.1 Histórico do fenômeno SPR

Em 1902, R. W. Wood [44] observou numa gratícula de difração que, ao incidir luz branca, para certos ângulos de incidência, algumas bandas ou faixas escuras eram detectadas, e a magnitude da refletância correspondente era reduzida. Wood denominou o fenômeno como “anomalias”. Em 1907, Ze-neck verificou, na fronteira de um metal e um dielétrico, a ocorrência de ondas eletromagnéticas de superfície [45]. Ritchie, em 1957, comprovou a hipótese de Ze-neck e denominou as ondas eletromagnéticas de excitações de plásmons de superfície [46]. Um ano mais tarde, Turbadar observou, acidentalmente, que incidindo feixes luminosos polarizados na fronteira de um filme metálico e um substrato óptico, a refletância da luz incidente era reduzida conforme valores específicos do ângulo de incidência e do comprimento de onda da luz incidente [25].

Em 1968, Otto demonstrou que a redução da refletância, para uma interface metal-dielétrico, era devida à interação entre os fótons incidentes e as oscilações longitudinais

existentes na superfície do metal, que foram denominadas de plásmons de superfície [25, 27, 46]. O fenômeno decorrente da interação entre os fótons incidentes e os plásmons de superfície foi denominado de ressonância de plásmons de superfície ou SPR.

A estrutura proposta por Otto [27] consistia de três camadas assim organizadas (Fig. 2.1a): um prisma óptico para acoplamento da luz; um dielétrico (ar); e o filme metálico. Contudo, o “gap” de ar entre o prisma e a superfície metálica era uma restrição à aplicabilidade dessa estrutura. Esta configuração é útil para o estudo de polarizações de fónons¹ de superfície em cristais simples e para medição da espessura de filmes finos [27].

No mesmo ano da descoberta de Otto, Kretschmann e Raether apresentaram uma configuração modificada, em que as camadas do dielétrico e do metal foram invertidas, ou seja, sem a presença do “gap” de ar entre o prisma e o metal, conforme é ilustrado na Fig. 2.1b [27]. Essa nova estrutura foi denominada de estrutura de reflexão total atenuada ou ATR (*Attenuated Total Reflection*) e é a mais utilizada até hoje para aplicações usando o fenômeno SPR [27]. Ambas as proposições de Otto e Kretschmann-Raether utilizam um prisma óptico para acoplar os feixes luminosos de entrada à interface metal-dielétrico [28, 48].

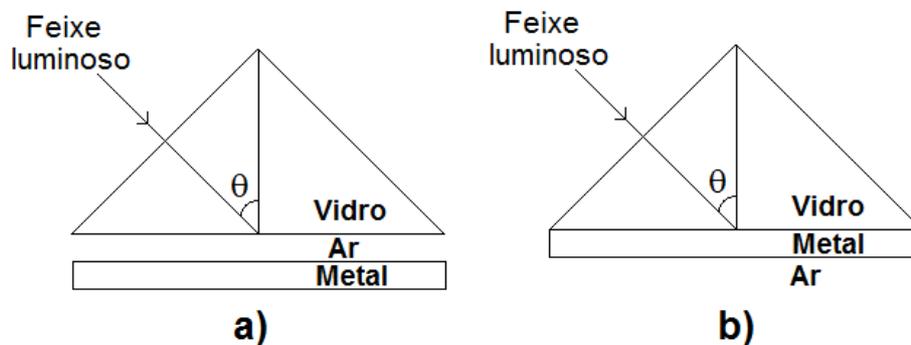


Figura 2.1: Estruturas de excitação dos plásmons de superfície, propostas por (a) Otto e (b) Kretschmann-Raether.

Portanto, Otto e Kretschmann-Raether comprovaram que ondas de plásmons de superfície (SPW - *Surface Plasma Wave*), existentes na interface metal-dielétrica, eram as responsáveis pelo aparecimento de bandas ou faixas escuras no detector óptico. A próxima seção apresentará a descrição mais detalhada do fenômeno SPR. No Apêndice A, a física e

¹Fónon é o quantum da energia de uma vibração da rede cristalina de um material, sendo chamado, assim, em analogia ao fóton da energia luminosa [47]

matemática dos plásmons de superfície é apresentada de modo resumido.

2.2 Fenômeno SPR

Um feixe luminoso incide no prisma óptico da estrutura ATR com um ângulo, θ , conforme é ilustrado na Fig. 2.2. Esse ângulo θ deve ser maior que o ângulo crítico, o que propicia, considerando que o feixe se desloca de um meio com menor índice de refração (ar) para um meio de maior (metal), a ocorrência do fenômeno de reflexão interna total [49]. Numa situação ideal, a energia luminosa incidente deveria ser refletida. Todavia, conforme foi comprovado por Kretschmann-Raether e Otto, parte ou toda a energia luminosa é absorvida pela interface metal-dielétrico. Nessa situação, o campo elétrico evanescente, E_{ev} , surge e a energia luminosa transmitida interage com as ondas de plásmons de superfície (ver maiores detalhes no Apêndice A). Essa situação corresponde ao fenômeno SPR e a refletividade ou refletância² do feixe luminoso de entrada é reduzida ou, em outras palavras, um mínimo (*dip*) de refletividade (Fig. 2.3) pode ser observado no detector óptico. A penetração das ondas SPWs excitadas é pequena, em torno de centenas de nanômetros (conforme o comprimento de onda da onda luminosa incidente [27]). Assim, modificações nas propriedades físico-químicas do dielétrico alteram a quantidade de energia luminosa incidente que é absorvida ou transmitida. Essa alta sensibilidade superficial é um dos grandes atrativos do fenômeno SPR, especialmente para aplicações biológicas [25, 26].

Na condição de ressonância (Fig. 2.2), o vetor de onda³ do feixe p-polarizado de entrada, k_x (componente paralelo ao plano da interface metal dielétrico), e a parte real do vetor de onda dos plásmons de superfície, $Re(k_{SP})$ ⁴, são iguais e a seguinte relação é válida⁵ [22, 25, 27, 28, 48].

$$k_x = \frac{\omega}{c} n_{os} \sin \theta = Re(k_{SP}) = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.1)$$

onde ω é a velocidade angular do feixe luminoso incidente, c é a velocidade da luz, n_{os} é o

²Parâmetro que indica a quantidade de luz que é refletida.

³representação vetorial de uma onda, no caso eletromagnética

⁴Re() indica a parte real de uma variável complexa

⁵Para o leitor interessado em detalhes da física e matemática associadas ao fenômeno SPR, há livros e revisões na literatura que tratam do fenômeno e acrescentam maiores detalhes à discussão [22, 25, 28, 48, 50].

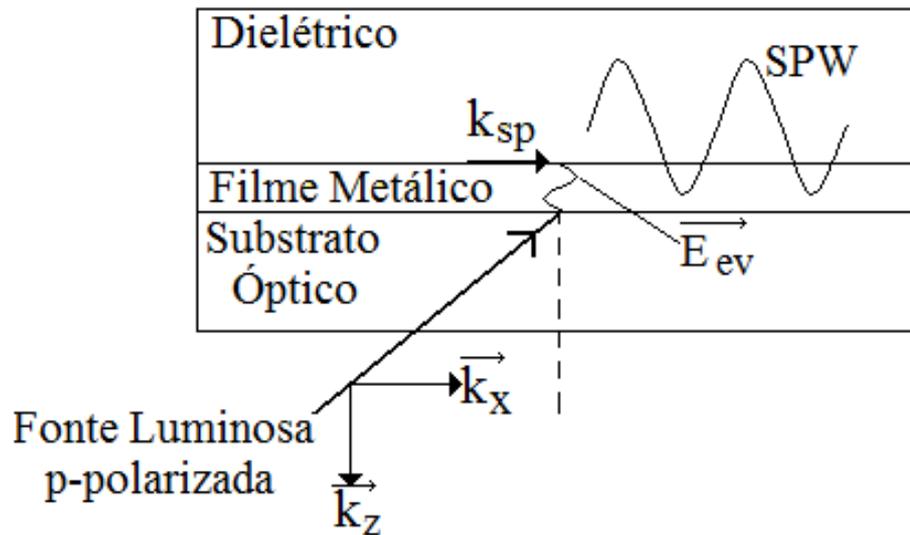


Figura 2.2: Diagrama de blocos de uma interface metal-dielétrico na situação de ressonância dos plásmons de superfície. A onda de plásmons de superfície (SPW) é excitada pelo campo elétrico evanescente E_{ev} .

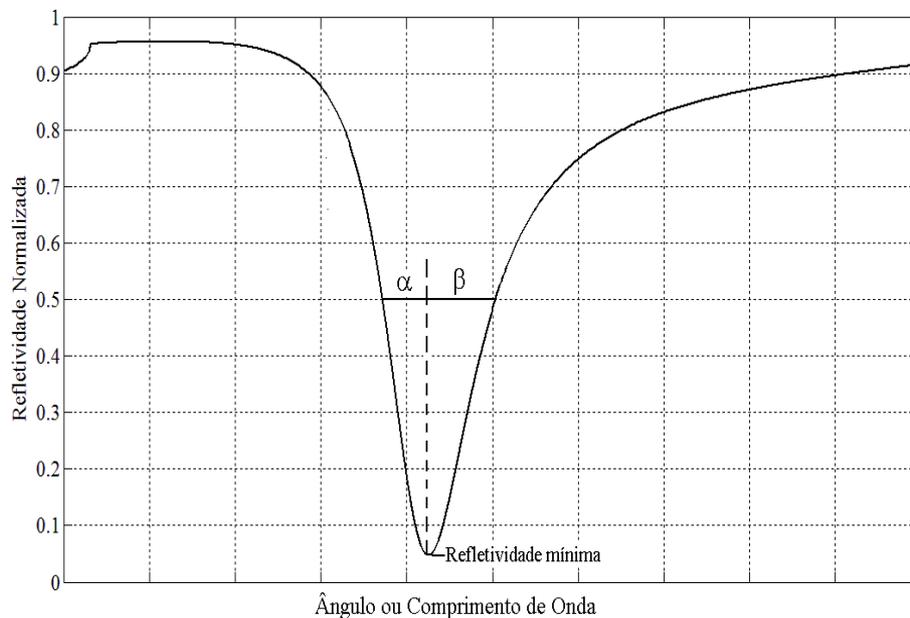


Figura 2.3: Curva de refletividade, com o mínimo de refletividade na condição de ressonância SPR e parâmetros característicos da curva.

índice de refração do substrato óptico, θ é o ângulo de incidência do feixe luminoso, k_{SP} é o vetor de onda dos plásmons de superfície, ε_d é a função dielétrica complexa do dielétrico e ε_m é a função dielétrica complexa do metal.

A condição de igualdade $k_x = Re(k_{SP})$, Eq. (2.1), é válida somente para o caso em que a parte real da constante dielétrica do metal (ε_{mr}) é muito maior que a imaginária (ε_{mi}) [25, 27]. Os metais nobres atendem essa condição e, dentre eles, o ouro e a prata são normalmente utilizados pelos dispositivos SPR [22, 26, 27].

2.3 Sensores e biosensores SPR

A interface metal-dielétrico é o elemento central de um dispositivo SPR (Fig. 2.2). O elemento metálico é geralmente um filme fino que deve ter uma espessura muito menor que o comprimento de onda da luz incidente, tendo em vista que a profundidade de penetração é pequena e a magnitude máxima das oscilações de plásmons de superfície é encontrada na superfície da interface metal-dielétrico, como anteriormente descrito. Conforme mencionado anteriormente, os metais nobres (principalmente, ouro, prata e cobre) são os elementos metálicos adequados para a ocorrência do fenômeno SPR [25, 27, 28, 51]. Normalmente, o ouro é preferido para uso em dispositivos SPR por ser inerte quimicamente, embora a utilização da prata aumente a sensibilidade do dispositivo. Recentemente, ligas de ouro e prata vêm sendo utilizadas com o objetivo de aumentar a sensibilidade SPR em relação às proposições que usam apenas ouro ou prata [52, 53]. O dielétrico pode ser simplesmente uma solução aquosa ou um gás, ou outro material de natureza fluídica ou sólida (filme fino, normalmente).

Num dispositivo SPR deseja-se, normalmente, detectar um determinado dielétrico e quantificá-lo. Quando a inclusão de um dielétrico ou a modificação de suas propriedades físico-químicas altera diretamente o mínimo de refletividade, o dispositivo é denominado **Sensor SPR**. Quando alguns dielétricos são adicionados, como a camada de imobilização e elementos bioreceptores, a presença do analito de interesse é detectada/quantificada indiretamente pela medida do deslocamento do mínimo de refletividade. Neste caso, o dispositivo é denominado como **Biosensor SPR** [22, 25, 26].

2.4 Condições necessárias para excitação dos plásmons de superfície

As condições necessárias para excitação e ocorrência do fenômeno SPR num biosensor SPR são [25, 27]:

1. Os feixes luminosos devem ser polarizados, com polarização tipo p. Neste caso, a polarização ocorre paralela ao plano de incidência e há componentes horizontal e vertical [25, 28];
2. A espessura do filme fino de ouro deve ser muito menor que o comprimento de onda da luz incidente;
3. Não é possível excitar os plásmons de superfície incidindo os feixes luminosos diretamente na superfície do filme metálico, devido à não coincidência entre os vetores de onda dos fótons e dos plásmons de superfície [27, 48]. Portanto, um substrato óptico é inserido para aumentar a magnitude do vetor de onda e assim propiciar a igualdade dos vetores de onda de ambas as partículas. Fibra óptica, guia de onda, prisma óptico e grade de difração são as alternativas mais utilizadas na literatura como substrato óptico [25, 26];
4. Reflexão interna total - a onda luminosa deve incidir na superfície do filme fino metálico em um ângulo oblíquo superior ao ângulo crítico. O feixe luminoso desloca-se do meio de maior índice de refração n_1 (substrato óptico) para o meio de menor, n_2 (metal) [54]. A princípio, não deveria haver a transmissão da energia luminosa do meio n_1 para n_2 . Todavia, observa-se que a componente do campo eletromagnético penetra alguns nanômetros no meio n_2 , o que excita a onda de plásmons de superfície. Uma onda eletromagnética evanescente é criada e sua amplitude diminui exponencialmente com a distância da interface [54]. A amplitude do campo evanescente, E_{ev} , diminui exponencialmente com a distância da interface, e o seu valor máximo é alcançado na superfície da interface [27];

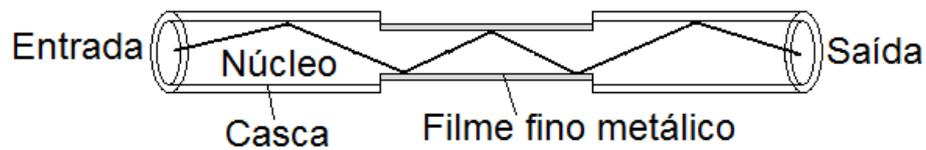


Figura 2.4: Estrutura de um biosensor SPR, usando uma fibra óptica como substrato óptico.

2.5 Substratos ópticos utilizados para a excitação dos plásmons de superfície

Para que o acoplamento óptico fóton-plásmon ocorra, três substratos (acopladores) ópticos são geralmente utilizados para construção dos biochips SPR:

2.5.1 Prisma óptico

É o substrato mais usado para o desenvolvimento de biosensores SPR. A Fig. 2.1b apresenta a configuração de Kretschmann-Raether com um prisma como substrato óptico. O raio de luz incide na superfície do substrato em um ângulo oblíquo θ . O feixe é refletido, as ondas de plásmons de superfície ou SPW (*Surface Plasmon Waves*) são excitadas e o mínimo de refletividade pode então ser detectado.

2.5.2 Guia de onda óptico e fibra óptica

Um guia de onda óptico ou uma fibra óptica são estruturas que também são utilizadas como substratos ópticos para biosensores SPR [22, 45]. A Fig. 2.4 apresenta um pedaço de fibra óptica com o núcleo descoberto (sem casca) na região central. A mesma configuração é utilizada para guias de onda [22]. Na região central da fibra, o filme fino metálico é depositado. Uma onda luminosa é transmitida através da fibra óptica (ou guia de onda) e entra em contato com a superfície metálica. Nas condições de reflexão interna total, os fótons incidentes na região central são transmitidos e excitam as ondas SPW. A redução na potência transmitida pela fibra óptica (ou guia de onda) é observada no detector óptico, indicando a ocorrência do fenômeno SPR.

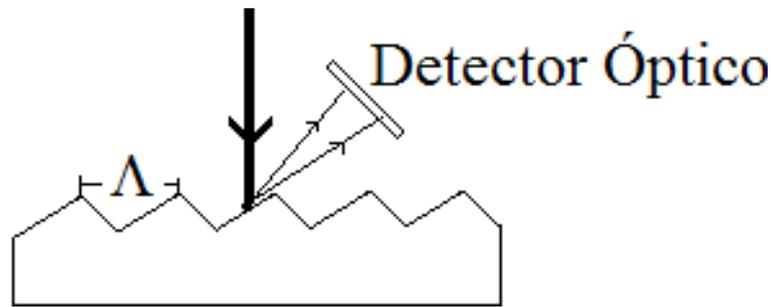


Figura 2.5: Estrutura da graticula ou grade de difração

2.5.3 Graticula ou grade de difração

Se uma onda luminosa incide em uma graticula ou grade de difração, conforme ilustrado na Fig. 2.5, com uma constante de graticula (Λ) igual a de uma superfície rugosa, ondas planares de diferentes ordens de difração são excitadas [22].

A observação do ponto de ressonância é similar ao apresentado pelo prisma óptico, ou seja, através da redução da intensidade da luz refletida.

2.6 Configurações de um biosensor SPR

Um biosensor SPR pode ser operado com fontes de luz de entrada monocromáticas ou policromáticas. Há quatro modos de interrogação que podem ser utilizados [22, 25]:

1. Modo de interrogação angular ou AIM (*Angular Interrogation Mode*): neste caso, a fonte luminosa é monocromática (diodo laser, normalmente) e um elemento fotodetector ou uma câmera CCD detectam o sinal refletido na saída do dispositivo. Aqui, o comprimento de onda do feixe de luz de entrada é mantido constante e o ângulo de incidência é variado. Geralmente, goniômetros e estruturas mecânicas rotativas são utilizadas para variar o ângulo de incidência [25–27];
2. Modo de interrogação espectral ou WIM (*Wavelength Interrogation Mode*): neste caso, a fonte de entrada é policromática (fonte halógena ou um diodo de luz branca, normalmente) e um espectrômetro detecta o sinal refletido. O comprimento de onda é variado e o ângulo de incidência é mantido constante.

3. Modo de interrogação de fase ou PIM (*Phase Interrogation Mode*): aqui a fonte de entrada é monocromática à semelhança do modo AIM. O comprimento de onda é mantido constante, o ângulo de incidência varia e a fase da curva de refletividade é calculada usando normalmente circuitos complexos [25,27] e há uma complicação para sua construção;
4. Modo de interrogação de intensidade ou IIM (*Intensity Interrogation Mode*): este modo é semelhante ao modo PIM, à exceção de que a intensidade da refletividade é que é monitorada.

Os modos AIM e WIM são os mais utilizados e suas estruturas para um biosensor SPR são apresentadas na Fig. 2.6. Os elementos de geração e detecção luminosa são apresentados também, juntamente com um traçado ideal de raios ópticos. Apenas esses modos de interrogação serão doravante citados neste trabalho.

2.7 Desempenho de um biosensor SPR

Na Fig. 2.3, além da refletividade mínima, que determina o parâmetro conhecido como **posição de ressonância**, há as características da curva α e β . Os parâmetros **assimetria** e **largura de banda** são determinados a partir dos valores de α e β . A **posição de ressonância**, a **assimetria** e a **largura de banda** são parâmetros que possibilitam avaliar a qualidade de um biosensor SPR [55–57].

A largura de banda Γ é calculada pela seguinte relação:

$$\Gamma = \alpha + \beta \quad (2.2)$$

O parâmetro Γ é descrito em termos do FWHM (*full width at half maximum*) da curva SPR.

Já a assimetria G é assim definida:

$$G = \frac{\beta}{\alpha} \quad (2.3)$$

A sensibilidade refratométrica, a faixa dinâmica e o limite de detecção são figuras de mérito normalmente utilizadas como medida de desempenho de biosensores propostos na literatura [25, 26, 55, 56, 58–60].

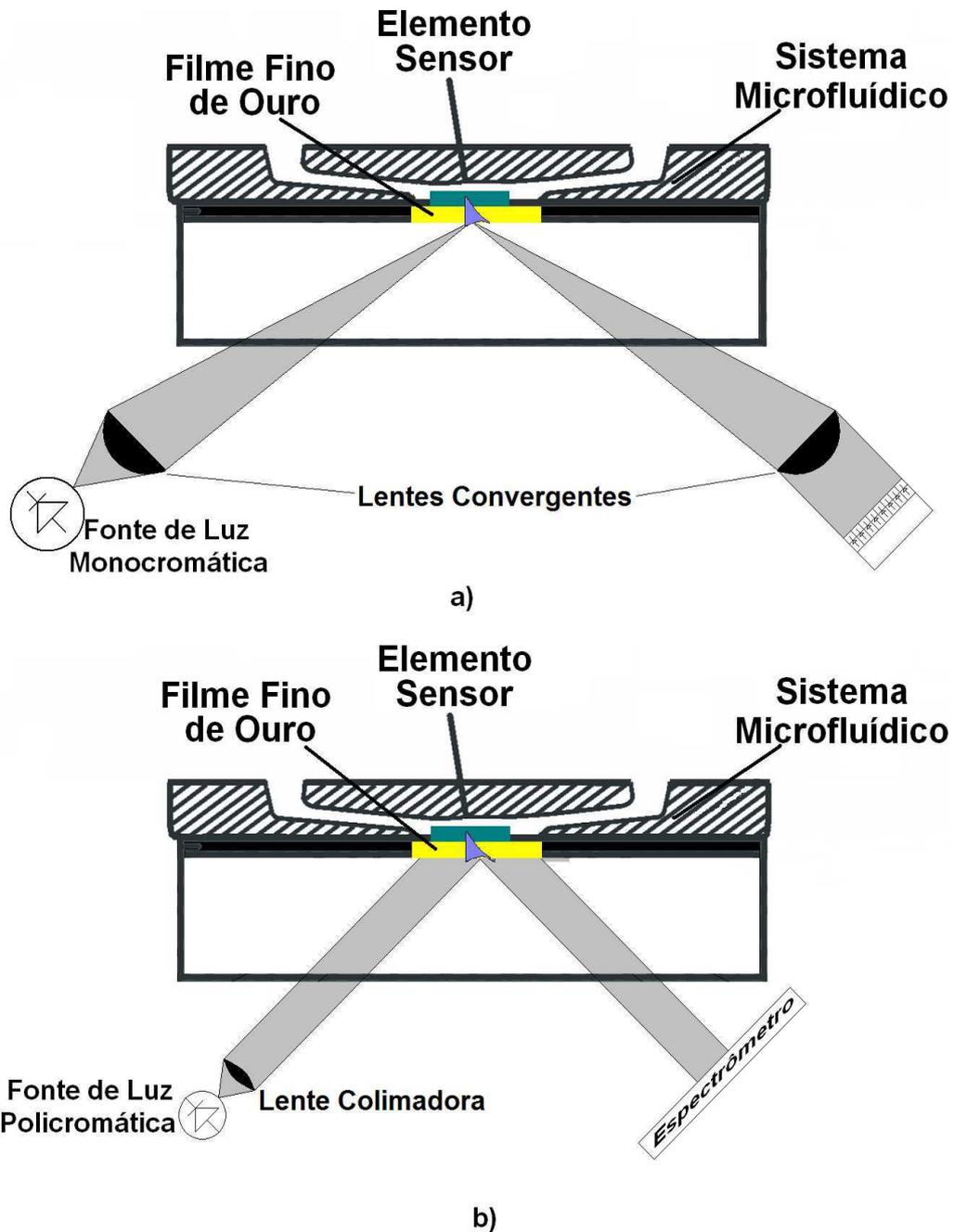


Figura 2.6: Estruturas de um biosensor nos modos de interrogação (a) angular e (b) espectral. Os elementos de geração e detecção luminosa também são apresentados.

A **faixa dinâmica** descreve a faixa de índices de refração ou concentração dos analitos que podem ser medidos pelo biosensor SPR.

O **limite de detecção ou LOD** *Limit of Detection* indica a habilidade de um biosensor detectar um analito, o que é deveras importante na determinação da seletividade do dispositivo.

A **sensibilidade refratométrica** indica a sensibilidade do biosensor em relação ao índice de refração do analito (n_s). Além da utilização do índice de refração, também podem ser utilizados para definir a sensibilidade, a concentração e mudanças na curva de calibração do dispositivo [25]. A sensibilidade refratométrica, S_{RI} , é assim definida:

$$S_{RI} = \frac{\partial Y}{\partial n_s} \quad (2.4)$$

em que Y é o parâmetro de saída, ou seja, o comprimento de onda ou o ângulo de ressonância, conforme o modo de interrogação, AIM ou WIM, utilizado.

2.8 Características e operação de um biosensor SPR

Conforme a aplicação, várias substâncias podem formar a biocamada de um biosensor SPR (Fig: 1.4). A operação de um biosensor é semelhante a de um imunoensaio (Fig. 1.1). A primeira etapa corresponde à funcionalização da superfície metálica. Trata-se de uma nanocamada de 2 a 5 nm, normalmente, que funciona como uma "cola" em que o bioreceptor fica "grudado", ou melhor adsorvido. O elemento de funcionalização da superfície metálica será diferente conforme o bioreceptor e o analito. Exemplos de elementos de funcionalização são a albumina de soro bovino ou BSA (*Bovin Serum Albumin*), albumina de soro humano ou HSA (*Human Serum Albumin*), alkylthiol, entre outros [26].

Após a funcionalização da superfície, há a circulação do analito pelo microcanal. Isso altera o índice de refração, o que é facilmente registrado pelo detector óptico devido à redução na intensidade luminosa da imagem refletida na saída do dispositivo num determinado pixel (esse pixel é associado a um comprimento de onda ou ângulo para os modos WIM ou AIM, respectivamente).

A intensidade luminosa do sinal refletido (resposta SPR) no detector óptico representa o dado bruto (*raw data*), ou seja, no qual vários efeitos, relacionados normalmente à fonte

luminosa e ao detector óptico [25], modificam a forma de onda desse sinal. Neste caso, a reconstrução do sinal SPR é necessária e isso ocorre através de um processo denominado normalização. Inicialmente, cada espectro do sinal é subtraído da corrente escura (*dark current*), que é uma corrente elétrica que circula pelo detector óptico na ausência de feixe luminoso na entrada do biosensor SPR. Após, um sinal de referência (R) é coletado e armazenado, a chamada célula seca ou *dry cell*. O dielétrico, neste caso, é o ar, que possui um índice de refração $n_s = 1$. Estratégias de usar a célula seca com feixes p-polarizados ou s-polarizados de entrada são normalmente relatados na literatura [25, 26, 61].

Após essas etapas iniciais, a solução contendo o analito circula pelo microcanal, que é a célula molhada ou *wet cell* (D) e a normalização do sinal SPR é completada dividindo-se o espectro resultante da circulação desse analito com o espectro de referência armazenado. Portanto, o fator de normalização (FN) é dado pela seguinte relação:

$$FN = \frac{D}{R} \quad (2.5)$$

A partir dos espectros normalizados, o valor do ângulo ou comprimento de onda de ressonância e, conseqüentemente, as variações de índice de refração, de concentração ou outros parâmetros necessários da amostra em análise podem ser computadas pelo elemento de processamento e controle.

As variações do sinal SPR (comprimento de onda ou ângulo de ressonância), índice de refração ou concentração, ao longo do tempo produzem gráficos denominados sensorgramas.

As variações do índice de refração podem ser associadas à variação da concentração do dielétrico adsorvido na superfície metálica, ΔC , através da seguinte relação [25]:

$$\Delta n_s = \left(\frac{dn_s}{dc} \right) \Delta C \quad (2.6)$$

onde dn_s/dc é o incremento do índice de refração do dielétrico por volume.

2.8.1 Exemplo de operação de um biosensor SPR

As etapas do procedimento operacional de um biosensor óptico SPR são ilustradas no exemplo da Fig. 2.5a-g. Neste exemplo, é mostrado o processo de funcionalização da superfície

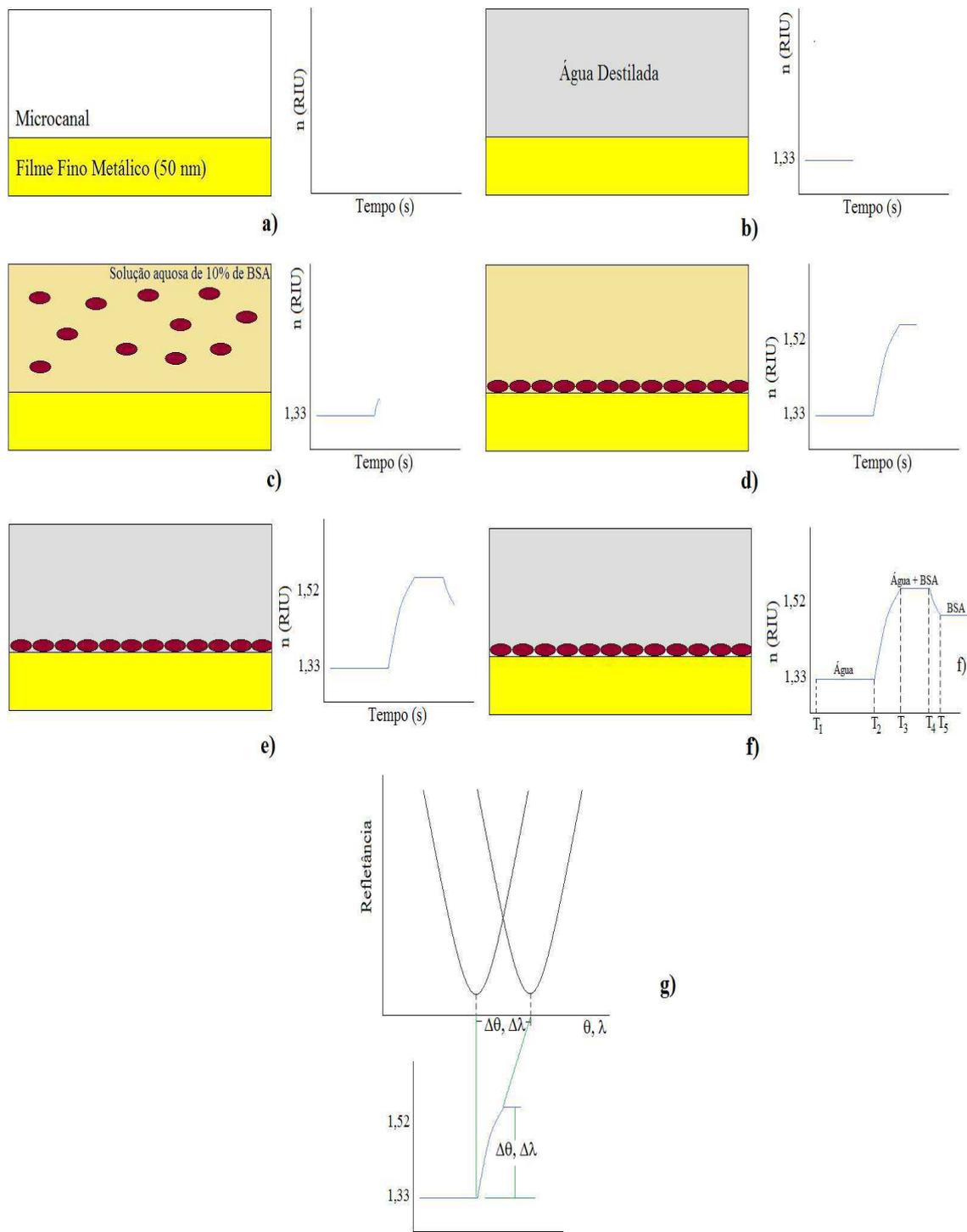


Figura 2.7: Etapas do processo de funcionalização da superfície metálica de um biosensor SPR, usando moléculas de BSA

metálica com moléculas de BSA [55,61]. Juntamente são apresentados os efeitos da mudança do índice de refração em função do tempo (sensorgrama). As etapas de operação são:

1. Enxague com álcool: esta primeira etapa visa limpar a superfície metálica de possíveis sujeiras, impressões digitais e outras (Fig. 2.7a);
2. Enxague com água destilada: aqui será iniciado o processo de limpeza da superfície metálica para contaminações orgânicas (Fig. 2.7b). A idéia é ter uma superfície limpa e hidrofílica (que absorve água e outros líquidos) para a adsorção da proteína;
3. Limpeza com hipoclorito de sódio (NaClO): o objetivo com a circulação de solução de baixa concentração (em torno de 0.1M, normalmente [55]) de NaClO é remover possíveis traços de contaminações orgânicas, incluindo imobilizações anteriores (não representadas graficamente);
4. Repetição das etapas 2 e 3 ocorrerão até ser garantida a limpeza e a preparação da superfície;
5. Adsorção de proteína: etapa de circulação de proteína e adsorção de moléculas da proteína BSA (Fig. 2.7c-d);
6. Re-enxague com água: esta etapa visa retirar moléculas de BSA fracamente adsorvidas (Fig. 2.7e-f).

Após a realização dessas etapas, a superfície metálica encontra-se funcional e a solução contendo a biocamada específica ao analito de interesse poderá circular pelo microcanal. A imobilização do BSA ou de outra substância pode ter vários ciclos de repetição [55]. Os processos envolvidos são simples e não exigem do usuário muita experiência com manipulações de substâncias bioquímicas.

Na Fig. 2.7g, está representada a variação do índice de refração, que é associada ao ângulo (θ), modo AIM, ou ao comprimento de onda (λ), modo WIM.

2.8.2 Cálculo do Índice de Refração

O índice de refração é um dos parâmetros mais utilizados nos sensorgramas de um biosensor SPR e, dependendo do modo de utilização, ele possui um método para o seu cálculo.

Modo AIM

Para o modo AIM, o índice de refração do analito é calculado a partir da Eq. (2.1). Neste caso, considerando a seguinte igualdade:

$$\varepsilon_s = n_s^2 \quad (2.7)$$

e substituindo (2.7) na Eq. (2.1), pode-se mostrar que a seguinte relação é válida para o índice de refração [55]:

$$n_s = \left[\frac{\varepsilon_m (n_{os} \sin \theta_{RES})^2}{\varepsilon_m - (n_{os} \sin \theta_{RES})^2} \right]^{1/2} \quad (2.8)$$

onde θ_{RES} é o ângulo de ressonância, ou seja, na condição de refletividade mínima.

O índice de refração, n_s representa o índice de refração da biocamada, incluindo o bioreceptor, analito e a camada de imobilização. Neste caso, n_s é denominado índice de refração efetivo.

Modo WIM

Para o modo WIM, a obtenção do índice de refração não é direta e, na maioria dos artigos, os autores usam ao invés do índice de refração o deslocamento da resposta SPR, ou seja, a variação do comprimento de onda de ressonância (λ_{RES}) [62,63] ao longo do tempo. Uma alternativa é utilizar a sensibilidade refratométrica e obter um resultado do valor do índice de refração e não do comprimento de onda de ressonância. A sensibilidade refratométrica no modo WIM é dada a partir da Eq. (2.4), ou seja:

$$S_\lambda = \frac{\partial \lambda_{RES}}{\partial n_d} \quad (2.9)$$

onde S_λ é a sensibilidade refratométrica no modo WIM. Neste caso, isolando n_d na Eq. (2.10), obtém-se:

$$\partial n_d = \frac{\partial \lambda_{RES}}{S_\lambda} \quad (2.10)$$

2.9 Biosensores SPR comerciais

Nas últimas décadas, alguns biosensores comerciais SPR têm sido propostos [25]. Atualmente há mais de 20 dispositivos comerciais, com diferentes estruturas de medição e processamento [26]. Todavia, a maioria são baseados no modo AIM e são baseados na estrutura ATR. A seguir, três desses biosensores serão analisados, com suas características principais e suas vantagens e desvantagens.

2.9.1 BIACORE

Em 1990 foi proposto o primeiro biosensor comercial na Suécia. Em seu projeto e construção, houve a parceria com alguns pesquisadores da Universidade Linköping (Suécia), que propuseram o primeiro biosensor SPR em 1982/1983 [64]. Atualmente os biosensores com a marca BIACORE são comercializados pela General Electrics [59].

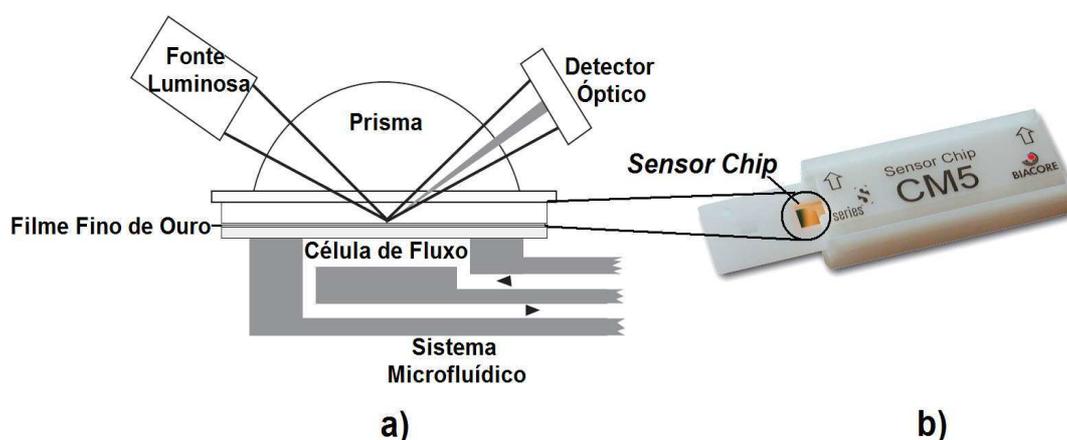


Figura 2.8: (a) Configuração do biosensor, contido no sistema BIACORE. Uma tira descartável (b), contendo o filme fino de ouro é acoplada opticamente ao prisma de vidro (interno ao sistema BIACORE) usando um hidrogel.

O sistema BIACORE é totalmente automatizado, desde a geração e manipulação das soluções microfluídicas (um autosampler é utilizado) até o controle e processamento do sinal refletido de saída. A estrutura do biochip tem uma estrutura semelhante à estrutura de Kretschmann-Raether (Fig. 2.8a), tendo um prisma como elemento de acoplamento e o filme fino de ouro como elemento metálico e opera no modo AIM. O filme fino de ouro e

camadas de ligação e de preparação para a deposição da biocamada e analito são encontradas em uma tira (*strip*) descartável como ilustrada na Fig. 2.8a. Esta tira é denominada pelo fabricante como *sensor chip* [65]. Todavia, um gap de ar é formado entre o filme fino de ouro (tira) e o prisma óptico (Fig. 2.8a), que se localiza dentro do equipamento BIACORE. Esse gap de ar provoca uma descontinuidade no caminho óptico, o que provoca a não existência do fenômeno SPR. A correção dessa descontinuidade é realizada com um hidrogel que fecha o gap de ar [22, 55, 59, 65] e permite o acoplamento fóton-plásmon. Embora esse método seja eficiente, leva a uma necessidade de limpeza e manutenção constantes com a troca do *sensor chip*, por exemplo [25, 55, 58]. Além disso, embora a tira seja descartável, o custo não é baixo. O *sensor chip* mais simples custa acima de 100 dólares. Já o sistema BIACORE é muito mais caro, com um custo superior a 100 mil dólares.

Devido à sua alta sensibilidade, seletividade e precisão, além da ausência de marcadores (características vantajosas da tecnologia SPR), o biosensor BIACORE vem sendo muito utilizado por grandes empresas, agências governamentais e institutos de pesquisa e universidades para aplicações tais como na cinética de reações químicas [66], na análise de contaminantes em alimentos [67, 68], na detecção de substâncias usadas no bioterrorismo [69], entre outras. Além disso, a maioria dos artigos científicos relacionados à tecnologia SPR utilizam o BIACORE [70]. Todavia, o volume é grande, o que o inviabiliza para aplicações portáteis e *online* [59, 71]; a superfície sensível deve estar livre de quaisquer impurezas para a correta operação do dispositivo, requerendo além de um ambiente adequado e limpo; é necessário um gel entre o prisma e o *sensor chip*, o que acrescenta etapas adicionais de manutenção; há a exigência de pessoal técnico especializado para sua operação e manutenção.

2.9.2 Biosensor SPREETA

O biosensor SPREETA, baseado também na configuração de Kretschmann-Raether, foi proposto em 1996 pela Texas Instruments como uma alternativa ao biosensor BIACORE, especialmente para aplicações portáteis e *online*. Neste dispositivo, os componentes eletro-ópticos são encapsulados em um único invólucro, conforme é mostrado na Fig. 2.9. O encapsulamento é feito de material óptico, o que providencia proteção para os componentes e

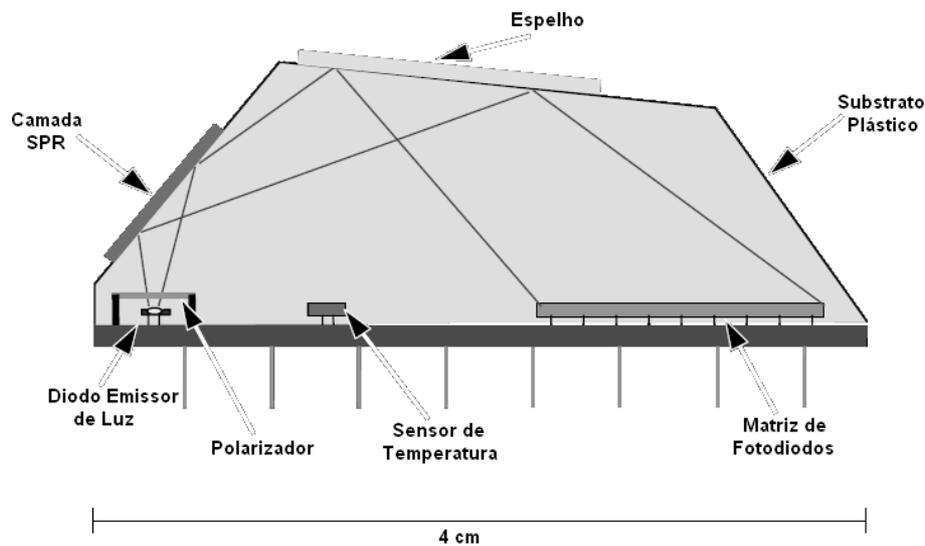


Figura 2.9: Estrutura do biosensor SPREETA

condições propícias para a construção da camada SPR, espelhos e arranjos ópticos existentes. A camada sensora é formada pela deposição de filme fino de ouro de 50 nm [58].

A estrutura mostrada na Fig. 2.9 foi a primeira versão do SPREETA e foi denominado TI-SPR-1 e possuía os seguintes componentes:

- Camada Sensora: há um micro-canal sobre esta camada, em que o analito a ser analisado é bombeado;
- Diodo Emissor de Luz: responsável pela geração dos feixes luminosos no modo de interrogação angular. Há um conversor luz-tensão para monitorar as variações de intensidade do diodo;
- Polarizador: permite que apenas feixes com polarização tipo p atinjam a camada sensora;
- Espelho de Reflexão;
- Matriz de fotodiodos: dispositivo em que os raios refletidos são projetados. Cada um dos 128 pixels da matriz corresponde a uma faixa estreita de ângulos de entrada. A intensidade do sinal permite quantificar a ressonância dos plásmons de superfície e portanto indicar o índice de refração da amostra;
- Sensor de Temperatura.

As etapas de processamento e apresentação dos dados são externas ao SPREETA. Um processador DSP é o componente central do processamento. Cada pixel é lido individualmente por um conversor analógico-digital (A/D) de 12 bits e os dados então são enviados ao computador [58, 72, 73].

Há um programa que coleta os dados enviados pelo elemento de processamento, constrói a curva SPR e, através de um método de identificação da posição de ressonância, determina o mínimo de ressonância e gera o sensorgrama. Há ainda a possibilidade de visualizar um sensorgrama do índice de refração calculado e, assim, não apenas detectar o analito, mas também acompanhar a cinética química e possíveis variações ao longo do tempo.

Atualmente, a empresa Sensata fabrica e comercializa os biosensores SPREETA [74]. O menor volume e o menor custo do biochip (em torno de U\$100) em relação ao biochip (sensor CM5) da BIACORE (em torno de U\$200), são vantagens do SPREETA. Todavia, sua utilização ainda é bem menor que o da BIACORE. Além disso, como ficou comprovado em nossos estudos dos efeitos da temperatura (serão apresentados mais adiante), a variação da temperatura ambiente afeta todos os elementos internos do SPREETA e a posição e a geometria dos componentes, o que pode alterar a posição de ressonância e, conseqüentemente, o desempenho do biosensor. Além disso, assim como no caso do biosensor BIACORE, uma alta pureza da camada sensível é necessária para a correta operacionalização do dispositivo.

2.9.3 VIR

Em 2003, a empresa dinamarquesa VIR propôs um biosensor SPR que operava no modo de interrogação angular e usava um substrato óptico fabricado com o polímero TOPAS COC [60]. Esse biosensor dispensava o uso de sistemas mecânicos rotativos ou goniômetros para rotação da fonte luminosa ou do biosensor, como é normalmente utilizado por biosensores que usam o modo AIM [25]. Além disso, não foi utilizado óleo ou gel para fixação da camada metálica no substrato óptico [25], o que evitava serviços de manutenção constantes. Essa característica associada à fabricação em massa e de baixo custo, propiciada pelo processo de moldagem por injeção possibilitou a esse biosensor ser a primeira tentativa de um dispositivo SPR descartável e adequado para aplicações TLR [25, 55, 60].

O biosensor VIR usa um substrato óptico como acoplador óptico dos feixes lumino-

dos de entrada. Esses feixes atingem a superfície do biochip perpendicularmente, devido à presença de elementos de acoplamento ópticos difrativos ou DOCE (*Diffractive Optical Coupling Elements*), cujas dimensões são nanométricas e utilizam técnicas holográficas em sua construção sobre a camada metálica (Fig. 2.10a). Eles possibilitam que os raios luminosos de entrada sejam refletidos em várias direções, o que aumenta a probabilidade do acoplamento fóton-plásmon na região sensível do biochip, conforme é ilustrado na Fig. 2.10a.

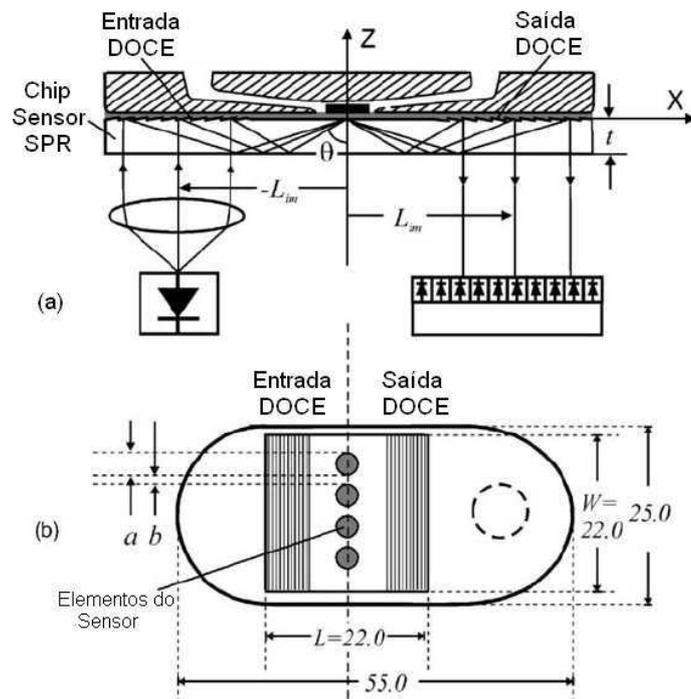


Figura 2.10: Estrutura do biosensor VIR SPR, (a) com mudanças na estrutura de uma configuração baseada em prisma e (b) uma visão superior do biochip VIR

Embora possua vantagens em relação a outros biosensores propostos na literatura, a fabricação dos elementos DOCE requer um aparato de nano-tecnologia holográfica complexa para a produção do molde inicial. Embora o valor de cada biochip fique em torno de U\$1,00, o valor do molde de injeção é caro (acima de U\$20.000). Além disso, o tempo de vida útil desse molde fica em torno de 10 mil biochips ópticos. Esses elevados custos e o trabalho intenso de produção para construção do molde inicial e das superfícies nano-graticuladas são dificuldades inerentes ao biosensor VIR [75]. Apenas um biosensor foi construído. Esse biosensor foi doado ao laboratório de Biosensores da UFCG, juntamente com componentes

que permitiram a construção de outro biosensor [76].

2.10 Limitações operacionais de um biosensor SPR

Os biosensores SPR tem sido bastante aplicados nos últimos anos [29] e já vem substituindo outros biosensores e técnicas convencionais bio-analíticas, como o teste ELISA, na pesquisa farmacêutica e médica, detecção de patógenos em alimentos e bebidas, entre outras [25, 26]. Embora essa tendência de ampla aplicabilidade seja notória, algumas limitações de operação desses dispositivos existem [55, 56]. Os efeitos da adsorção não-específica de analitos e da variação da temperatura ambiente são as principais limitações e as mais pesquisadas pela literatura. A seguir serão apresentados maiores detalhes dessas duas limitações.

2.10.1 Adsorção não-específica

Nos fluidos circulantes, normalmente aquosos, estão presentes não apenas as moléculas do analito de interesse, mas várias outras moléculas. A adsorção correta de substâncias é uma tarefa relativamente complexa e envolve aspectos de cinética química, microfluídicos, entre outros. Quando moléculas não desejadas são adsorvidas à biocamada de um biosensor SPR, ocorre a chamada adsorção não-específica. Neste caso, as propriedades ópticas da superfície próxima ao filme metálico são modificadas e, conseqüentemente, a resposta e o desempenho do dispositivo são também alterados.

Algumas precauções podem ser utilizadas para minimizar os efeitos da adsorção não-específica. Uma delas é monitorar o índice de refração da substância sendo adsorvida, de forma a garantir que o analito esteja realmente sendo adsorvido. Outra é garantir a limpeza adequada da superfície metálica com várias etapas de limpeza, usando por exemplo soluções de hipoclorito (HClO) e água destilada.

Algumas alternativas vem sendo propostas na literatura para minimizar esse efeito: o uso de estruturas modificadas [56, 77]; ou o controle dos efeitos da adsorção não-específica, como é o caso do uso de matrizes bio-inertes ou de imobilização [78, 79].

2.10.2 Efeitos da variação da temperatura ambiente no desempenho do biosensor SPR

Tem sido observado que uma variação mínima de $0,1^{\circ}\text{C}$ na temperatura ambiente acarreta uma variação de 1×10^{-5} no índice de refração, considerando o analito como a água destilada [80]. Este valor encontra-se dentro da faixa de detecção dos biosensores SPR [56, 80]. Os efeitos observados afetam todos os elementos do biosensor: lentes e outros elementos ópticos, o biochip, prisma, câmera CCD ou espectrômetro. Eles são superpostos e usualmente causam distorções do caminho de propagação óptico e, conseqüentemente, levam à perda das condições de ressonância SPR [56, 81, 82].

Um estudo teórico dos efeitos da temperatura em biosensores SPR foi desenvolvido no período de 1998 a 2004 [83–86]. Este estudo foi aplicado, inicialmente, a altas temperaturas (acima de 80°C) e considerou relevante apenas a dependência térmica, para um biosensor SPR de três camadas (polímero TOPAS, ouro e água), na parte real da função dielétrica complexa do ouro [83, 84]. Portanto, esse estudo desconsiderou os efeitos na componente imaginária da função dielétrica complexa do ouro e nos índices de refração do substrato óptico e água.

Recentemente um estudo teórico e experimental dos efeitos das flutuações da temperatura ambiente no desempenho de um sensor SPR de três camadas foi desenvolvido, em termos da sensibilidade refratométrica e largura de banda nos modos AIM e WIM [87]. A investigação teórica e experimental desenvolvida levou em consideração a dependência térmica das propriedades óticas das três camadas do dispositivo (polímero TOPAS, filme fino de ouro e água destilada).

Os itens a seguir apresentarão uma breve explanação do modelo teórico e experimental desenvolvido. Maiores detalhes podem ser vistos em relatórios técnicos desenvolvidos [51, 88] e artigos publicados [87, 89–91].

2.11 Estudo dos efeitos da variação da temperatura ambiente

O estudo dos efeitos da temperatura ambiente foi desenvolvido para ambos os modos AIM e WIM. Duas estratégias de cálculo foram utilizadas: uma baseada na condição de ressonância, Eq. (2.1); e outra baseada nas equações de Fresnel. Esses procedimentos numéricos são complementares entre si e testes experimentais usando o biosensor SPREETA auxiliaram o entendimento do modelo proposto.

2.11.1 Cálculos baseados na condição de ressonância - modo AIM

A sensibilidade refratométrica no modo AIM é assim definida:

$$|S^\theta(T)| = \frac{\frac{d\theta_{RES}}{dT}}{\frac{dn_s}{dT}} \quad (2.11)$$

Para o cálculo da sensibilidade refratométrica é necessário obter uma expressão para o ângulo de ressonância θ_{RES} . A relação de dispersão para os plásmons de superfície na ressonância é dado pela seguinte equação [51,90]:

$$k_x^{SP} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.12)$$

Considerando os parâmetros ε_{dr} e ε_{di} , que são os componentes real e imaginário da função dielétrica complexa do analito, respectivamente, iguais a:

$$\varepsilon_d = \varepsilon_{dr}, \varepsilon_{di} = 0 \quad (2.13)$$

a equação (2.12) torna-se:

$$k_x^{SP} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_d(\varepsilon_{mr} + j\varepsilon_{mi})}{\varepsilon_d + \varepsilon_{mr} + j\varepsilon_{mi}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.14)$$

$$k_x^{SP} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_d(\varepsilon_{mr} + j\varepsilon_{mi})(\varepsilon_d + \varepsilon_{mr} - j\varepsilon_{mi})}{(\varepsilon_d + \varepsilon_{mr} + j\varepsilon_{mi})(\varepsilon_d + \varepsilon_{mr} - j\varepsilon_{mi})} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.15)$$

$$k_x^{SP} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{(\varepsilon_d^2 \varepsilon_{mr} + \varepsilon_d \varepsilon_{mr}^2 + \varepsilon_d \varepsilon_{mi}^2) + j \varepsilon_d^2 \varepsilon_{mi}}{(\varepsilon_d + \varepsilon_{mr})^2 + \varepsilon_{mi}^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.16)$$

A condição de ressonância SPR requer que apenas a parte real do vetor de onda dos plásmons de superfície seja considerada, Eq. (2.1). Dessa forma, extraindo-se da equação (2.16) apenas a componente real, o ângulo de ressonância, θ_{RES} agora é dado por [25, 28]:

$$\theta_{RES} = \arcsin \left[\frac{1}{n_2} \sqrt{\frac{\varepsilon_d}{2(\varepsilon_d + \varepsilon_{mr})} \left(\sqrt{(\varepsilon_{mr}(\varepsilon_d + \varepsilon_{mr}^2) + \varepsilon_{mi}^2)^2 + \varepsilon_{md}^2 \varepsilon_{mi}^2} + \varepsilon_{mr}(\varepsilon_d + \varepsilon_{mr}) + \varepsilon_{mi}^2 \right)} \right] \quad (2.17)$$

Impondo-se a condição $|\varepsilon_{mr}| \gg \varepsilon_{mi}$ à equação (2.17), obtém-se a seguinte relação:

$$\theta_{RES} = \arcsin \left[\frac{n_s}{n_2} \sqrt{\frac{\varepsilon_m}{\varepsilon_m + n_s^2}} \right] \quad (2.18)$$

onde n_2 é o índice de refração do substrato óptico.

A Eq. (2.18) é baseada na aproximação de que $\varepsilon_{mr} \gg \varepsilon_{mi}$, ou seja, a parte real da função dielétrica do ouro é muito maior que a parte imaginária. Com esta aproximação, a parte imaginária é normalmente desconsiderada nas investigações teóricas apresentadas na literatura [81–86]. Além disso, os índices de refração do substrato óptico e do analito também são desconsiderados.

2.11.2 Cálculos baseados na condição de ressonância - modo WIM

A definição da sensibilidade no modo de interrogação espectral é dada pela seguinte relação:

$$|S^\lambda(T)| = \frac{d\lambda_{RES}}{dn_s} \quad (2.19)$$

Aqui, diferentemente do modo AIM, não é possível exprimir uma equação analítica para a dependência do comprimento de onda λ com a temperatura [51, 90]. A solução encontrada foi usar as dependências térmicas dos materiais na expressão de $S^\lambda(T)$.

Portanto, usando um artifício matemático para (2.19) [61], obtém-se:

$$S^\lambda(T) = \frac{d\theta_{RES}}{dn_s} \frac{d\lambda_{RES}}{d\theta_{RES}} \frac{dT}{dT} \quad (2.20)$$

Rearrmando os termos da equação 2.20, obtém-se:

$$S^\lambda(T) = \frac{\frac{d\theta_{RES}}{dT}}{\frac{d\theta_{RES}}{d\lambda} \frac{dn_s}{dT}} \quad (2.21)$$

Haja visto que a variação do ângulo de ressonância é dependente dos parâmetros do ouro (função dielétrica), do polímero TOPAS (índice de refração) e da água destilada (índice de

refração) e que estes parâmetros, por sua vez, são dependentes do comprimento de onda, o termo $d\theta_{RES}/d\lambda$ é dado pela seguinte equação diferencial parcial:

$$\frac{d\theta_{RES}}{d\lambda} = \frac{d\theta_{RES}}{d\varepsilon_m} \frac{d\varepsilon_m}{d\lambda} + \frac{d\theta_{RES}}{dn_{os}} \frac{dn_{os}}{d\lambda} + \frac{d\theta_{RES}}{dn_s} \frac{dn_s}{d\lambda} \quad (2.22)$$

O procedimento é semelhante para o termo $d\theta_{RES}/dT$, o que resulta em:

$$\frac{d\theta_{RES}}{dT} = \frac{d\theta_{RES}}{d\varepsilon_m} \frac{d\varepsilon_m}{dT} + \frac{d\theta_{RES}}{dn_{os}} \frac{dn_{os}}{dT} + \frac{d\theta_{RES}}{dn_s} \frac{dn_s}{dT} \quad (2.23)$$

2.11.3 Cálculos baseados nas equações de Fresnel

Normalmente, o modelo multi-camadas de Fresnel é utilizado para a determinação da sensibilidade do biosensor SPR nos modos AIM e WIM [90]. Vale ressaltar que, pela ausência de aproximações, os cálculos baseados nas equações de Fresnel são mais precisos que os baseados na condição de ressonância [90]. A seguir o modelo multi-camadas de Fresnel, utilizado nos cálculos, é descrito.

Modelo multi-camadas de Fresnel

A solução geral de um modelo de N-camadas, tem o coeficiente de reflexão ou refletividade, definido para uma onda luminosa de incidência com polarização tipo p, dado pela seguinte relação [25, 28, 50, 55, 90]:

$$r^p = \frac{(M_{11} + M_{12}q_N)q_1 - (M_{21} + M_{22}q_N)}{(M_{11} + M_{12}q_N)q_1 + (M_{21} + M_{22}q_N)} \quad (2.24)$$

em que as matrizes $M_{ij}(i, j = 1, 2)$ são definidas por

$$M_{ij} = \left(\prod_{k=2}^{N-1} M_k \right)_{ij}$$

em que N é o número de camadas e k é uma dada camada.

Já a matriz M_k é dada por:

$$M_k = \begin{bmatrix} \cos \beta_k & -i \sin \beta_k / q_k \\ -iq \sin \beta_k & \cos \beta_k \end{bmatrix} \quad (2.25)$$

O parâmetro q_k é assim definido:

$$q_k \cong \frac{(\varepsilon_k - n_1^2 \sin^2 \theta_1)^{\frac{1}{2}}}{\varepsilon_k} \quad (2.26)$$

em que ε_k é a função dielétrica complexa do meio da camada k, θ_1 é o ângulo de incidência na interface da camada 1 com a camada 2 e n_1 é o índice de refração do meio da camada 1.

E o parâmetro β_k é definido por:

$$\beta_k = (z_k - z_{k-1}) \frac{2\pi}{\lambda_0} (\varepsilon_k - n_1^2 \sin^2 \theta_1)^{\frac{1}{2}} \quad (2.27)$$

em que $z_k - z_{k-1}$ é a espessura do meio da camada k e λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente.

2.11.4 Determinação do efeito da temperatura

Adicionado aos cálculos realizados para a determinação do efeito da variação da temperatura num biosensor SPR, a sensibilidade refratométrica de um biosensor SPR de três camadas nos modos AIM e WIM foi calculada utilizando o mesmo modelo de três camadas descrito anteriormente [51]. As expressões analíticas da sensibilidade, utilizadas no estudo do efeito da temperatura, também foram empregadas para a faixa de comprimento de onda variando de $600\text{nm} < \lambda < 850\text{nm}$. O resultado dos cálculos realizados no MATLAB é mostrado nas Figuras 2.11 e 2.12. A sensibilidade nos modos AIM, $S^\theta(\lambda)$, e WIM, $S^\lambda(\lambda)$ foi determinada. As curvas mostradas são não-lineares e para o caso AIM, a sensibilidade reduz com o aumento do comprimento de onda, e para o caso WIM, o comportamento é oposto, ou seja, aumenta com o comprimento de onda. Essas figuras incluem também as sensibilidades em função também do índice de refração do analito, n_s , para o comprimento de onda de 670 nm. A faixa dinâmica foi boa, ou seja, n_s variando de 1,3 a 1,38. A sensibilidade também foi alta para ambos os modos de interrogação [51].

Dados coletados de fontes confiáveis para o polímero TOPAS (fornecidos diretamente pelo fabricante [92,93]) e a água destilada (NIST - *National Institute of Standards and Technology* [92,94–98]), e baseados no modelo de Drude e teorias de espalhamento fónon-fónon e fónon-elétron [51, 90] para o filme fino de ouro de 50 nm, foram utilizados para os cálculos. Um comprimento de onda da luz incidente igual a 670 nm e uma faixa de

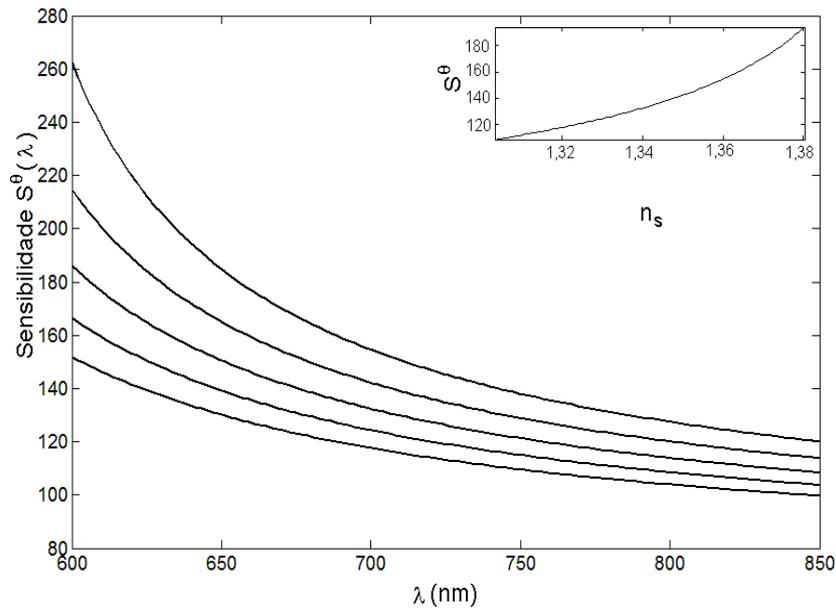


Figura 2.11: Sensibilidade calculada no modo AIM para um modelo de três camadas, para diferentes valores do índice de refração do analito. Também é exibido a variação de S^θ , para o comprimento de onda fixo de 670nm, em função do índice de refração do analito.

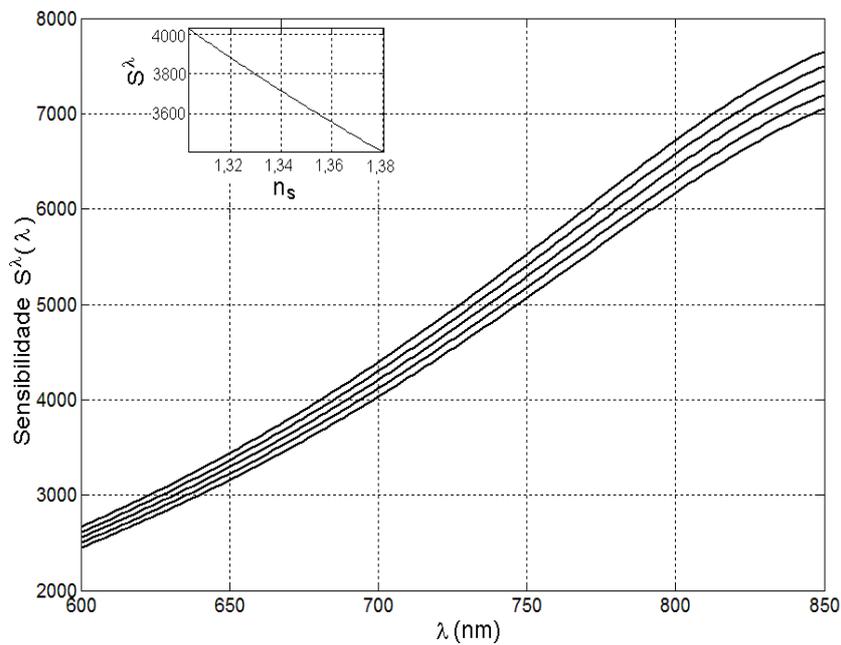


Figura 2.12: Sensibilidade calculada no modo WIM para um modelo de três camadas, para diferentes valores do índice de refração do analito. Também é exibido a variação de S^λ , para o comprimento de onda fixo de 670nm, em função do índice de refração do analito.

temperatura variando de 273,16 K (0°C) a 373,16 K (100°C) foram utilizados os cálculos para ambos os modos de interrogação.

No caso AIM, o efeito da variação da temperatura ambiente na sensibilidade, usando os métodos analítico e numérico é ilustrado na Fig. 2.13 para diferentes comprimentos de onda.

Uma singularidade em baixas temperaturas foi observada em baixas temperaturas ($T \rightarrow 0$), embora não esteja mostrada na Fig. 2.13, para ambos os procedimentos de cálculo utilizados. Isso é explicado pelo fato de ocorrer na equação (2.18), para determinadas condições, a seguinte igualdade $|\epsilon_m| = n_2^2 n_3^2 / (n_2^2 - n_3^2)$ [89–91]. Essa singularidade é inerente ao modo de interrogação angular e para comprimentos de onda baixo. A sensibilidade decresce com o aumento da temperatura e o comportamento da curva é altamente não-linear.

No caso WIM, o comportamento da sensibilidade em função da variação da temperatura ambiente é mostrado na Fig. 2.14a, para os procedimentos de cálculo baseados na condição de ressonância e nas equações de Fresnel. Na Fig. 2.14b, $S^\lambda(T)$ é exibida em função do ângulo de incidência, mostrando que essa sensibilidade diminui com a diminuição do ângulo de incidência.

Como no caso AIM, uma singularidade em temperaturas baixas também foi observada nos gráficos de ambos os procedimentos de cálculo numérico (Fig. 2.14a). A explicação dessa singularidade é semelhante ao apresentado para interrogação angular [90]. Também na Fig. 2.14, é observado que, após a singularidade, o módulo da sensibilidade decresce com o aumento da temperatura.

2.11.5 Experimento usando o biosensor SPREETA

O SPREETA foi empregado para a investigação experimental dos efeitos da temperatura na sensibilidade refratométrica. Ele opera exclusivamente no modo AIM. Portanto, nenhuma medição foi realizada no modo WIM.

Foi utilizado um arranjo simples para os estudos dos efeitos da temperatura. Os seguintes procedimentos foram utilizados para a realização do experimento:

1. O dispositivo SPREETA foi completamente imerso dentro de um recipiente DEWAR

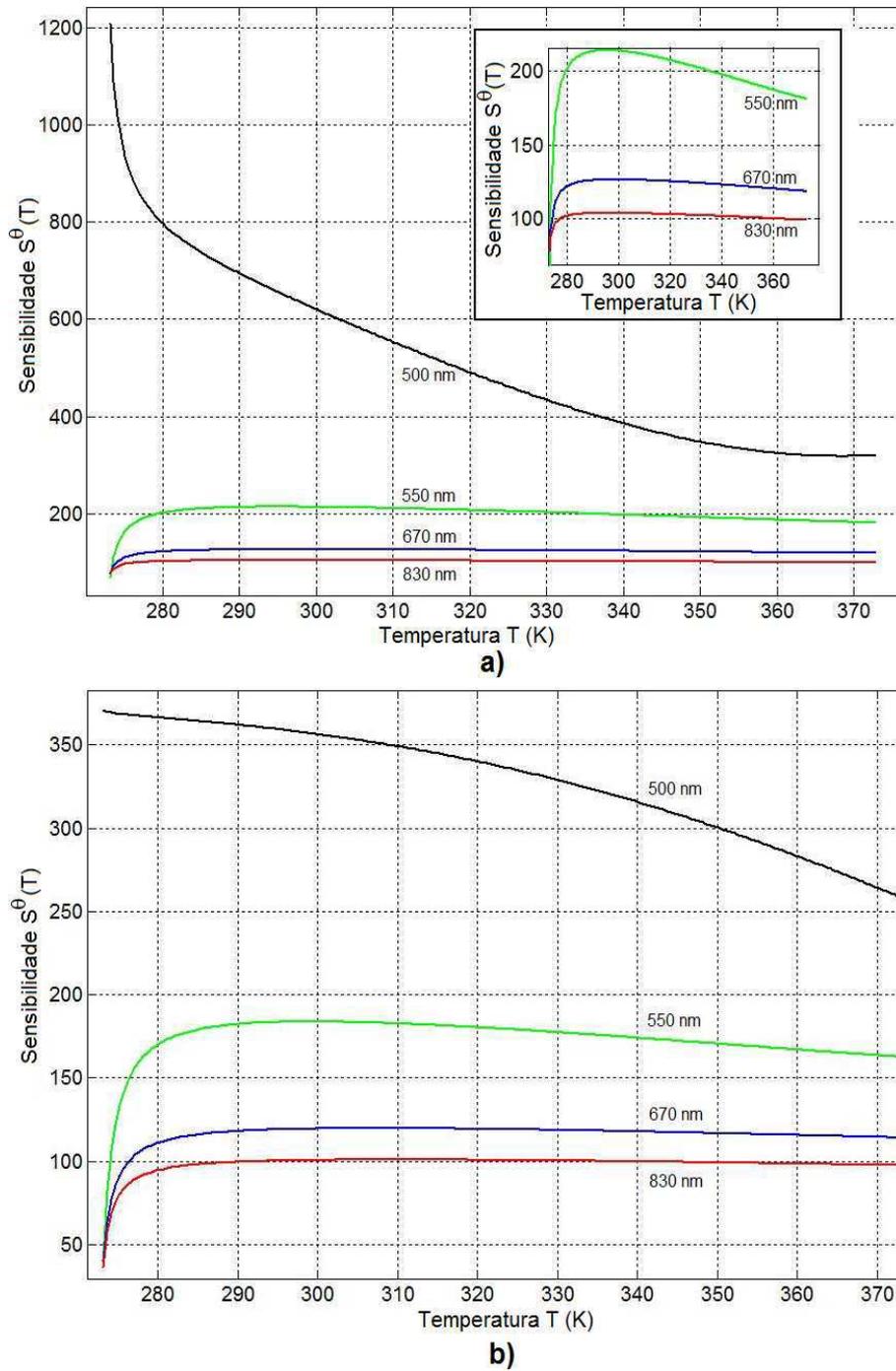
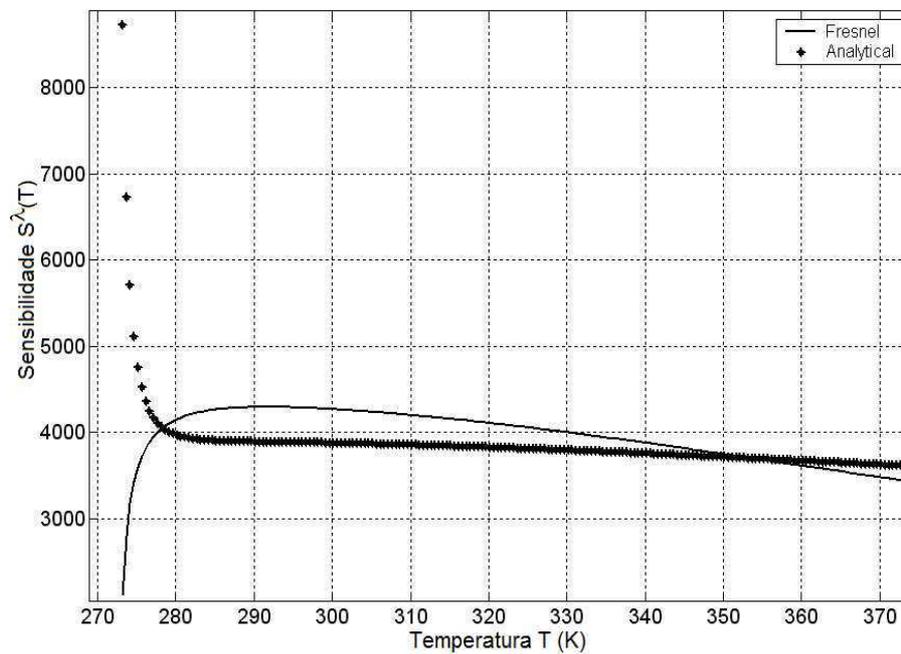
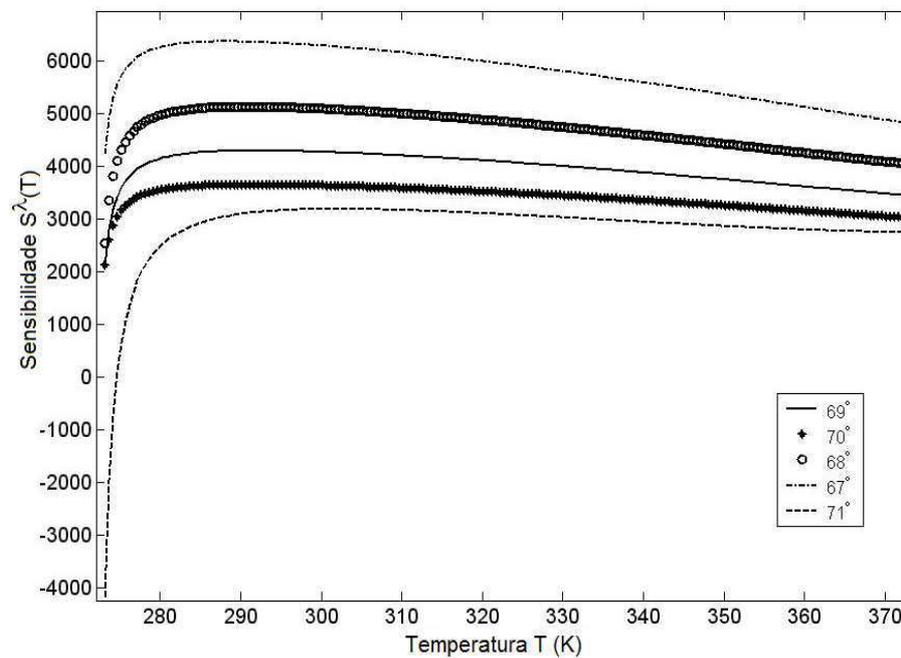


Figura 2.13: Efeito da temperatura na sensibilidade no modo AIM, baseados (a) na condição de ressonância e (b) nas equações de Fresnel



a)



b)

Figura 2.14: Módulo da sensibilidade de um biosensor SPR no Modo WIM, considerando os procedimentos de cálculo baseados (a) na condição de ressonância e (b) nas equações de Fresnel.

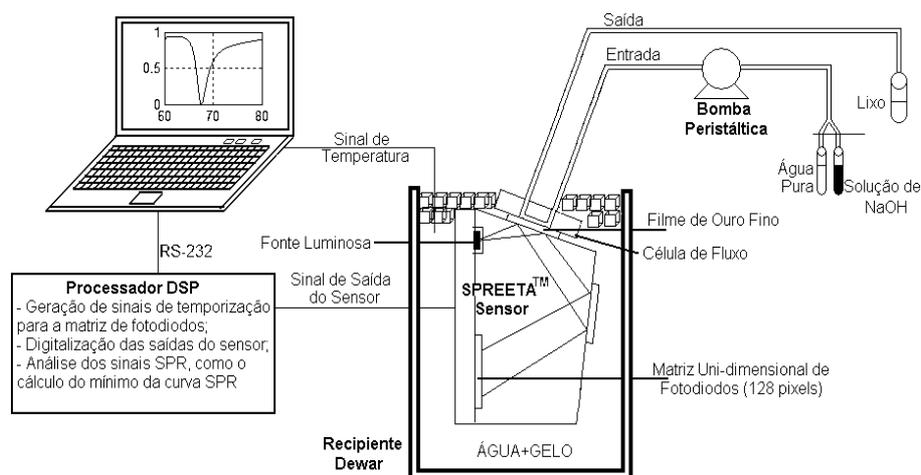


Figura 2.15: Arranjo experimental para a determinação da sensibilidade no modo AIM, usando o biosensor SPREETA

isolado em uma mistura de água e gelo, conforme é ilustrado na Fig. 2.15. Nessa figura, também há uma bomba peristáltica usada para transportar a solução aquosa à superfície sensível do dispositivo SPREETA;

2. Foram utilizados dois analitos com índices de refração semelhantes, água destilada e uma solução de 0.05 M de hidróxido de sódio. Recorreu-se à essa estratégia para se obter variações do índice de refração e assim calcular a sensibilidade refratométrica, conforme a Eq. (2.11);
3. Experimentos foram desenvolvidos durante a transição de água gelada (≈ 277 K), com taxa de ($dT/dt \approx 0.4$ K/min), à água morna (≈ 350 K). Maiores temperaturas poderiam até danificar o dispositivo [90] e a pequena massa térmica do dispositivo SPREETA permitiu um rápido equilíbrio térmico;
4. As duas soluções, individualmente, foram bombeadas ao biosensor SPR. Um intervalo de tempo de 5 min foi utilizada para monitoramento de cada ponto de dado, o que causou uma incerteza de temperatura de aproximadamente 2 K;
5. Anotações dos ângulos de ressonância e dos índices de refração para os analitos foram realizadas, utilizando o *software* do biosensor SPREETA.

A sensibilidade refratométrica foi então calculada com os valores obtidos dos experimen-

tos e o resultado é mostrado na Fig. 2.16 para uma faixa de 277 K a 320 K. Em temperaturas menores, S^θ reduz para um valor de $S^\theta = 30^\circ/\text{RIU}$ na temperatura de $T < 295\text{K}$.

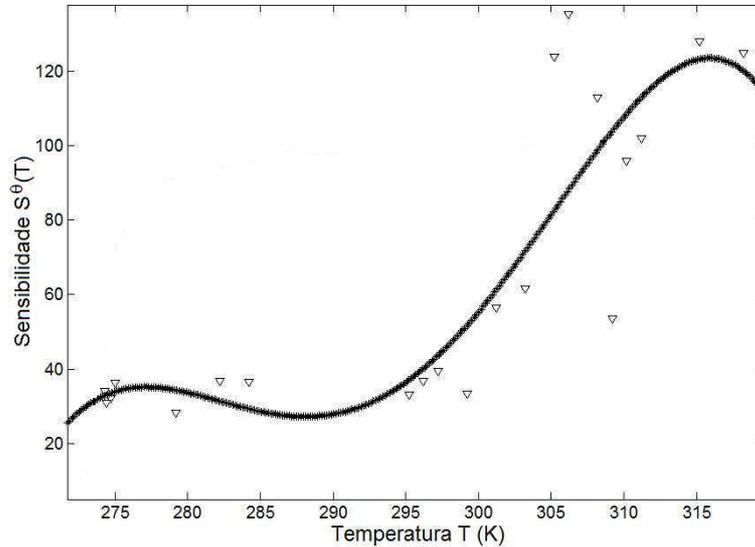


Figura 2.16: Sensibilidade determinada com experimentos usando o biosensor SPREETA

2.11.6 Discussões dos estudos dos efeitos da temperatura em um biosensor SPR

Os resultados obtidos numericamente, para ambos os modos AIM e WIM, evidenciam que as camadas do biosensor SPR contribuem para as magnitudes totais de $S^\theta(T)$ e $S^\lambda(T)$. Ficou evidente pelo estudo realizado que a abordagem proposta acrescentou um melhor entendimento dos efeitos da temperatura no biosensor SPR, visto que anteriormente apenas variações térmicas na parte real da função dielétrica do filme fino de ouro eram consideradas [90]. Em ambos os modos de operação, a contribuição da água pura é dominante, enquanto a influência do filme de ouro torna-se significativa em baixas temperaturas. Efeitos térmicos no polímero TOPAS podem ser desprezados para o modo AIM, mas contribuem no modo WIM para baixas temperaturas.

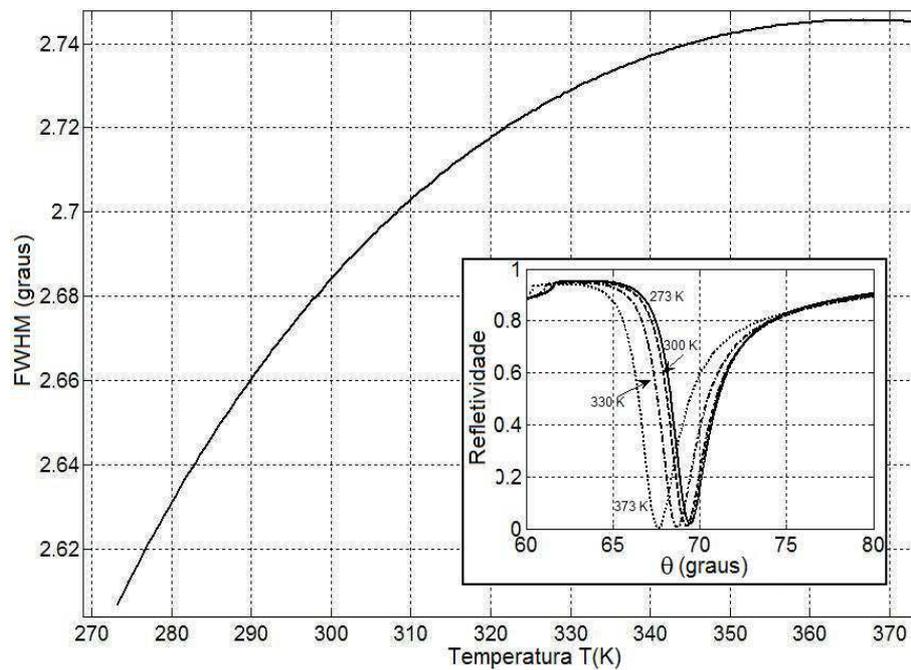
A análise teórica e experimental dos efeitos da temperatura ambiente em biosensores SPR confirmou a singularidade prevista na sensibilidade do dispositivo em baixas temperaturas [99]. Contudo, a investigação experimental revelou uma transição lenta de 120° para $30^\circ/\text{RIU}$ numa faixa estreita de temperatura de 15K. Esse desvio observado entre os

resultados teóricos e experimentais é atribuído à presença de distorções termo-mecânicas e deslocamentos de todos os componentes que pertencem ao dispositivo SPREETA, incluindo o encapsulamento epoxy, com a variação da temperatura. As variações termo-mecânicas são sobrepostas e, portanto, a posição do LED, o polarizador, a posição do espelho refletor e o detector luminoso mudam ligeiramente com a variação da temperatura. Mudanças na características de emissão do LED, variações em uma taxa $d\lambda/dT \approx -0.4\text{nm/K}$ foi observada para baixas temperaturas. Tudo isso contribui para distorções na propagação do feixe e na leitura pela matriz detectora de luz, o que leva por conseguinte à modificação do sinal de saída. Neste sentido, o biosensor SPREETA não é adequado para aplicações em tempo real e *online*, a menos que circuitos de compensação e/ou controle da temperatura sejam adicionados ao biosensor [100, 101]. A comparação das sensibilidades $S^\theta(T)$ and $S^\lambda(T)$ indicam que o modo WIM é ligeiramente mais vulnerável à degradação pelas flutuações de temperatura, para maiores temperatura, do que no modo AIM.

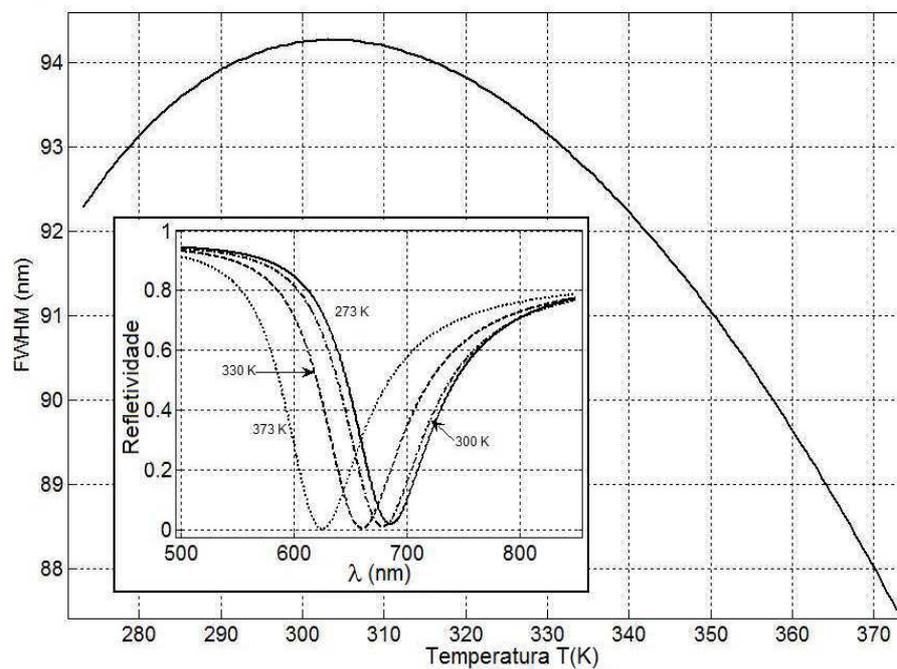
Diante das considerações observadas para o teste experimental usando o SPREETA, há uma dificuldade inerente para a caracterização experimental da influência da temperatura. Uma estrutura que não utilize elementos internos e cujo material construtivo tenha um coeficiente de dilatação térmica pequeno é plenamente adequada para a investigação experimental dos efeitos da variação da temperatura ambiente.

As Figs. 2.17a-b esboçam a influência da temperatura na largura de banda da curva SPR para ambos os modos de interrogação. No modo AIM (Fig. 2.17a), $\Gamma^\theta(T)$ aumenta em uma pequena taxa até maiores temperaturas e apresenta saturação em torno de 360K. Variações consideráveis foram observadas no modo WIM, em que $\Gamma^\lambda(T)$ apresentou um máximo em 305K, acompanhado por uma redução de magnitude com o aumento da temperatura. Isso também foi observado para o modo AIM, mas em menor escala. Nas Figs. 2.17a-b estão as curvas SPR para quatro temperaturas diferentes. À medida que a temperatura aumenta, tanto o ângulo de ressonância (modo AIM), quanto o comprimento de onda de ressonância (modo WIM) têm seus valores reduzidos.

Um estudo teórico/experimental recente revelou que, além da temperatura, três outros efeitos afetam a largura de banda Γ da curva SPR. Esses efeitos são: a morfologia do filme fino de ouro, o sistema de adsorção selecionado e um componente intrínseco, que é independente da temperatura e é encontrado para baixas temperaturas, próximas à temperatura



a)



b)

Figura 2.17: Influência da temperatura na largura de banda da curva SPR para o (a) modo AIM e (b) modo WIM. Internamente, nesses gráficos estão as curvas SPR para várias temperaturas.

absoluta ($T = 0$ K). A morfologia do filme fino de ouro foi caracterizado usando um microscópio eletrônico de transmissão, e o valor eficaz (rms) de $\rho \approx 4.35$ nm foi encontrado para a rugosidade (Fig. 2.18) [87]. Observou-se pelos cálculos e experimentos realizados que a rugosidade tem uma boa influência na resposta do biosensor. Dessa forma, cuidados no momento de fabricação do substrato óptico, com a correta limpeza e/ou polimento são ações necessárias.

O estudo para os componentes da temperatura e intrínseco estendeu-se da faixa de temperatura de $20 < T > 373$ K. Foi comprovado que a composição dos componentes dependentes da temperatura (Γ_T) e intrínseco (Γ_{intr}) é dependente da espessura do filme fino de ouro e aumenta de 1,4 ($T = 20$ K) para 2,5 ($T = 273$ K), considerando um comprimento de onda da luz incidente de 632.8 nm (Fig. 2.18). Para um comprimento de onda de 670 nm, houve um aumento da quantidade $\Gamma_T + \Gamma_{intr}$ conforme o aumento da temperatura.

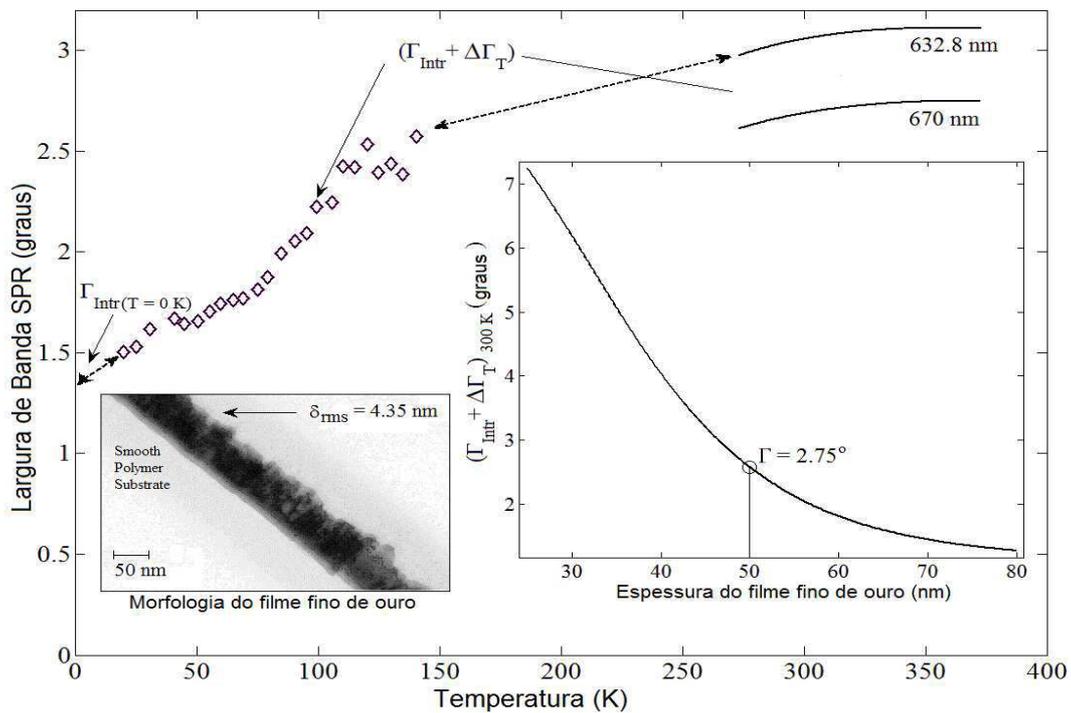


Figura 2.18: Largura de banda calculada apresentando a dependência com a temperatura, morfologia e espessura do filme fino de ouro

2.12 Considerações finais

Os fundamentos teóricos dos biosensores SPR, com as definições, características de operação e limitações operacionais, foram apresentadas neste capítulo. As características, as vantagens e desvantagens de três biosensores comerciais foram também descritas.

Embora a tecnologia SPR ofereça condições propícias para a construção de ferramentas de diagnóstico em aplicações TLR, as limitações apresentadas pelos biosensores comerciais tornam sua realização complicada. Neste sentido, o desenvolvimento de um dispositivo que alie as vantagens da tecnologia SPR, com uma estrutura de baixo custo, descartável, que evite a utilização de elementos internos e, portanto, reduza a influência dos efeitos da variação da temperatura ambiente sem a necessidade de utilizar circuitos de controle e/ou compensação é algo que vem sendo alvo de pesquisa nos últimos anos [60,61,102]. O biochip óptico SPR PPBIO é uma dessas alternativas. O próximo capítulo apresentará o projeto e a construção do dispositivo, enquanto que o Capítulo 4 apresentará os resultados preliminares com os biochips construídos.

Capítulo 3

Biochip SPR PPBIO: projeto e construção

O biochip SPR PPBIO proposto neste trabalho tem uma geometria simples, possui baixo custo e é descartável. Pretende-se aplicá-lo também para os modos AIM e WIM. O substrato óptico do PPBIO é um prisma óptico trapezoidal que foi fabricado com o polímero COC (*Cyclo-olefin Copolymer*), denominado comercialmente TOPAS [93], usando técnicas de moldagem por injeção. Sobre o prisma óptico, uma fina camada de ouro (50 nm de espessura) foi depositada. O polímero TOPAS COC, aspectos técnicos e detalhes do projeto do prisma polimérico e da deposição do filme fino de ouro são a seguir apresentados.

3.1 Prisma óptico: considerações iniciais

Nesta seção serão descritas as características do polímero TOPAS COC e os aspectos técnicos do projeto do prisma óptico SPR.

3.1.1 Polímero TOPAS COC

O polímero COC é um produto amorfo, composto de uma combinação de norboreno e alfa-olefina e que possui temperaturas altas de transição vítrea (acima de 200°C), em relação a outros polímeros [93]. Além disso, este material apresenta uma alta resistência mecânica e transparência [93, 103], baixa birrefringência e característica hidrofóbica, boa estabilidade

térmica, resistência química e uma densidade baixa. O fabricante do polímero TOPAS COC sugere o tipo 5013 para aplicações ópticas. A Tabela 3.1 apresenta um quadro comparativo de propriedades opto-mecânicas do TOPAS 5013 com o acrílico e o policarbonato, que são os polímeros mais utilizados para construção de dispositivos ópticos [104].

Tabela 3.1: Quadro comparativo de propriedades de certos polímeros

Propriedade	Unidade	Acrílico	Policarbonato	TOPAS COC 5013
Absorção de água	%	0,3	0,2	<0,01
Transmitância da luz	%	92,5	89	92
Índice de refração	(656,3 nm)	1,49	1,585	1,53
Coefficiente de expansão linear	$^{\circ}C^{-1}$	6×10^{-5}	7×10^{-5}	6×10^{-5}
Birrefringência	nm	13	>80	14,8

As propriedades ópticas do TOPAS COC 5013 são semelhantes a dos polímeros acrílico ou PMMA (*Poly-Methyl Methacrylate*) e do Policarbonato (Tabela 3.1). A absorção de água no TOPAS é menor que nos outros polímeros e a transmitância da luz e a birrefringência são equivalentes ao do acrílico e maiores que o do policarbonato. O TOPAS 5013 é mais estável quimicamente que os outros polímeros, especialmente na adsorção de proteínas e outras moléculas (vírus e bactérias, por exemplo) [60, 105].

3.1.2 Aspectos técnicos do projeto do prisma óptico

O biosensor óptico SPR descrito pela patente de Thirstrup, Zong e Neff[75], publicada em 2005, tinha os objetivos de reduzir os custos de projeto e fabricação e aumentar a simplicidade do biosensor óptico SPR VIR proposto em 2004 (ver Capítulo 2). A Fig. 3.1 apresenta a estrutura do biosensor descrito pela patente. Um prisma trapezoidal é o substrato óptico do biochip. Lentes cilíndricas são integradas na entrada e na saída do prisma para convergência dos feixes luminosos de entrada na região sensível, considerando utilização apenas no modo AIM. As superfícies inclinadas devem ser necessariamente especulares internamente, o que permite a reflexão interna dos feixes luminosos e o conseqüente acoplamento fóton-plásmon na região sensível. Para o espelhamento dessas superfícies foram utilizadas fitas

colantes prateadas utilizadas em automóveis. Um filme fino metálico é depositado na região sensível sobre o prisma óptico. O sinal de saída é detectado pela câmera CCD e o sinal elétrico resultante é a entrada da Unidade de Controle, Processamento e Visualização. A fonte de alimentação é também mostrada.

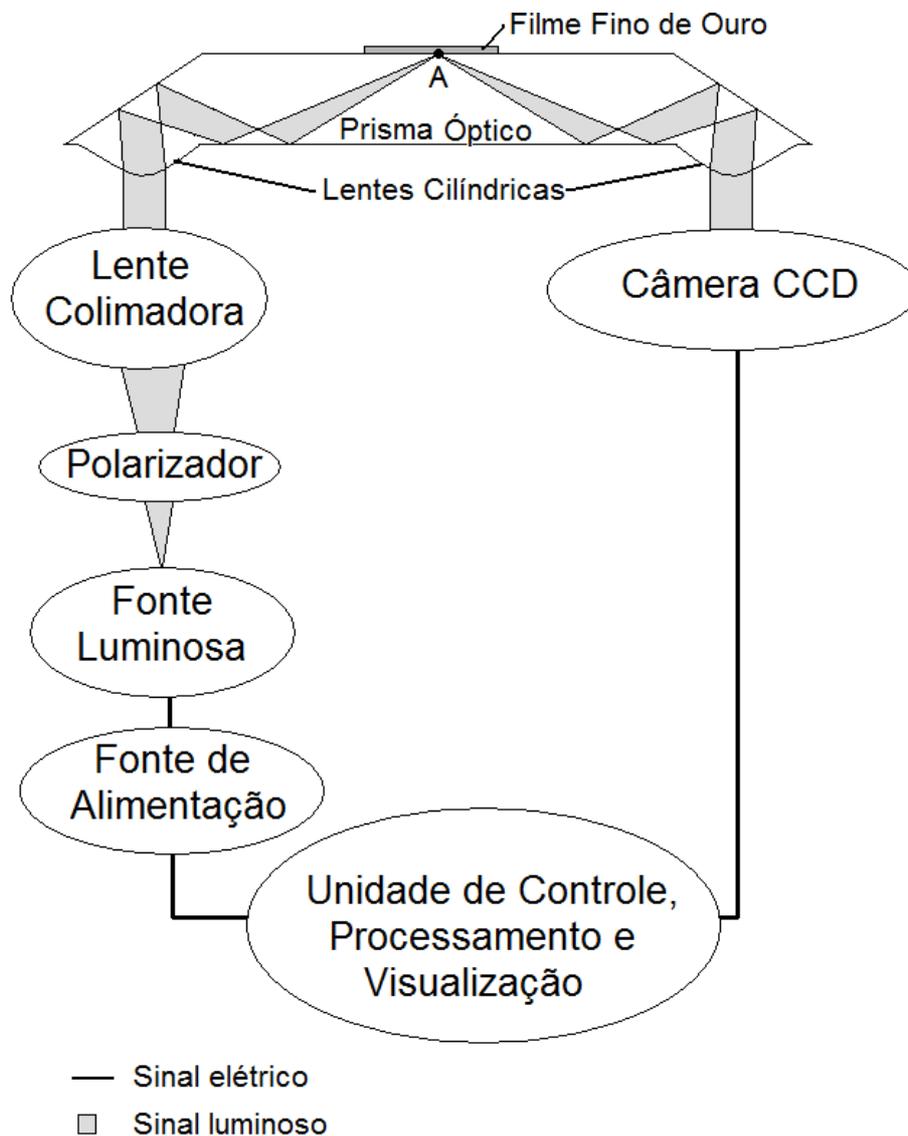


Figura 3.1: Estrutura do biosensor SPR proposto pela patente.

A altura do prisma da Fig. 3.1 deveria ser pequena de modo a garantir que houvesse apenas uma reflexão dos feixes luminosos na região sensível. Isso evitaria erros de captura pela câmera CCD, decorrente da presença de múltiplos pontos sensíveis. Valores de h entre 1 e 3 mm foram recomendados pelos autores da patente [75].

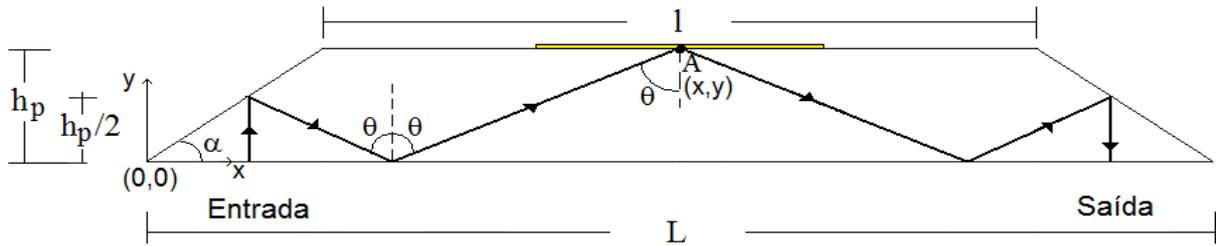


Figura 3.2: Estrutura do prisma óptico SPR, apresentando os dados de projeto.

O biochip óptico SPR ilustrado na Fig. 3.1 foi projetado e realizado neste trabalho. A Fig. 3.2 ilustra os detalhes do prisma óptico, com as dimensões e o traçado ideal dos feixes luminosos da entrada à saída, na condição de reflexão interna total. Sobre o prisma óptico há um filme fino de ouro de 50 nm.

A estrutura do prisma proposto pela patente de Thirstrup, Zong e Neff[75] (Fig. 3.1) foi modificada. Lentes cilíndricas externas foram escolhidas, exatamente pela dificuldade de fabricar lentes cilíndricas integradas ao prisma, como foi sugerido também pelos autores da patente. Com esta nova configuração, o feixe luminoso de entrada sofre um desvio maior do que teria com as lentes integradas e o efeito de dispersão da luz no detector óptico torna-se maior. Assim, conforme as dimensões da lente cilíndrica e das posições dos componentes ópticos externos, a ocorrência de reflexão interna total, a focalização dos feixes luminosos no ponto **A** e, conseqüentemente, a ocorrência do fenômeno SPR pode ser comprometida. Neste sentido, um estudo computacional, usando um programa de traçado de raios, é necessário para observar o caminho óptico percorrido pelos feixes luminosos de entrada e avaliar as dimensões e distâncias dos componentes ópticos ao prisma óptico.

A utilização de lentes cilíndricas é válida para operação no modo AIM. Todavia, diferentemente do proposto pela patente [75], o PPBIO pode operar também no modo WIM. Neste caso, as lentes cilíndricas são removidas e feixes colimados de entrada atingem a superfície inclinada do prisma óptico.

3.1.3 Projeto do prisma óptico SPR

Com a estrutura do prisma óptico SPR mostrada na Fig. 3.2, os seguintes aspectos de projeto foram considerados:

- O ângulo de inclinação das paredes laterais α (Fig. 3.2) define o ângulo de ressonância, de acordo com a igualdade $\theta_{RES} = 2 \cdot \alpha$ [106]. Conforme resultados de cálculos numéricos para um biosensor SPR de três camadas (TOPAS, filme fino de ouro e água) usando as equações de Fresnel [90], a curva SPR com as melhores características (posição de ressonância, largura de banda e assimetria) ocorre no ângulo de 68° . Esse foi o ângulo escolhido e, portanto, o ângulo de inclinação α é 34° .
- O comprimento de onda de ressonância escolhido foi de 670 nm. Esse valor de comprimento de onda foi escolhido baseado no estudo de sensibilidade descrito no Capítulo 2, onde foi observado que uma ampla faixa dinâmica (índices de refração na faixa de 1,3 a 1,38) e bons valores de sensibilidade nos modos AIM e WIM foram obtidos usando esse comprimento de onda (ver página 39) [60, 103];
- De acordo com as recomendações encontradas em [75], a altura h_p deve ser pequena (Fig. 3.2). O valor de 3 mm, recomendado pelos autores da patente [75], foi escolhido. Os valores obtidos por simulação confirmaram as hipóteses supracitadas, conforme será mostrado a seguir.

Com base nestes valores de parâmetros e usando a estrutura da Fig. 3.2, os valores dos comprimentos L e l foram determinados usando as seguintes relações:

$$L = 2 \left[\frac{h}{2 \tan \alpha} + \frac{h}{2 \tan 90^\circ - \theta} + h \tan \theta \right] \quad (3.1)$$

e

$$l = 2 \left[L - \frac{3}{\tan \alpha} \right] \quad (3.2)$$

Os valores resultantes dos cálculos e os demais parâmetros do prisma óptico SPR são indicados na Fig. 3.3, que ilustra a seção longitudinal do prisma e a vista superior do prisma, considerando uma largura de 20 mm.

3.2 Simulações ópticas

Um programa de traçado de raios (*ray tracing*) permite realizar a geometria de uma determinada estrutura óptica. Nas simulações ópticas, a fonte luminosa é normalmente mono-

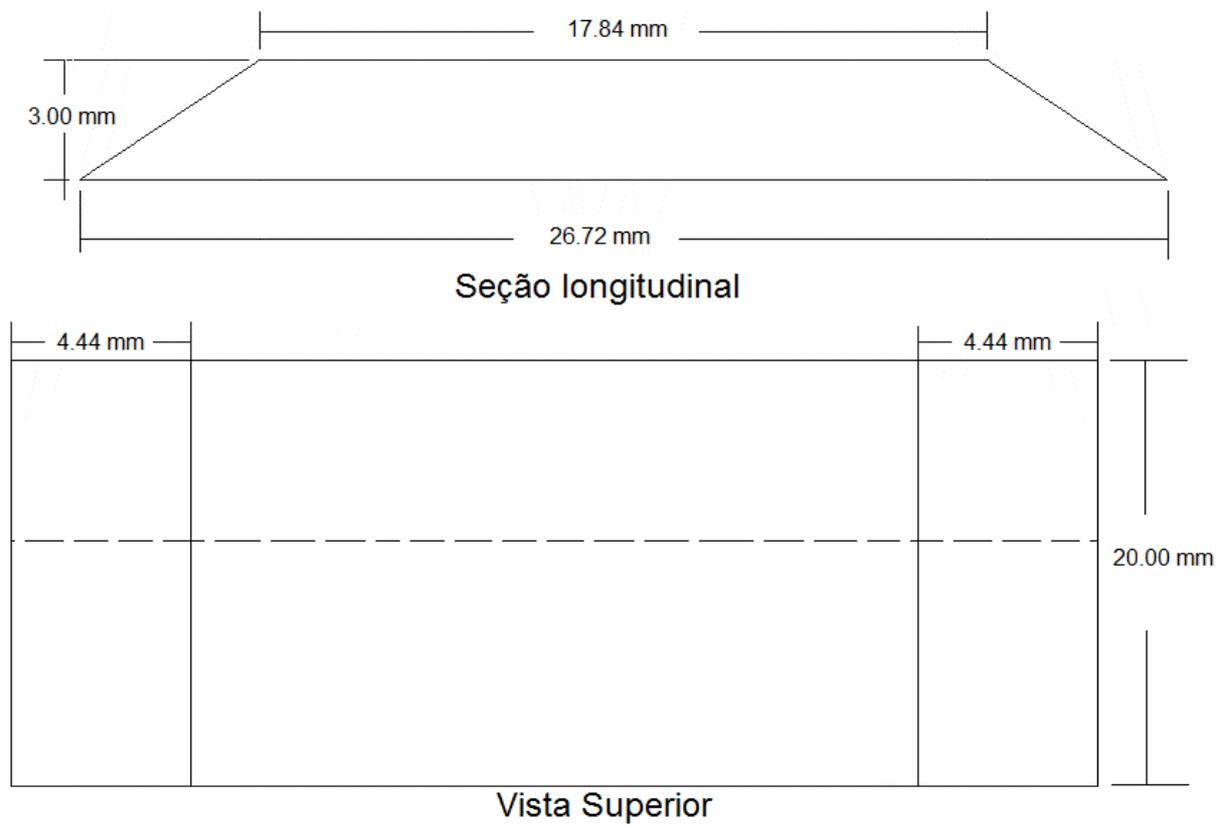


Figura 3.3: Seção longitudinal e vista superior do prisma, com os valores das dimensões calculados.

cromática, sendo permitido ao usuário alterar seus parâmetros, tais como o comprimento de onda, abertura do feixe, quantidade de raios a serem visualizados e utilizados nos cálculos¹. Os componentes ópticos podem ser rotacionados e deslocados. Bancos de dados de materiais ópticos podem ser utilizados para construir determinado componente óptico. O resultado final das simulações é o traçado de raios e a análise é feita normalmente por inspeção visual. É possibilitado também fazer o cálculo da potência luminosa, construir dispositivos multi-camadas, entre outras tarefas.

As simulações ópticas realizadas com o prisma óptico da Fig. 3.2 tiveram os seguintes objetivos:

- Observar e analisar o caminho óptico seguido pelos raios luminosos de entrada no interior do prisma óptico;
- No caso AIM, analisar se o foco do sistema óptico encontrava-se na região sensível do sensor SPR;
- No caso WIM, observar os efeitos do alargamento do feixe de entrada na geração de regiões sensíveis;
- Especificar a lente cilíndrica adequada.

O programa utilizado foi o OSLO Premium, que possui uma interface amigável e com facilidade na programação [88]. O prisma óptico e os demais componentes foram construídos no programa e a disposição dos mesmos é mostrada na Fig. 3.4a. Nesta figura, há uma distância D entre a lente cilíndrica e o prisma óptico. O detector óptico foi representado simbolicamente por um anteparo. Essa representação é válida apenas para o modo AIM. No caso WIM, a lente cilíndrica não está presente.

3.2.1 Projeto da lente cilíndrica

A lente cilíndrica plano-convexa converge os feixes luminosos de entrada, de modo que o foco encontre-se no ponto A (Fig. 3.2). Ela é utilizada apenas para o modo AIM. A lente

¹Os cálculos usam elementos de Óptica Geométrica. O Apêndice B apresenta noções de óptica geométrica, além de detalhes adicionais do traçado de raios e outros conceitos apresentados neste capítulo

cilíndrica possui os seguintes parâmetros a serem especificados (Fig. 3.4b): o foco f , o raio de curvatura R ; a espessura t ; o comprimento L ; e a altura H . A lente escolhida é feita com o vidro tipo BK7, cuja faixa de operação varia de 350 nm a 2 μm [107]. Os valores de R e t foram encontrados pelas simulações realizadas.

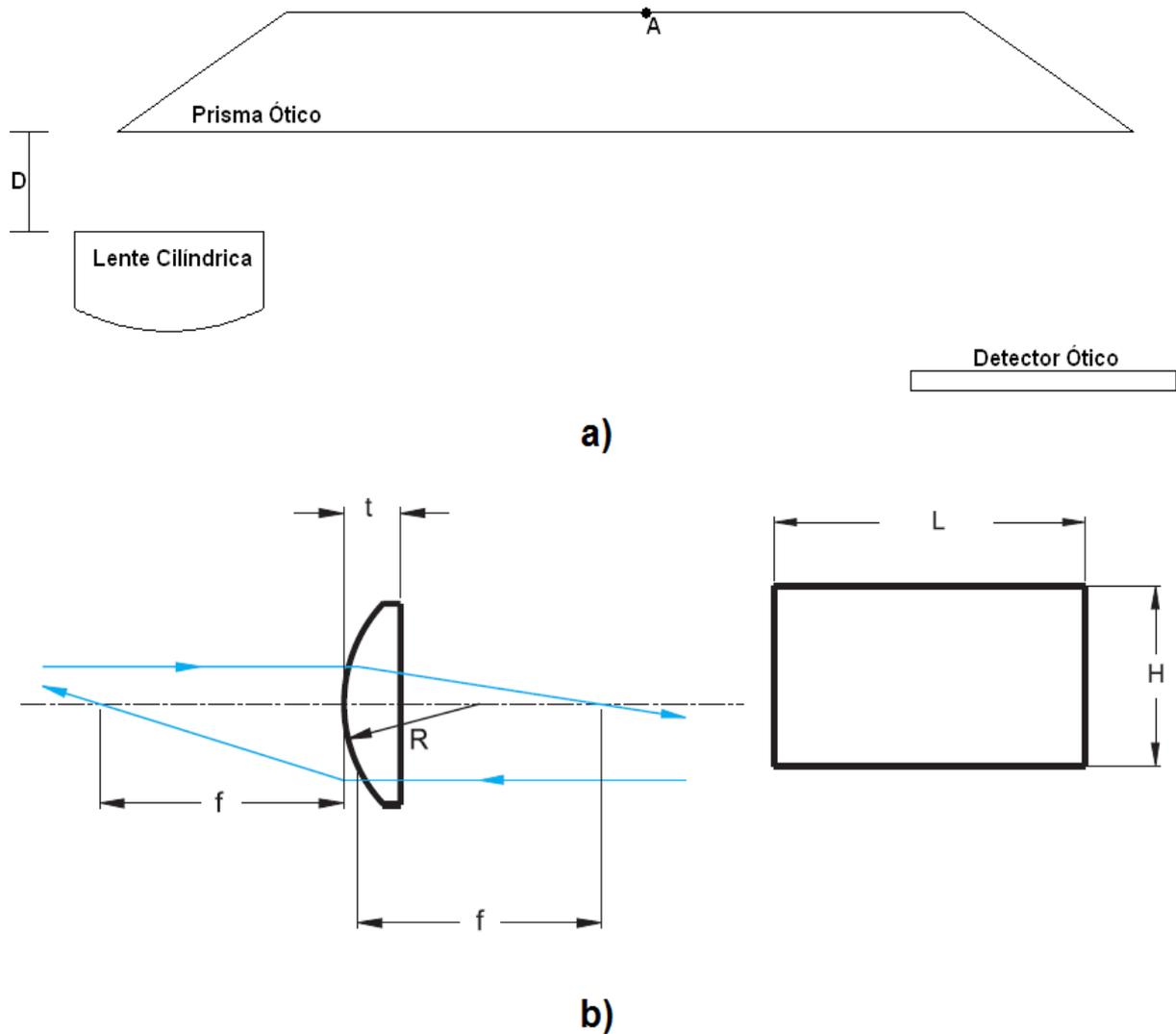


Figura 3.4: (a) Disposição espacial do prisma e demais componentes ópticos utilizados nas simulações; (b) Lente cilíndrica plano-convexa, apresentando os parâmetros de projeto.

3.2.2 Resultados e análise das simulações

Caso AIM

Nesse modo de interrogação, uma fonte de raios luminosos coerentes com frequência de 670 nm foi utilizada. A uma certa distância D da lente L encontra-se o prisma óptico projetado. O feixe luminoso atinge a superfície lateral de entrada do prisma que é espelhada [108]. Após essa incidência, os feixes são refletidos, baseados na ocorrência do fenômeno de reflexão interna total, e atingem a superfície lateral de saída (também espelhada) e, então, saem do prisma. A princípio, o foco deveria estar centrado na região sensível do biochip.

A lente cilíndrica plano-convexa apresenta duas dimensões que influenciam na posição do foco. O primeiro parâmetro é o raio de curvatura R (Fig. 3.4). Várias simulações foram realizadas com R variando de 8 a 14 mm. Essa faixa corresponde à faixa de variação de R no catálogo Thorlabs [109] para lentes cilíndricas plano-convexas. Na Fig. 3.5, para valores de R menores que 11,2 mm², o foco encontrava-se à esquerda do ponto A. Enquanto que, para valores de R maiores que 11,2 mm, o foco deslocava-se para a direita do ponto desejado.

O segundo parâmetro da lente cilíndrica influente na focalização dos feixes luminosos de entrada é a espessura t [109]. Variou-se t de 2 a 8 mm, conforme consulta ao catálogo Thorlabs [109]. Observa-se através dos resultados obtidos pelas simulações (Fig. 3.6) que o foco desloca-se da direita para a esquerda do ponto A, à medida que a espessura aumenta. Para uma espessura de aproximadamente 4 mm, o foco é localizado no ponto desejado.

Nas simulações envolvendo a variação de R foi usada uma espessura de 4 mm, e no caso das simulações referentes à variação de t_c foi usado um raio de curvatura igual a 11,0 mm. Verificou-se que uma variação de poucos milímetros nos valores de R e t_c proporcionam um efeito relativamente expressivo na localização do foco e, conseqüentemente, no desempenho do prisma óptico. O efeito foi mais apreciado na variação de R .

Considerando as condições apresentadas nas simulações a lente cilíndrica plano-convexa LJ1638L1 foi a que mais se aproximou dos valores de R e t calculados pelas simulações [109]. Os valores dos parâmetros da lente escolhida são:

- Altura $H = 12,5$ mm

²Esse valor foi encontrado após várias simulações no intuito de obter o foco no ponto A

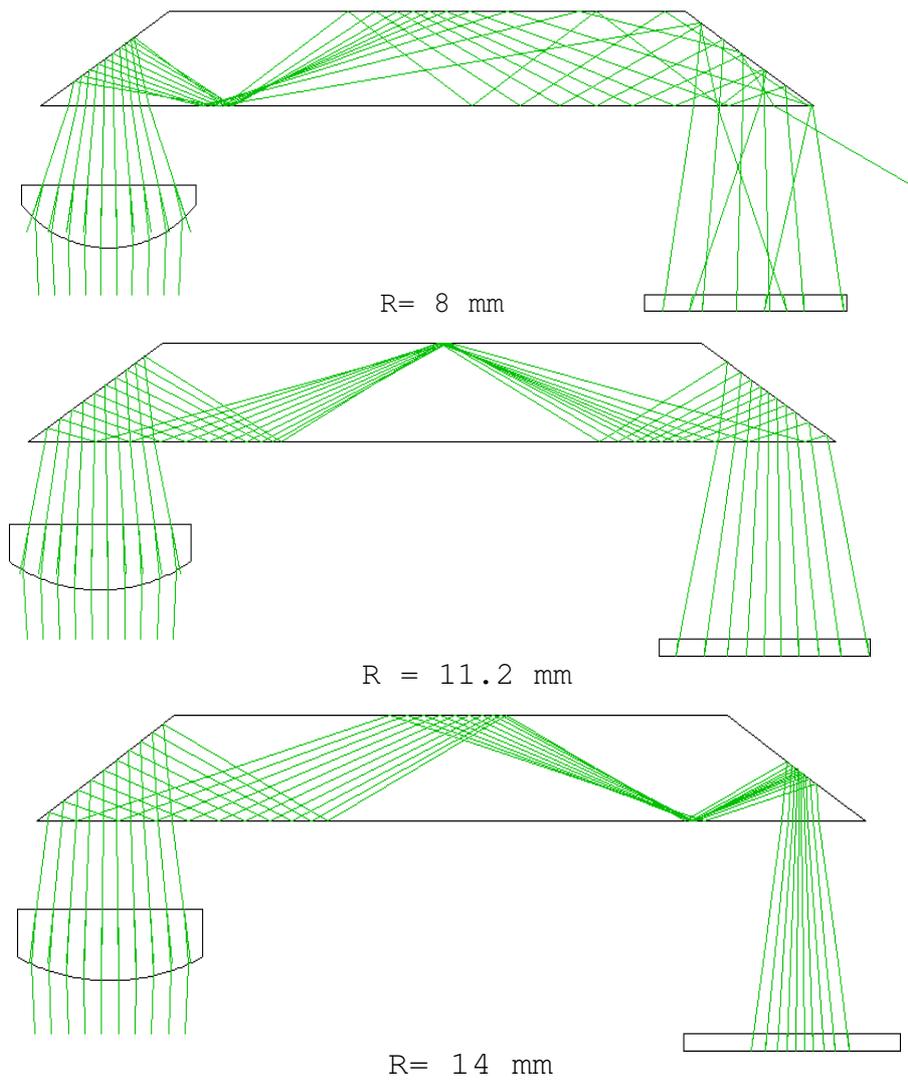


Figura 3.5: Efeitos da variação do raio de curvatura da lente cilíndrica no ponto de focalização do biosensor SPR. São mostrados os resultados para três diferentes raios R .

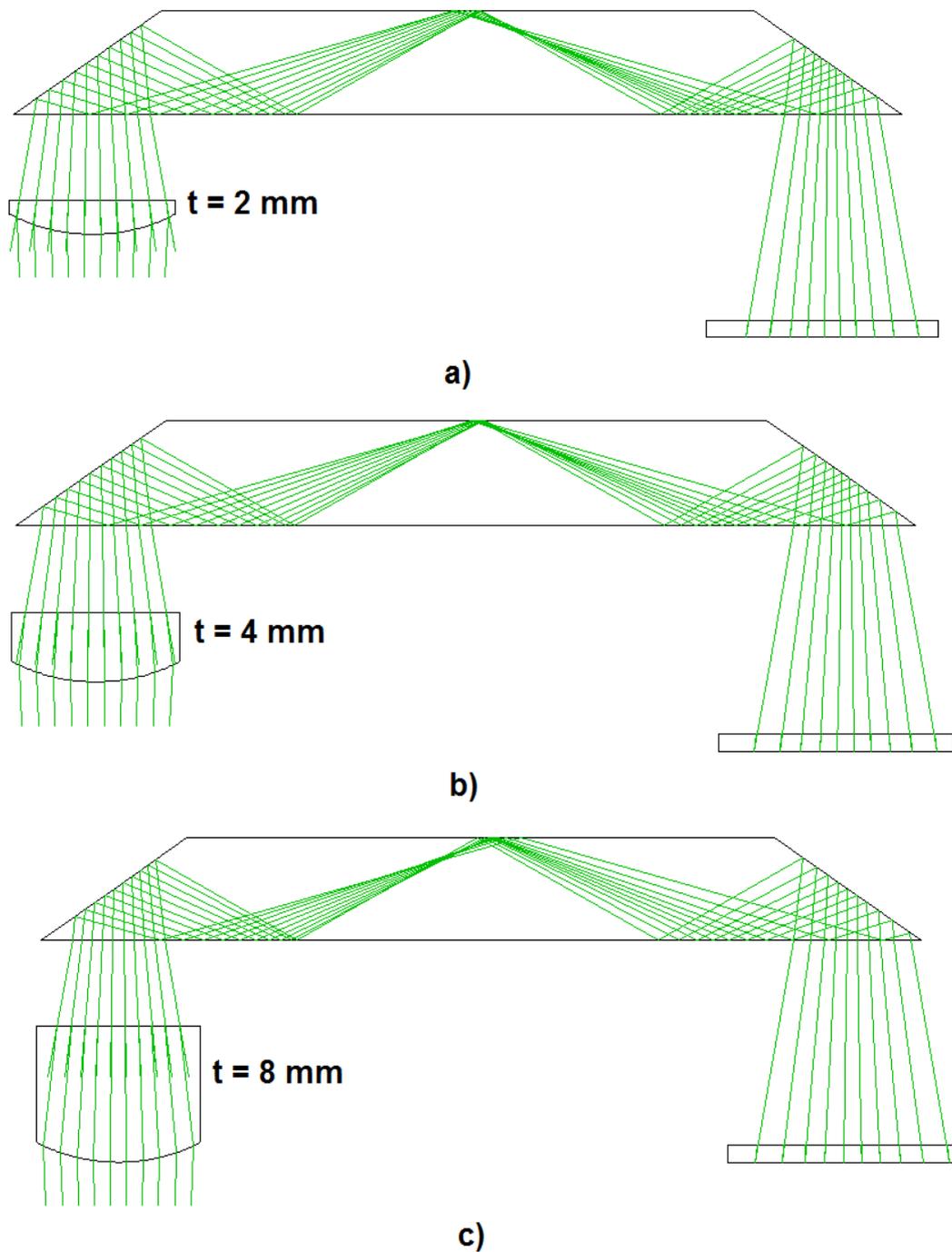


Figura 3.6: Efeitos da variação da espessura da lente cilíndrica na focalização dos feixes luminosos de entrada. São mostrados os resultados para três diferentes espessuras t

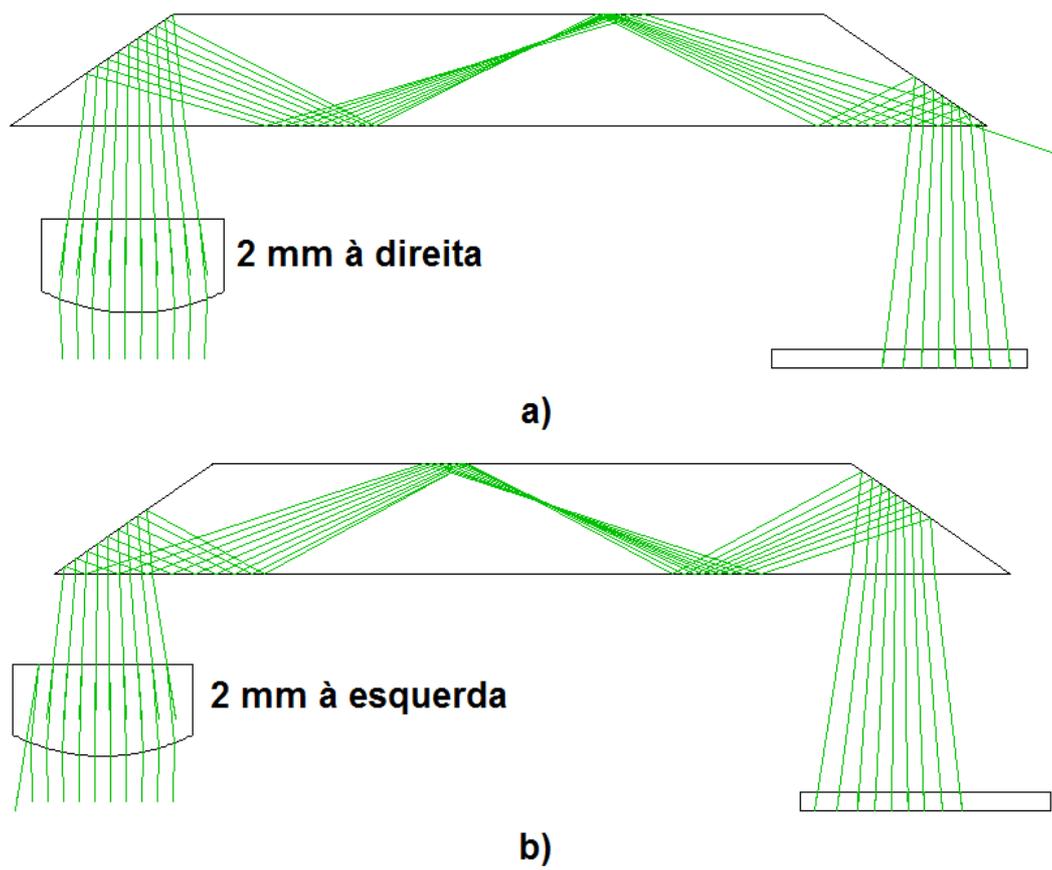


Figura 3.7: Efeitos da variação da posição da lente cilíndrica na horizontal, 2 mm para a direita (a) e 2 mm para a esquerda (b)

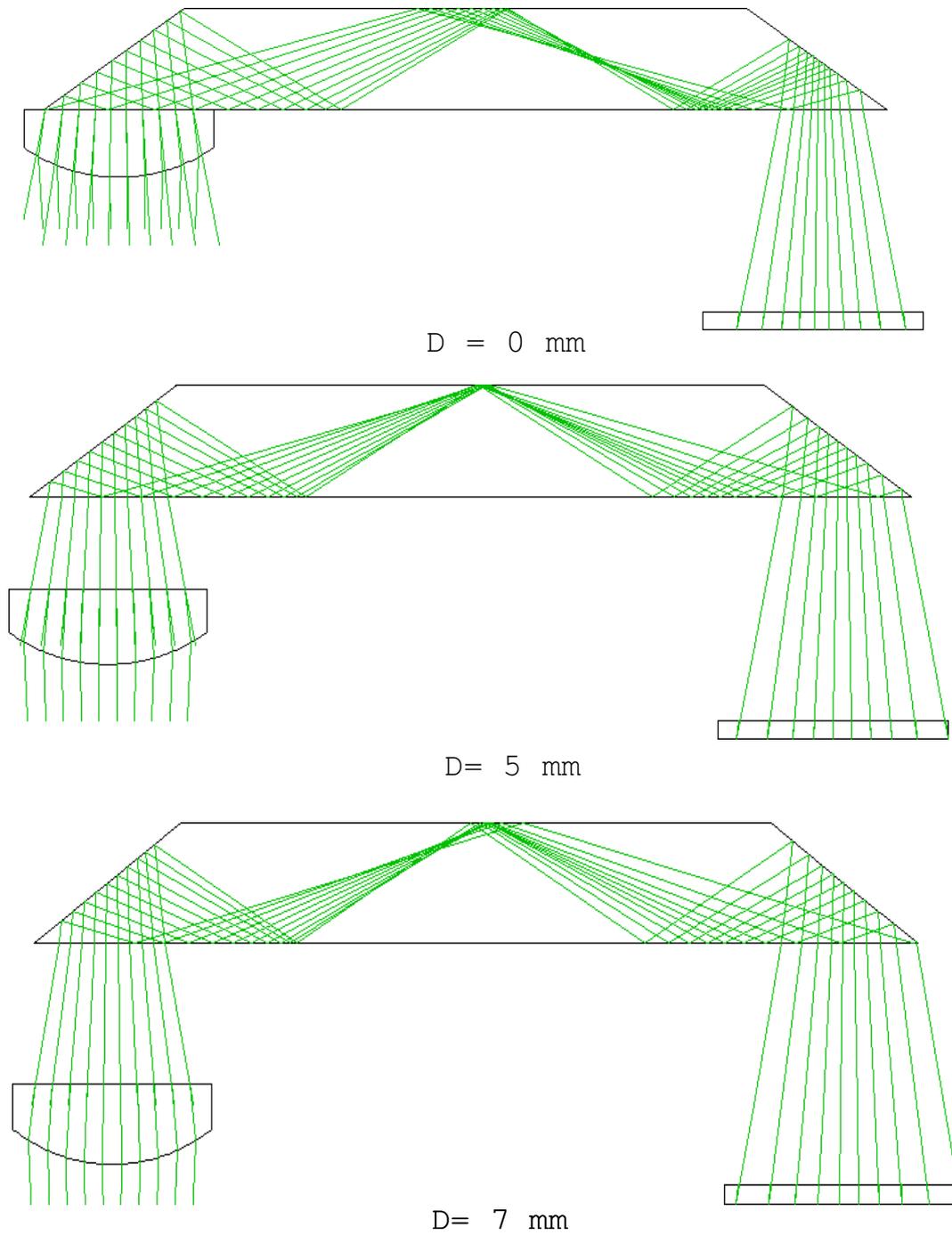


Figura 3.8: Efeitos da variação da distância D da lente cilíndrica ao prisma

- Largura $L = 15$ mm
- Raio de Curvatura $R = 11,5$ mm
- Espessura $t = 3,9$ mm
- foco $f = 20$ mm

Os valores de R e t calculados são diferentes daqueles obtidos pelo catálogo. Todavia, para confirmar a análise feita, o restante das simulações foi desenvolvida usando os valores de R igual a 11,5 mm e t igual a 3,9 mm.

Observou-se também que a alteração da posição do foco dependia da posição da lente cilíndrica. Para deslocamentos horizontais, isso é mostrado na Fig. 3.7, de 2 mm à direita (Fig. 3.7a) e à esquerda (Fig. 3.7b).

A variação da distância D , deslocamento vertical da lente cilíndrica, provoca também deslocamento do foco, conforme é mostrado na Fig. 3.8. Observa-se que à medida que a distância aumenta, o ponto de focalização desloca-se da direita para a esquerda, sendo que para um valor de 5 mm o foco encontra-se no ponto desejado.

Após os resultados ilustrados para a variação da posição horizontal e vertical da lente cilíndrica, foi observado que a diferença nos valores de R e t não teve um efeito significativo no traçado de raios no interior do prisma e focalização no ponto A.

Modo de interrogação espectral

Sem a lente cilíndrica de entrada, feixes de luminosos de entrada, paralelos entre si, são utilizados e, portanto, simulações para o modo WIM puderam ser realizadas.

Devido à ausência de opções do programa OSLO para o modo WIM, apenas o efeito da abertura do sistema ou EBR (*Entrance Beam Radius*) foi simulada. Essa abertura pode ser controlada na prática por um diafragma. EBR foi variado de 0,5 a 3 mm. Para alguns comprimentos de onda variando de 500 a 800 nm (dentro da faixa visível), feixes luminosos foram gerados pelo programa e incidiram na entrada do prisma polimérico. Observou-se que o aumento do valor de EBR produziu o espalhamento dos raios na superfície superior do prisma. Essa característica observada pode ser uma ótima indicação para a existência

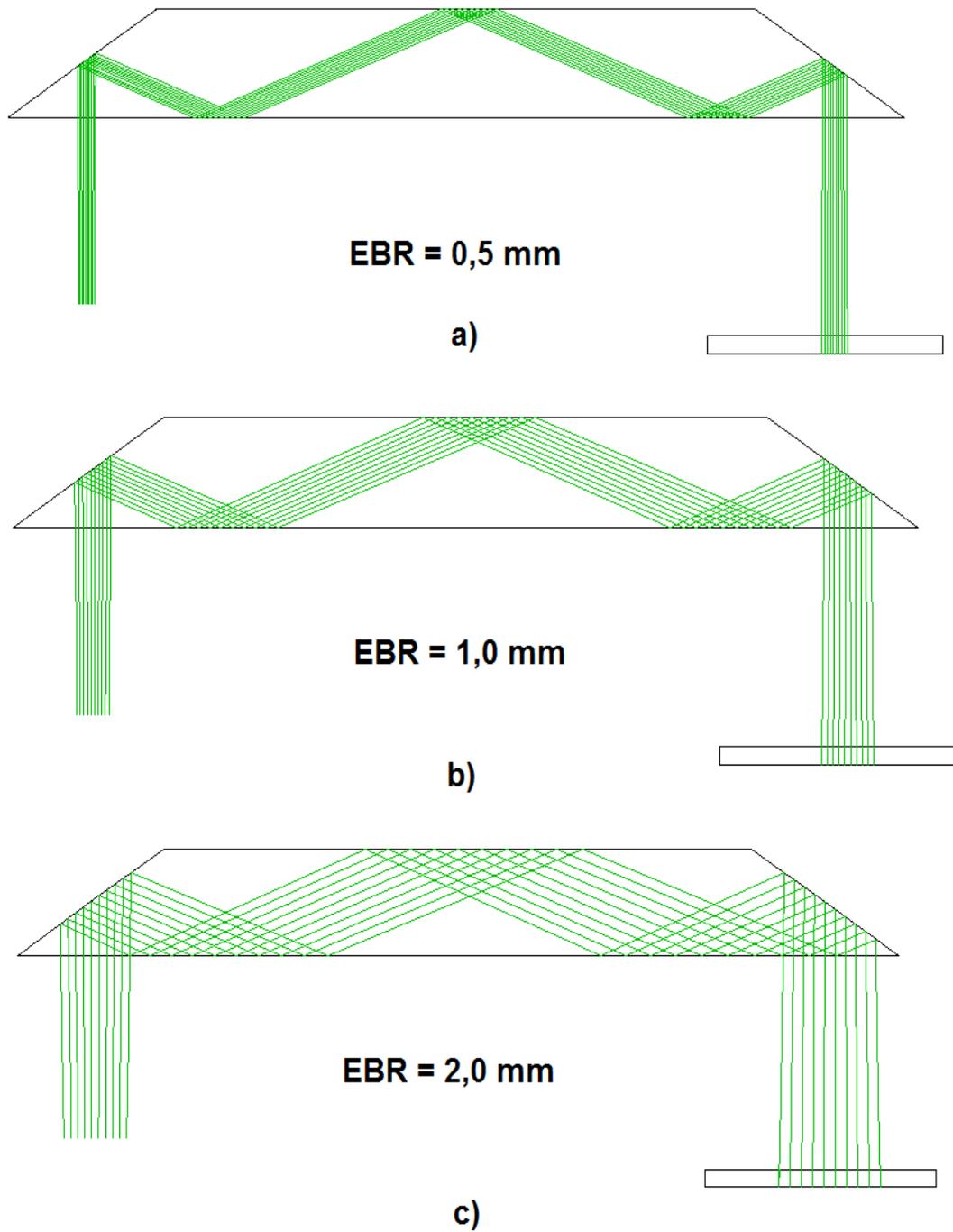


Figura 3.9: Efeitos da abertura do sistema (EBR) num biosensor SPR no modo WIM.

de vários pontos sensíveis, o que pode levar à construção de biosensores SPR com mais de um ponto sensível.

Considerações finais das simulações ópticas

As simulações ópticas realizadas Seja o ponto A, que é o foco desejado para os feixes luminosos incidentes, localizado pelas coordenadas (x,y) , conforme é ilustrado na Fig. 3.2. A influência da variação do raio de curvatura e da espessura da lente cilíndrica e da distância D pode ser medida verificando o deslocamento da posição do foco. Considerando os testes realizados, as Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 apresentam as posições (x,y) do foco deslocado. Há uma maior sensibilidade na variação do raio de curvatura e da distância D. Os valores escolhidos são destacados em negrito. Cuidados tem que ser tomados para reduzir o efeito dessas variações no funcionamento do prisma.

Tabela 3.2: Valores da posição (x,y) do foco em relação ao raio de curvatura R da lente cilíndrica

R (mm)	x(mm)	y(mm)
8	5,3	0,3
9	6,7	1
10,8	9,6	2
11,2	10	2,2
12	11,9	1,6
13	13,5	1
14	15	0,3

Tabela 3.3: Valores da posição (x,y) do foco em relação à espessura t da lente cilíndrica

t(mm)	x(mm)	y(mm)
2	11,2	1,9
4	10	2,2
6	9,8	2
8	9	1,8

Tabela 3.4: Valores da posição (x,y) do foco em relação à distância D

D(mm)	x(mm)	y(mm)
1	12,5	1,4
2	11,7	1,6
3	11,4	1,8
4	10,7	2
5	10	2,2
6	9,7	2
7	9,5	1,7

3.3 Fabricação dos prismas ópticos

O método de moldagem por injeção é o mais utilizado para fabricação de componentes ópticos, como lentes e prismas [104, 110]. Ele utiliza um processo de moldagem cíclico e é ideal para materiais termoplásticos, como o polímero TOPAS COC [110].

A fabricação dos componentes ópticos envolve várias tarefas, como: a construção de placas usadas para injeção e extração do polímero; construção de elementos para resfriamento e extração dos componentes ópticos do molde; construção do molde que contém a (s) cavidade (s), onde está gravado o perfil das peças ópticas a serem produzidas [111]. Dessas etapas, a fabricação do molde é a mais importante etapa no método de moldagem.

A descrição da fabricação do molde para os prismas poliméricos SPR será apresentado nesta seção. Primeiramente, serão descritos alguns aspectos técnicos importantes para a fabricação: a operação de uma máquina de injeção, modos de fabricação das placas de injeção e extração e efeitos associados à moldagem de componentes ópticos.

3.3.1 Moldagem por injeção

Uma máquina de moldagem por injeção é dividida em duas partes (Fig. 3.10): uma parte fixa ou de extração e uma parte móvel ou de injeção. O molde com o perfil das peças a serem fabricadas, encontra-se no limite dessas duas partes (Fig. 3.10). Os grãos de polímero são inseridos no funil e são conduzidos ao cilindro de injeção. Neste cilindro, há uma rosca

e resistências elétricas. O material é fundido e o fluido resultante é conduzido pela rosca de injeção ao molde. O fluido polimérico entra na cavidade do molde e, no mesmo instante, a parte extratora é deslocada pressionando o material fundido. Dutos de resfriamento existem para solidificar o material e após alguns segundos (esse tempo depende dos dados do fabricante e da aplicação [104]), as partes móvel e fixa são distanciadas novamente e as peças fabricadas são extraídas.

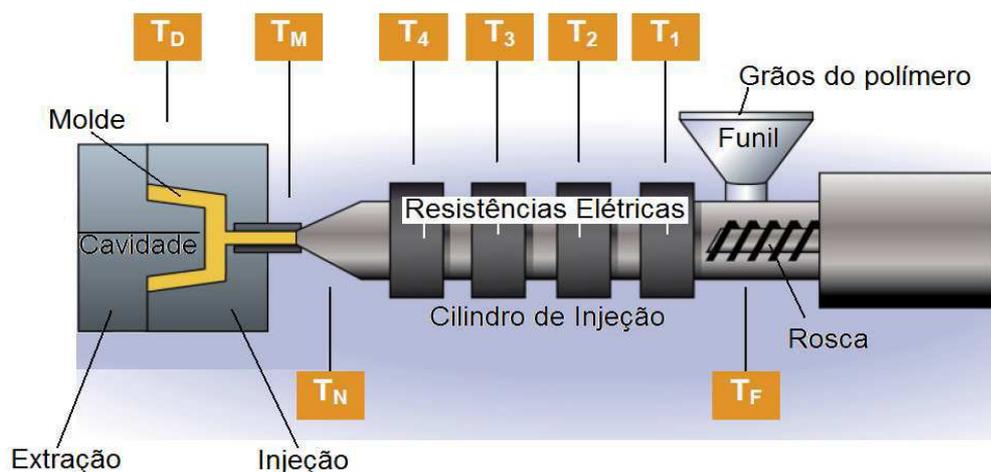


Figura 3.10: Estrutura de uma máquina de moldagem por injeção, onde as temperaturas críticas são apresentadas.

Na operação de uma máquina de injeção, alguns parâmetros são determinantes para propiciar uma boa qualidade das peças fabricadas [104, 112]: tempo e temperatura de injeção, temperatura do molde e do material injetado, pressão de injeção e tempo de resfriamento [112]. Embora as recomendações do fabricante sejam seguidas para a especificação desses parâmetros, a contração e a birrefringência impõem restrições à qualidade das peças fabricadas.

Contração

A contração (*shrinkage*) é um efeito da variação da densidade do polímero e, de forma correspondente, das dimensões da peça injetada com a variação de temperatura ao longo do processo de moldagem por injeção. A contração normalmente é medida pelo chamado fator de contração da moldagem e é geralmente um número na faixa de 2/1000 a 20/1000 ou 0,2 a 2%, respectivamente [113].

A alta variação da temperatura do polímero desde sua fusão até sua solidificação é uma das causas principais da contração. Outra causa está associada às variações fluido-dinâmicas do material ao longo da máquina injetora, desde a alimentação dos grãos e fusão até a solidificação e saída do produto final. Para a maioria dos polímeros, o fator de contração varia na faixa de 0,2% a 1%. O polímero TOPAS 5013 tem o fator de contração igual a 0,5%.

Para à redução da contração, as seguintes ações são recomendadas [114]:

- Reduzir a temperatura de injeção material e do molde;
- A pressão de injeção deve ser aumentada;
- Deve ser reduzida a quantidade de material a ser injetada;
- Aumentar a velocidade de injeção;
- Aumentar o tempo de molde fechado e a saída de ar da cavidade.

Birrefringência

A birrefringência é a decomposição de um feixe luminoso em dois componentes, chamados ordinário e extraordinário, quando ele passa através de um material opticamente anisotrópico³ [115]. O polímero TOPAS COC pode ser sujeito ao efeito da birrefringência no processo de moldagem por injeção, devido a orientação das cadeias do polímero o que torna o material anisotrópico. Quando a orientação das cadeias internas do polímero é aleatória, o material é isotrópico e o efeito birrefringente não está presente [116].

Boa parte dos fabricantes de dispositivos ópticos, como lentes e prismas, usam o método de recozimento (*annealing*) do material, após a fabricação das peças, para desordenar as cadeias internas do polímero e, assim, reduzir ou eliminar o efeito birrefringente. Por outro lado, esse método eleva o custo e o tempo de processamento [116]. Outras técnicas alternativas vem sendo apresentadas para eliminar/compensar o efeito da birrefringência num polímero [104, 116–118]: co-polimerização randômica; dopagem com molécula anisotrópica; adição de cristal birrefringente; a união de polímeros diferentes durante o processo de moldagem; e a inclusão de um material com birrefringência negativa. Este último método foi

³Material que não possui o mesmo índice de refração em todo o seu volume

utilizado para controlar a birrefringência em polímeros COC, como é o caso do TOPAS utilizado neste trabalho [118].

Uma estrutura simples que pode ser utilizada para a medição da birrefringência é a caixa de luz (*light box*), em que lâmpadas e dois polarizadores são utilizados.

3.3.2 Construção dos moldes dos prismas poliméricos

Dois moldes de materiais diferentes, bronze e aço, foram construídos para a fabricação dos prisma poliméricos SPR. Em ambos os moldes, o ângulo das superfícies inclinadas deveria ser precisamente 34° . Todavia, uma pequena curvatura das bordas, algo normal em injeção de peças desse tipo, poderia ocorrer sem prejuízo para a qualidade do prisma.

O perfil do molde de bronze apresenta uma cavidade com 10 mm de largura, conforme é ilustrado na Fig. 3.11. O molde de bronze tem um furo para injeção (Fig. 3.11), que é localizado no meio da cavidade. A parte superior do cavidade foi construída de aço e pode ser destacada do molde, o que facilita o polimento e possíveis reparos. As superfícies inclinadas na cavidade não são tão fáceis de serem polidas e são feitas em bronze. A placa de extração que completa o molde da Fig. 3.11 também foi construída de bronze.

O molde de aço possui três cavidades, com 20 mm de largura cada. O aumento da largura, em relação ao molde de bronze, visou, principalmente, facilitar o acoplamento de uma célula de fluxo à região superior do prisma. O aumento da quantidade de cavidades aumenta a quantidade de peças produzidas por ciclo de injeção. Furos adicionais para retirada do excesso de polímero também foram acrescentadas para cada cavidade, o que auxilia o controle da contração das peças fabricadas.

Para ambos os moldes, as recomendações do fabricante [103] para as temperaturas, pressão e velocidade a serem usadas na operação da máquina de injeção (Fig. 3.10) são:

- $T_F = 100^\circ\text{C}$
- $T_1 = 230 - 260^\circ\text{C}$
- $T_2 = 240 - 270^\circ\text{C}$
- $T_3 = 250 - 280^\circ\text{C}$

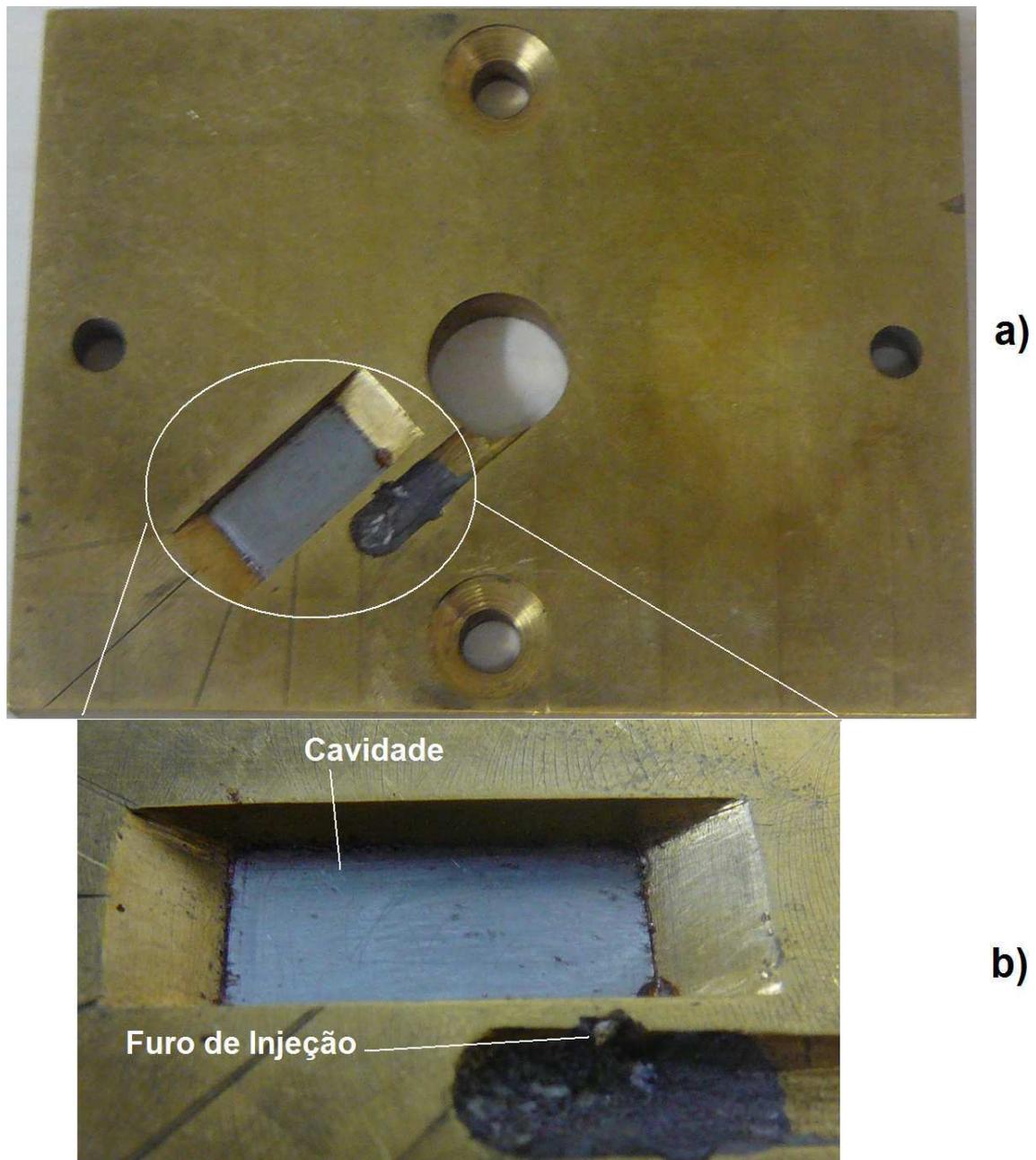


Figura 3.11: (a) Molde de bronze com um ponto de injeção; (b) Ampliação da cavidade do ponto de injeção.

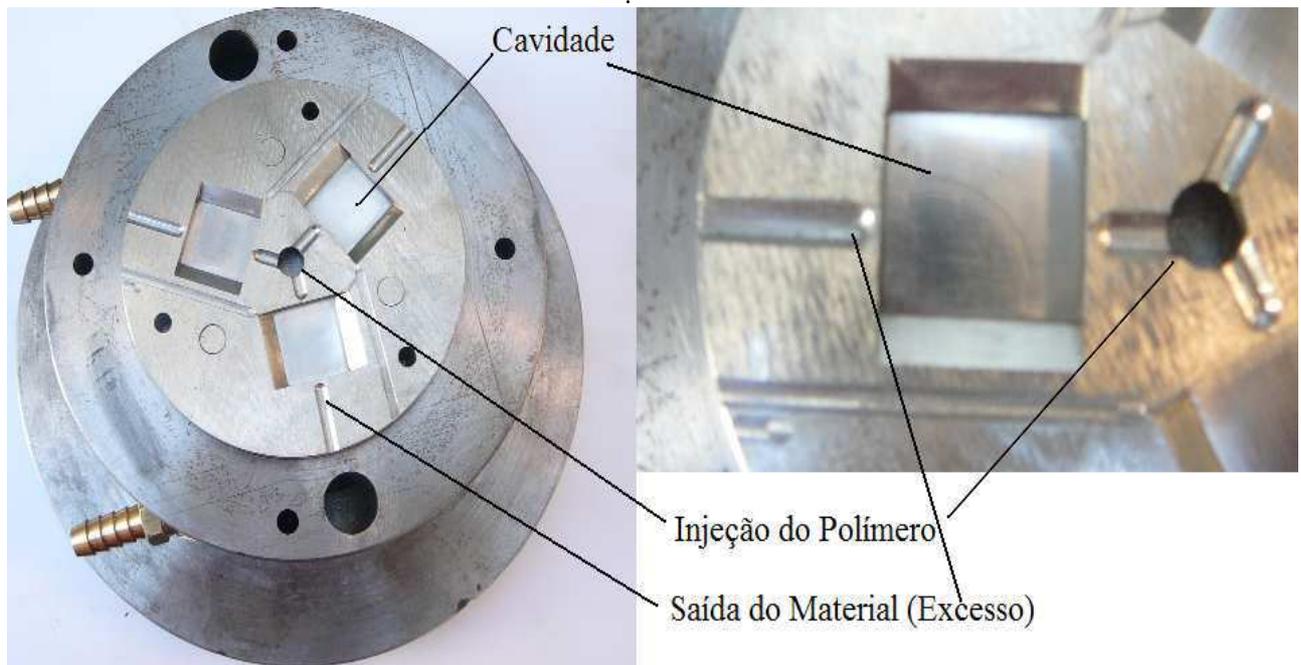


Figura 3.12: Bloco de aço da parte extratora, onde são apresentadas as três cavidades e os pontos de injeção e retirada de excesso do polímero e ampliação de uma cavidade.

- $T_4 = 260 - 290^\circ\text{C}$
- $T_N = 240 - 300^\circ\text{C}$
- $T_M = 240 - 300^\circ\text{C}$
- Temperatura de moldagem $T_D = 95 - 125^\circ\text{C}$
- Pressão de injeção $P_{SP} = 500 - 1100 \text{ bar}$
- Velocidade de injeção = $50 - 150 \text{ mm/s}$
- Tempo de injeção = 10 s

Embora essas recomendações tenham sido levadas em consideração para configuração da máquina de injeção utilizada, a mesma possuía apenas três pontos de inferência da temperatura. Todavia, os valores utilizados estiveram, aproximadamente, dentro das faixas de temperatura.

Nos moldes construídos, as superfícies laterais e as superfícies do topo e base foram polidas. Duas etapas de polimento foram usadas: a primeira usou lixas convencionais com

baixa abrasividade (tipo 1000 e 1200); a segunda usou pó de diamante. Com esse polimento, as tensões superficiais e o conseqüente aumento da contração dos prismas fabricados pode ser evitado.

Com a construção dos blocos componentes das partes de extração e injeção, conforme explicação precedente, uma máquina injetora convencional, de uma empresa em Campina Grande (USIMOLDES), foi utilizada para a construção do prismas ópticos.

3.3.3 Fabricação dos prismas poliméricos

Os prismas ópticos fabricados com o molde de bronze têm uma largura de 10 mm (Fig. 3.11b). A presença de apenas um furo de injeção produziu acúmulo de material no momento da extração da peça. Isso propiciou a presença de fissuras e bolhas em alguns prismas ópticos fabricados, conforme pode ser visto na Fig. 3.13a. Imagens usando um microscópio biológico (configurado com a maior ampliação) do prisma da Fig. 3.13a foram realizadas e uma delas é ilustrada na Fig. 3.13b. Para comparação da rugosidade da superfície e transparência foi coletada uma imagem de uma placa de vidro transparente (Fig. 3.13c). Quanto à rugosidade, a superfície do prisma, aparentemente, apresenta uma rugosidade baixa. A transparência observada do prismas é alta.

Um total de 20 prismas foram fabricados com cerca de 400 g de material. Portanto, cada prisma tem um peso aproximado de 2 g.

Na fabricação dos prismas com o molde aço, um melhor controle das variáveis do processo de moldagem foi providenciado, com vistas a melhoria da qualidade da superfície do prisma, e procurando evitar bolhas e fissuras nos prismas fabricados. Um total de 100 prismas foram fabricados com cerca de 300 g de material. Dessa forma, cada prisma tem um peso aproximado de 3,0 g para cada prisma óptico. Perdas existiram no tocante à limpeza do canhão de injeção, pelo fato da máquina de injeção ser utilizada na produção de outras peças plásticas de diferentes tonalidades.

A foto do prisma polido é mostrado na Fig. 3.14a. Diferentemente da imagem apresentada na Fig. 3.13a, não há a presença de fissuras nem bolhas na estrutura superficial do prisma. Imagens microscópicas do prisma fabricado também foram retiradas usando o microscópio biológico. Assim como no caso do prisma da Fig. 3.13, quando comparada com

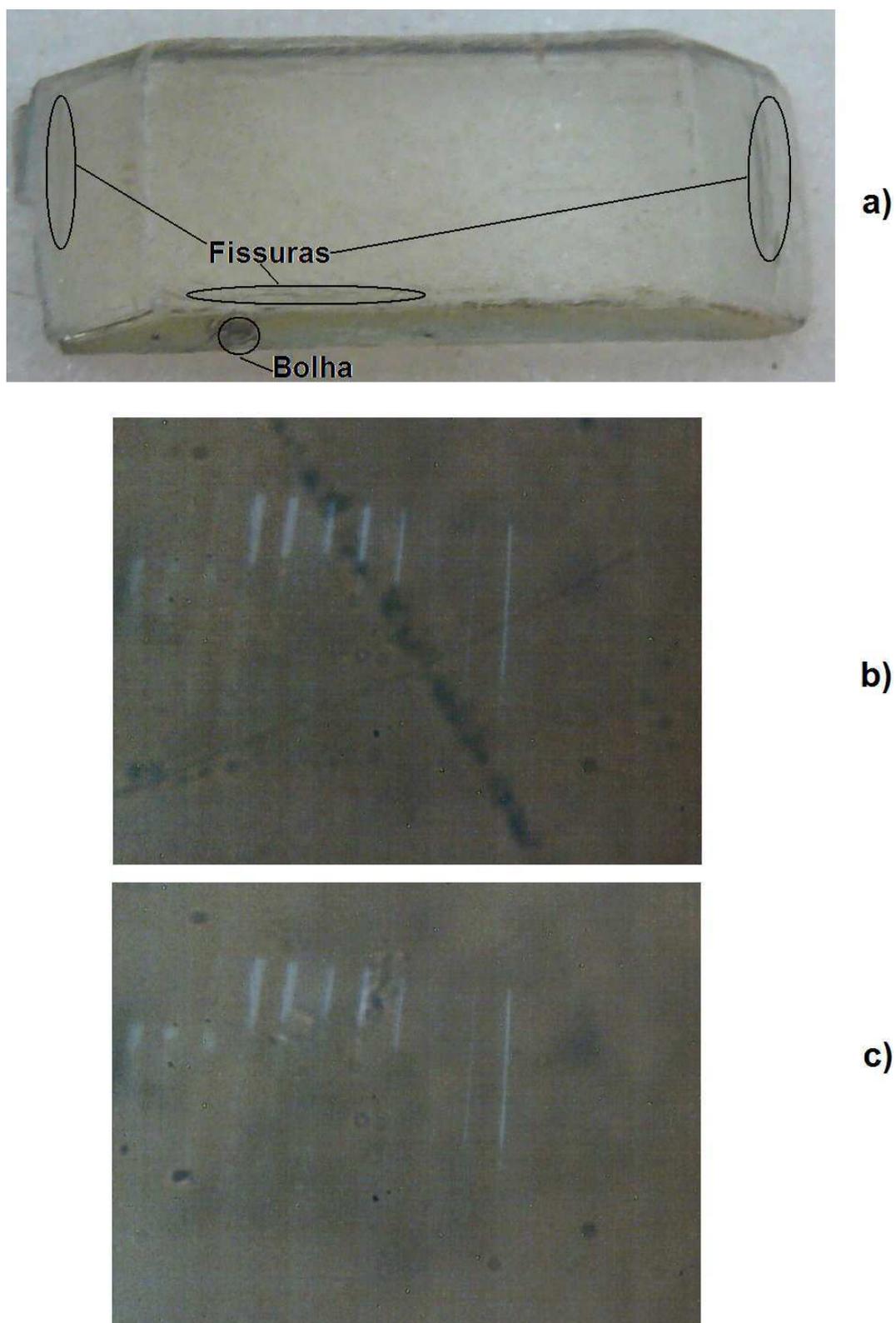


Figura 3.13: (a) Foto do prisma fabricado, destacando as fissuras e bolha presentes; (b) Imagem microscópica da superfície superior do prisma; (c) Imagem microscópica de um vidro polido (imagem de referência).

a amostra de vidro, a rugosidade é baixa e a transparência é alta.

A qualidade boa dos prismas ópticos foi desejada na fabricação dos mesmos com os moldes de bronze e aço. Após a fabricação, alguns procedimentos foram utilizados para reduzir possíveis imperfeições e sujeiras na superfície superior do prisma. O objetivo foi tornar essa superfície o mais suave e limpa possível, pois a mesma seria coberta com um filme fino de ouro de 50 nm.

3.3.4 Pré-tratamento dos prismas fabricados

Os prismas fabricados com os moldes de bronze e aço foram submetidos a um pré-tratamento mecânico e químico antes da deposição do filme fino de ouro. Essas etapas de polimento e limpeza foram utilizadas para reduzir/eliminar imperfeições existentes na fabricação dos prismas ópticos, como resquícios de material na superfície e sujeiras superficiais.

O óxido de alumínio (alumina) como material abrasivo e uma lixadeira convencional foram utilizados para o polimento. O tempo de polimento de cada prisma foi de cinco minutos, aproximadamente, com uma velocidade de rotação baixa da lixadeira, em torno de 100 rpm. Após o polimento, os prismas foram cuidadosamente imersos dentro de uma cuba ultra-sônica com solução de etanol (90%) por, aproximadamente, 2 minutos. O objetivo era limpar a superfície dos prismas, retirando gorduras e impressões digitais presentes.

Após essas etapas, os prismas foram cobertos com filme fino de ouro.

3.3.5 Deposição do filme fino de ouro

Para a deposição (cobertura) de filmes finos metálicos em biosensores SPR, os métodos de Evaporação e Pulverização Catódica (*Sputtering*) são os mais utilizados [22]. O método de pulverização catódica apresenta vantagens sobre o método de evaporação [119–121]: a deposição é uniforme; há um melhor controle dos parâmetros do processo; há a possibilidade de monitorar as propriedades do filme fino; e a deposição de várias camadas num mesmo substrato é possível. A pulverização catódica consiste no bombardeamento de partículas carregadas (íons de Argônio, normalmente) em um alvo sólido, que contém a substância (metal) a ser depositada no substrato. Esse bombardeamento ocasiona o desprendimento de átomos do metal e cria um plasma gasoso eletrizado e a baixa pressão. Os átomos des-

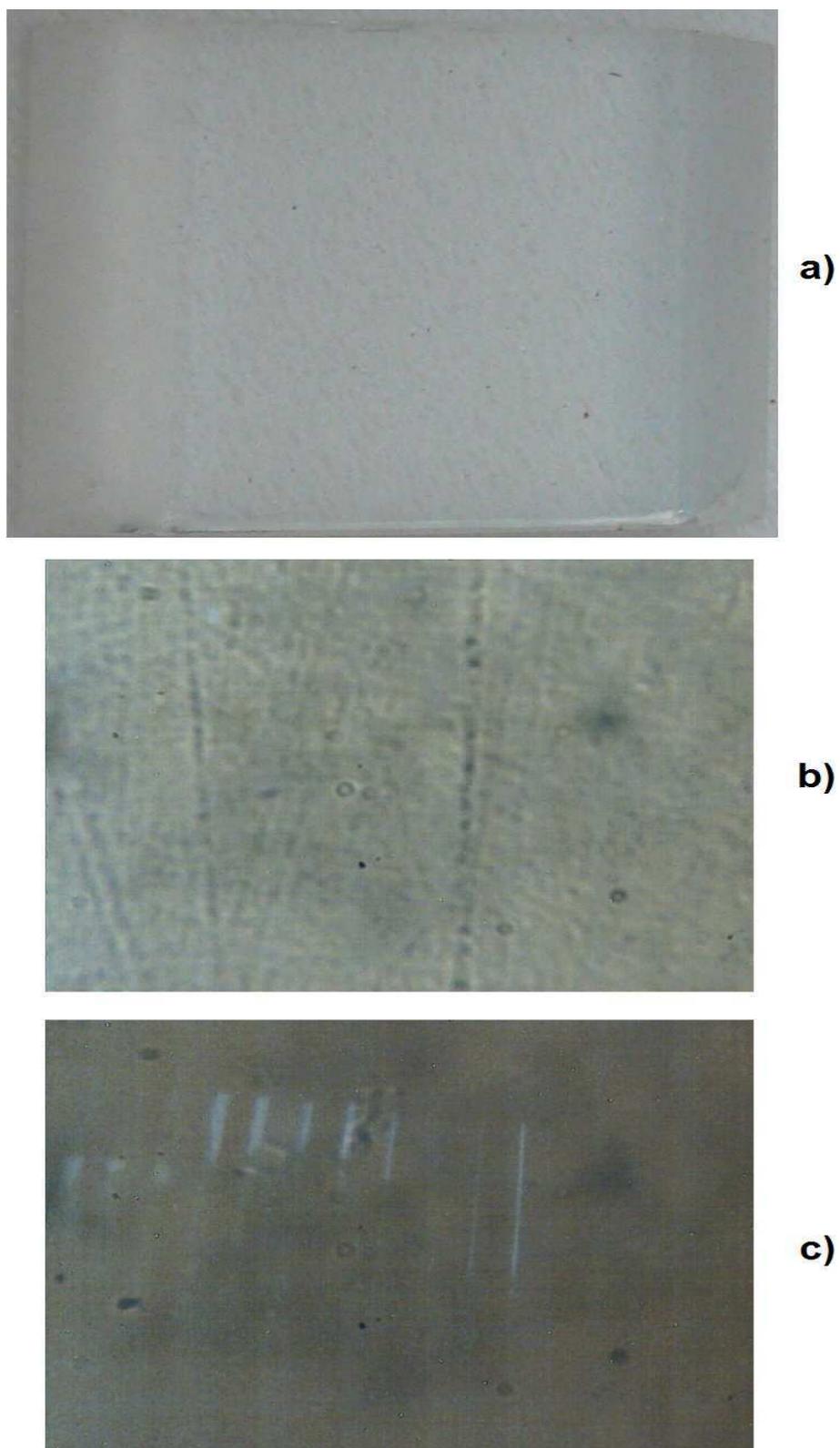


Figura 3.14: (a) Foto do prisma fabricado; (b) Imagem microscópica da superfície superior do prisma; (c) Imagem microscópica de um vidro polido (imagem de referência).

prendidos são progressivamente depositados no substrato. Dependendo da corrente elétrica das partículas carregadas e o tempo de deposição possibilitam estimar a espessura do filme fino metálico. Micro-balanças de cristal de quartzo (QCM - *Quartz Crystal Microbalance*) e microscopia eletrônica de transmissão e força atômica são utilizados para analisar o filme metálico depositado.

Um equipamento de cobertura usando pulverização catódica da empresa EMITECH [122], modelo K550X, foi utilizado para a deposição de 50 nm de ouro sobre os prismas ópticos fabricados. Esse equipamento pertence ao Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa). No processo de deposição, a pressão de argônio foi de 4 psi ou 0,3 bar, aproximadamente. A configuração do equipamento, cuja foto é mostrada na Fig. 3.15, é bastante simples. É necessário apenas que a pressão do vácuo seja ajustada para 1×10^{-1} mbar e que sejam especificadas a corrente de geração do plasma ou corrente de deposição e o tempo de permanência do prisma óptico na câmara de vácuo. Esse tempo é relacionado à corrente do plasma e à espessura do filme fino de ouro através da curva mostrada na Fig. 3.16.

A corrente de deposição foi especificada de acordo com a Fig. 3.16. O valor de corrente de 35 mA foi utilizado que corresponde a taxa de deposição nominal de 10 nm/min. O equipamento possui uma restrição de tempo de 4 min. Dessa forma, duas interações de 2,5 min cada foram utilizadas para produzir filmes finos de ouro com 50 nm de espessura.

Para os moldes de bronze e aço, 20 prismas de cada foram cobertos com o filme fino de ouro de 50 nm.

3.4 Comentários Finais

As características de projeto e fabricação do biochip proposto foram apresentadas neste capítulo. O prisma polimérico possui geometria simples, é descartável e de baixo custo. Além disso, não possui elementos mecânicos rotativos, nano-componentes internos (como as gratículas de difração holográficas), e elementos eletro-ópticos integrados. Um pré-tratamento mecânico e químico foi realizado nos prismas ópticos fabricados com moldes de bronze e aço. Cerca de 40 prismas foram cobertos com 50 nm de ouro.

O próximo capítulo apresentará os testes preliminares realizados com os biochips PPBIO.



Figura 3.15: *Sputtering* utilizado na deposição do filme fino de ouro.

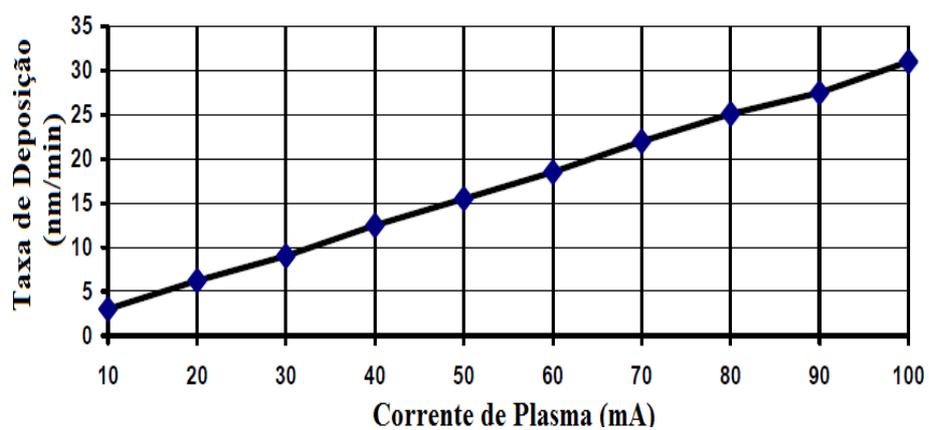


Figura 3.16: Curva utilizada na deposição do filme fino de ouro.

Plataformas de testes foram montadas unicamente para esses testes, usando elementos ópticos de acoplamento, fontes e detectores ópticos e um sistema eletrônico de processamento e visualização de dados. Os resultados dos testes e as discussões associadas também serão apresentados.

Capítulo 4

Testes experimentais: resultados e discussões

Considerando os critérios de projeto dos moldes apresentados no capítulo anterior, PPBIOs foram fabricados usando o processo de moldagem por injeção. Sobre a região central superior do prisma foram depositados filmes finos de ouro de 50 nm e os chamados biochips foram então desenvolvidos. Esses biochips foram adicionados a duas plataformas de testes, unicamente desenvolvidas para os testes preliminares nos modos de interrogação AIM e WIM. Nestas plataformas, não havia quaisquer mecanismos de manipulação microfluídica, como célula de fluxo e bomba peristáltica e o processo de adição dos analitos utilizados foi realizado pelo gotejamento da solução aquosa na região sensível do biochip SPR. O objetivo principal desses testes preliminares foi comprovar a ocorrência do fenômeno SPR, ou seja, considerando as condições propícias de ocorrência do fenômeno, como apresentadas no Capítulo 2, verificar no detector óptico (Câmera CCD ou Espectrômetro) a refletividade mínima na curva SPR. Consequentemente, outro objetivo foi observar o deslocamento da posição de ressonância com a exposição do biochip fabricado a diferentes índices de refração.

Os dispositivos componentes das plataformas de testes, para geração e detecção dos feixes luminosos incidentes e de processamento do sinal, serão apresentados. Os resultados preliminares e discussões associadas também serão apresentadas, considerando três soluções aquosas como analitos. Ambas as plataformas de testes tiveram componentes de conexão simples e de relativo baixo custo, fornecidos pela empresa Thorlabs [107].

4.1 Plataformas de testes experimentais

4.1.1 Modo de Interrogação Espectral

O diagrama de blocos da plataforma de testes utilizada no modo WIM é ilustrada na Fig. 4.1a, enquanto uma foto dessa plataforma é apresentada na Fig. 4.1b. A seguir são apresentados detalhes dos elementos eletro-ópticos que compõem essa plataforma.

Diodo de luz branca

A fonte de entrada policromática é um diodo de luz branca tipo Luxeon Star - White Lambertian, fabricado pela Philips Lumileds [123]. A distribuição espectral do sinal de saída desse diodo é mostrada na Fig. 4.2 [123]. É um LED produzido a partir de um LED azul InGaN (*Indium Gallium Nitride*) que, devido a deposição de fósforo de diferentes cores, produz a luz branca [124]. Possui alto brilho e gera até 45 lm de luminosidade para uma corrente máxima de 350 mA. Possui um substrato de alumínio, o que permite uma boa dissipação de calor, reduzindo as exigências de controle de temperatura. Possui uma eficiência de energia bem maior que a maioria das lâmpadas halógenas, que são normalmente usadas na literatura como fontes policromáticas de biosensores SPR, e uma vida útil em torno de 100 mil horas. Embora as fontes halógenas possuam uma resposta mais plana ao longo do espectro visível, comparativamente a do diodo de luz branca (Fig. 4.2), o custo dessas lâmpadas é bem maior e o tempo de vida útil é menor. Além disso, o diodo de luz branca agrega outros benefícios tais como maior sensibilidade, maior robustez e tamanho reduzido.

Polarizador, lente colimadora e diafragma

Diferentemente do caso da fonte monocromática, um diodo de luz branca não é polarizado. Neste caso, um polarizador é necessário para que apenas feixes p-polarizados atinjam a região sensora e assim promovam a ocorrência do fenômeno SPR. Além do filtro polarizador, uma lente colimadora e um diafragma foram também utilizados para tornar paralelos entre si os feixes luminosos incidentes e restringir a luminosidade de entrada, respectivamente.

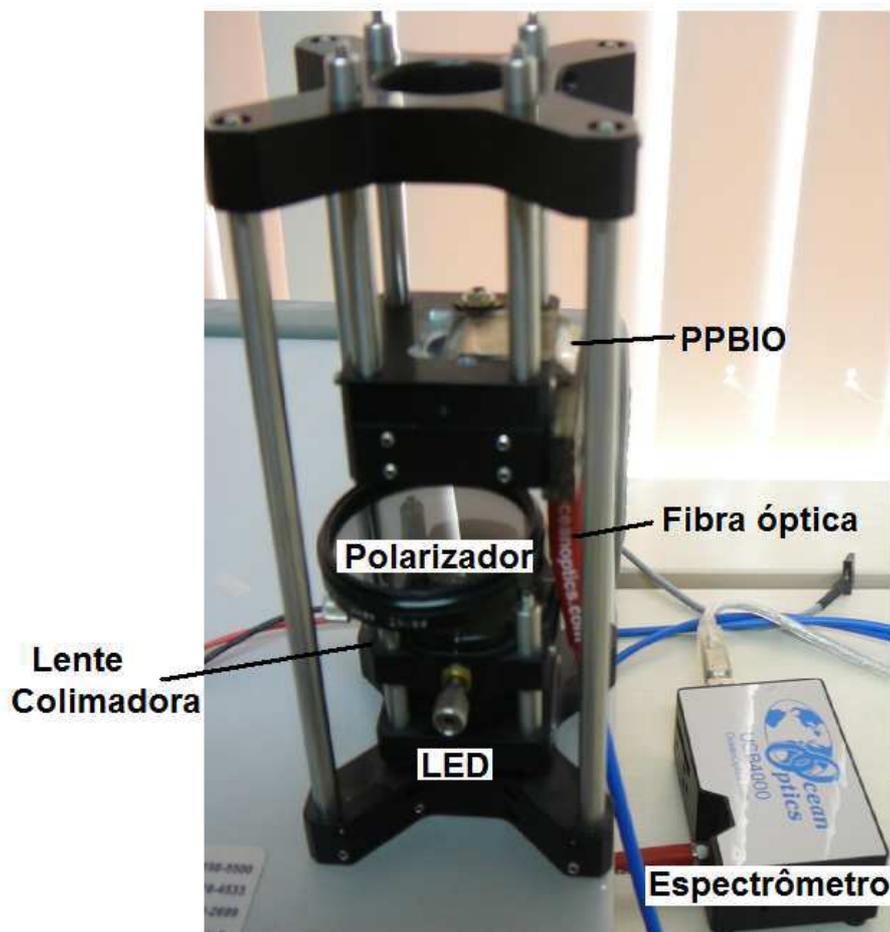
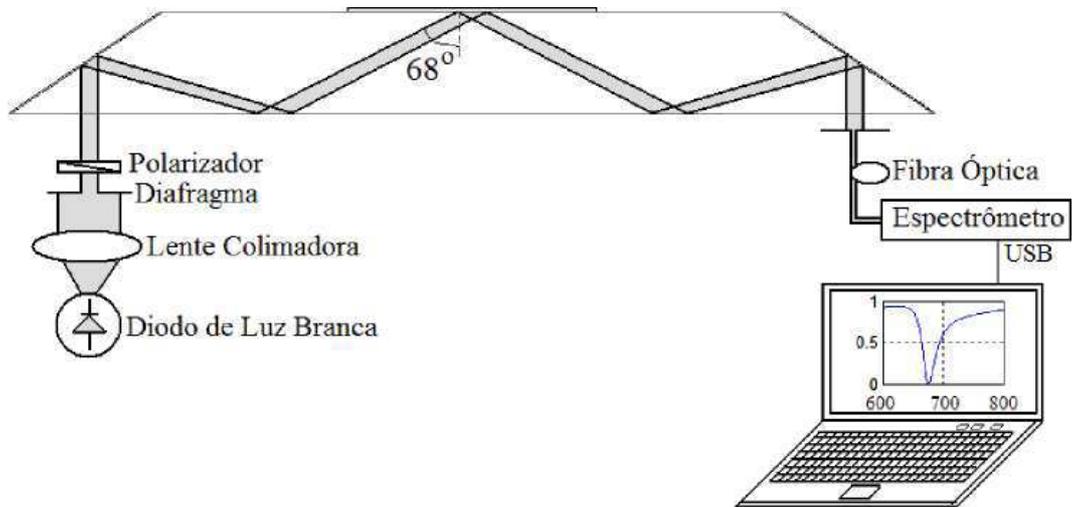


Figura 4.1: Estrutura da plataforma de testes utilizada para o modo WIM, apresentando (a) o diagrama de blocos e (b) uma foto com os elementos utilizados para geração e adequação dos feixes luminosos, a fibra óptica. Na foto, o espectrômetro não é ilustrado.

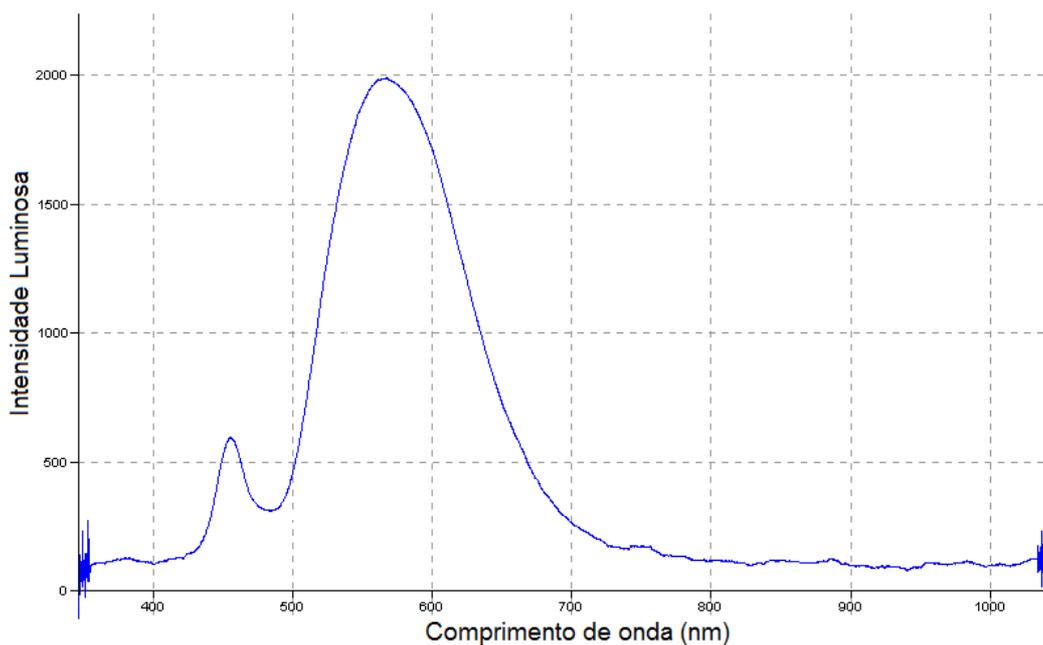


Figura 4.2: Distribuição espectral do sinal de saída do diodo de luz branca utilizado nos experimentos.

Espectrômetro

O detector ótico usado no modo WIM foi o espectrômetro USB4000-VIS-NIR da empresa Ocean Optics [125]. Ele possui um chip CCD de 3648 pixels, com alta relação sinal-ruído [125] e que pode ser utilizado dentro da faixa de comprimento de onda de 350 a 1000 nm. É possível, assim como no caso da câmera CCD já descrita, realizar interfaces em outras plataformas, tais como C++, Java e LABVIEW, onde todos os recursos do instrumento são acessíveis.

Assim como no caso da câmera CCD, o usuário do espectrômetro escolhido pode alterar parâmetros que estão intimamente relacionados com as figuras de mérito de um biosensor SPR, especialmente a relação sinal-ruído e a sensibilidade refratométrica. Os parâmetros são:

- *Boxcar Width*: este parâmetro controla o agrupamento dos quadros de imagem, permitindo a retirada de componentes harmônicos de alta ordem e, conseqüentemente, o aumento da relação sinal ruído. Estes componentes estão presentes no sistema devido a falhas de detecção da matriz CCD, à variação da corrente do diodo laser, entre

outras razões [56, 80]. Quanto maior o *Boxcar Width*, maior é a relação sinal-ruído. Todavia, se quadros demais forem agrupados isso pode acarretar perda do sinal e, conseqüentemente, redução de desempenho. Para os testes realizados, *boxcar Width* foi igual a 40;

- Tempo de integração: quanto maior for o tempo de integração, maior será a relação sinal-ruído. Contudo, o aumento do tempo de integração ocasiona aumento na magnitude da refletividade do sinal de saída [107]. Esse parâmetro também deve ser bem escolhido para evitar redução de desempenho do biochip. Para a maioria dos testes realizados, o tempo de integração utilizado foi de $150000\mu s$;
- *Times to average*: o aumento desse parâmetro também aumenta a relação sinal-ruído. Para os testes realizados, esse parâmetro teve o valor de 5.

4.1.2 Modo de Interrogação Angular

Para o modo AIM, o diagrama de blocos mostrado na Fig. 4.3a apresenta os elementos ópticos e eletrônicos utilizados e a Fig. 4.3b apresenta uma foto da plataforma montada evidenciando os componentes eletro-ópticos utilizados. Nessa estrutura, o feixe luminoso colimado e p-polarizado gerado por uma fonte monocromática, diodo laser, converge, após entrar no interior do prisma, ao foco localizado na região superior central do prisma. Neste caso, diferentemente da maioria das propostas apresentadas na literatura [25, 26, 56, 59], não há quaisquer elementos mecânicos rotativos nem a presença de óleo ou gel no biochip SPR [26, 65]. A seguir são apresentados os elementos eletro-ópticos utilizados nos experimentos.

Diodo laser

Para geração dos feixes luminosos foi utilizado um diodo laser vermelho (RLT6705MG), fabricado pela empresa Roithner Lasertechnik [126]. Uma tensão de entrada de aproximadamente 3 V foi aplicada e um controlador de corrente usando o regulador LM317 foi utilizado. O circuito controlador de corrente forneceu uma corrente de saída controlada de 22 mA, aproximadamente, ao diodo laser [126]. A operação do diodo laser realizada nos experimentos teve um valor de corrente abaixo do limiar.

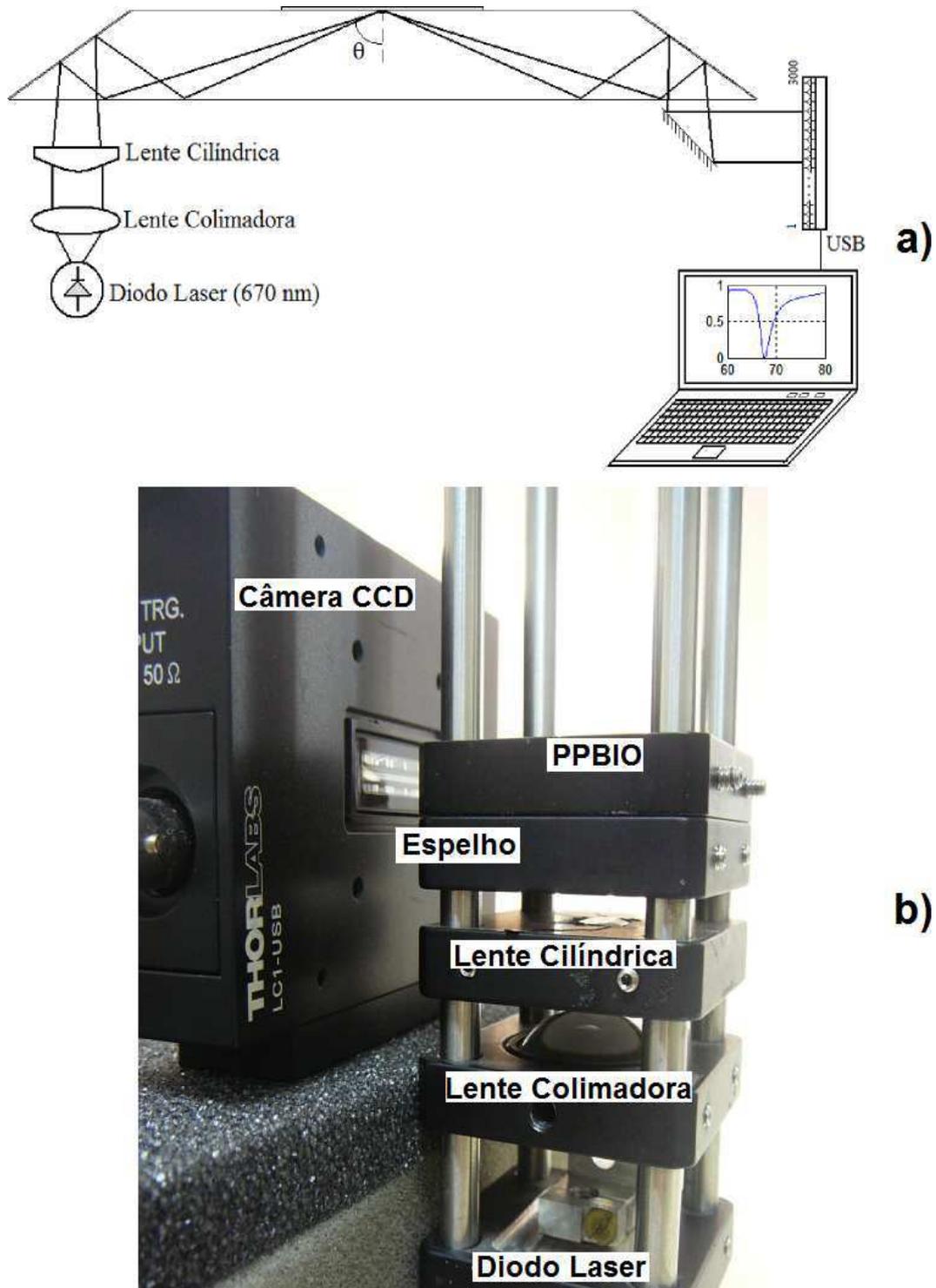


Figura 4.3: Estrutura da plataforma de testes utilizada para o modo AIM, apresentando (a) o diagrama de blocos e (b) uma foto com os elementos utilizados para geração e adequação dos feixes luminosos e a câmera CCD utilizada.

Lentes colimadora e cilíndrica

Para a colimação dos feixes luminosos de entrada, uma lente esférica plano-convexa, fabricada com vidro tipo BK-7, foi utilizada [107]. O efeito colimador dessa lente torna os raios divergentes da saída do diodo laser paralelos entre si. A lente cilíndrica, por sua vez, converge o feixe colimado de modo que ao entrar no prisma, o foco esteja localizado na posição desejada (centro da região sensível). A distância dessa lente ao prisma é muito importante para o cálculo do caminho óptico e, conseqüentemente, à focalização dos feixes luminosos incidentes, conforme foi discutido no capítulo anterior.

Para as operações de colimação e convergência do feixe luminoso de entrada, um ajuste adequado da posição entre os elementos ópticos descritos é necessário. Foi observado que o valor ajustado da distância entre o prisma e a lente cilíndrica coincidiu com àquela prevista pelas simulações, ou seja, em torno de 4 mm.

Câmera CCD

A câmera CCD LC1-USB, unidimensional, da empresa Thorlabs [127] foi utilizada nos experimentos para a aquisição dos sinais refletidos do prisma óptico. Ela possui dimensões de 3,6" x 2,6" x 1,0" e um total de 3000 pixels. Cada pixel tem dimensão de 7x200 μm .

A utilização da câmera é bastante simples, bastando conectar o cabo USB da câmera ao PC e utilizar o programa fornecido pela Thorlabs, ou utilizar os drivers disponibilizados pelo fabricante e construir interfaces em JAVA, C++ ou LABVIEW, por exemplo [127]. O tempo de integração pode variar de 1 μs a 200 ms e a faixa espectral varia de 350 nm a 1000 nm. Além disso, há um conversor A/D interno de 12 bits com a taxa de varredura máxima de 190 varreduras por segundo.

Ao usuário da câmera CCD é permitido a correção da corrente escura e de minimização de ruído. A minimização de ruído ocorre pelo ajuste de dois parâmetros:

- *Boxcar Width*: a definição é similar àquela apresentada para o espectrômetro;
- *Tempo de integração*: a definição e as características associadas são as mesmas para o espectrômetro.

Espelho plano

Para facilitar a detecção dos sinais luminosos pela câmera CCD, um espelho plano foi utilizado para refletir os sinais de saída do PPBIO para a câmera CCD.

4.2 Resultados e Discussões

Os testes com o molde de bronze foram iniciados, após a defesa do exame de qualificação, em agosto de 2009, e resultados satisfatórios foram obtidos em outubro e novembro de 2009. Alguns testes foram realizados com a plataforma de testes do modo AIM, e os resultados foram também satisfatórios, com o efeito SPR sendo observado. Todavia, devido à facilidade operacional, uma maior quantidade de testes foi realizada com a plataforma do modo WIM. Cerca de 20 prismas poliméricos foram produzidos com o molde de bronze e metade apresentaram a ocorrência da ressonância. A outra metade, ou apresentada muitas fissuras e bolhas ou tinha uma cor amarelada e nenhum resultado foi observado.

Os testes com o molde de aço foram iniciados em abril de 2010 e devido ao exíguo tempo, tendo em vista o término dos quatro anos de doutorado (abril de 2010), poucos testes foram realizados com os prismas ópticos fabricados. Eles foram exclusivamente realizados no modo WIM. Todavia, a transparência dos prismas e a ausência de fissuras e bolhas fizeram com que 15 dos 20 biochips construídos apresentassem o efeito ressonante na presença de um analito.

Com esses resultados, a qualidade dos prismas fabricados é essencial para a ocorrência do efeito SPR e, conseqüentemente, ao bom desempenho do biochip fabricado. Os biochips SPR fabricados foram avaliados em sua qualidade pelos valores da posição de ressonância e largura de banda. Estudos recentes têm caracterizado valores adequados para esses dois parâmetros [87, 89, 90]. A posição de ressonância foi a estabelecida pelo projeto do prisma óptico SPR, ou seja, 68° para o modo AIM e 670 nm para o modo WIM. No caso da largura de banda, este parâmetro fica em torno de 2° , na temperatura ambiente (25°C) para o modo AIM [87, 89, 90]. Enquanto que no caso do modo WIM, a largura de banda fica em torno de 90 nm [89, 90], para a temperatura ambiente.

Utilizando as plataformas experimentais para os modos WIM e AIM, os testes experi-

mentais foram realizados. Inicialmente serão mostrados os resultados para os biochips de largura de 10 mm fabricados e, em seguida, os resultados com os biochips de 20 mm de largura. Com vistas a facilitar o entendimento de cada um dos testes realizados, as figuras relacionadas, mostradas a seguir, apresentam uma numeração correlata.

Finalmente, as discussões dos resultados serão apresentadas.

4.2.1 Resultados utilizando os biochips SPR fabricados com o molde de bronze

Modo WIM

O feixe de entrada luminoso (Fig. 4.1a) deve ser colimado e possuir uma largura pequena, conforme apresentado no Capítulo 3. Um diafragma foi utilizado para reduzir a largura do feixe incidente. Além disso, a posição horizontal/vertical do feixe pode também ser ajustada. O polarizador, localizado após a lente colimadora no caminho óptico percorrido, deve ser ajustado para a posição que filtre a componente *s* e, portanto, permita a passagem apenas da componente *p* do sinal colimado de entrada.

A posição do prisma óptico também pode ser ajustada, conforme é indicado na Fig. 4.1b. A posição ótima do prisma e dos demais componentes da plataforma era a que propiciava uma magnitude maior do sinal refletido pelo prisma SPR. Há no suporte do prisma óptico um parafuso para fixar o prisma óptico na posição desejada (Fig. 4.1b) e assim evitar possíveis deslocamentos do prisma e conseqüente redução da magnitude do sinal refletido. Também existe um sistema de ajuste horizontal do cabo de fibra óptica (Fig. 4.1b).

Com os devidos ajustes realizados, os testes com os biochips ópticos produzidos com o molde de bronze foram iniciados. Uma gota de água destilada foi depositada sobre o filme fino de ouro usando um dosador manual. A gota de água foi posicionada na região central do prisma.

A Fig. 4.4 apresenta o resultado obtido para um biochip SPR. É apresentado o sinal de saída detectado pelo espectrômetro, evidenciando que para comprimentos de onda maiores que 800 nm e menores que 400 nm, a quantidade de ruído é maior do que para os outros comprimentos de onda. Isso é explicado pela característica do led de luz branca (Fig. 4.2), que apresenta potência luminosa quase nula para comprimentos de onda maiores que 800

nm e menores que 400 nm. A largura de banda é 200nm, aproximadamente, e a posição de ressonância ocorre no comprimento de onda de 670 nm, aproximadamente. O valor da refletividade normalizada, calculada através do fator de normalização (ver equação 2.5) é 0,42 aproximadamente.

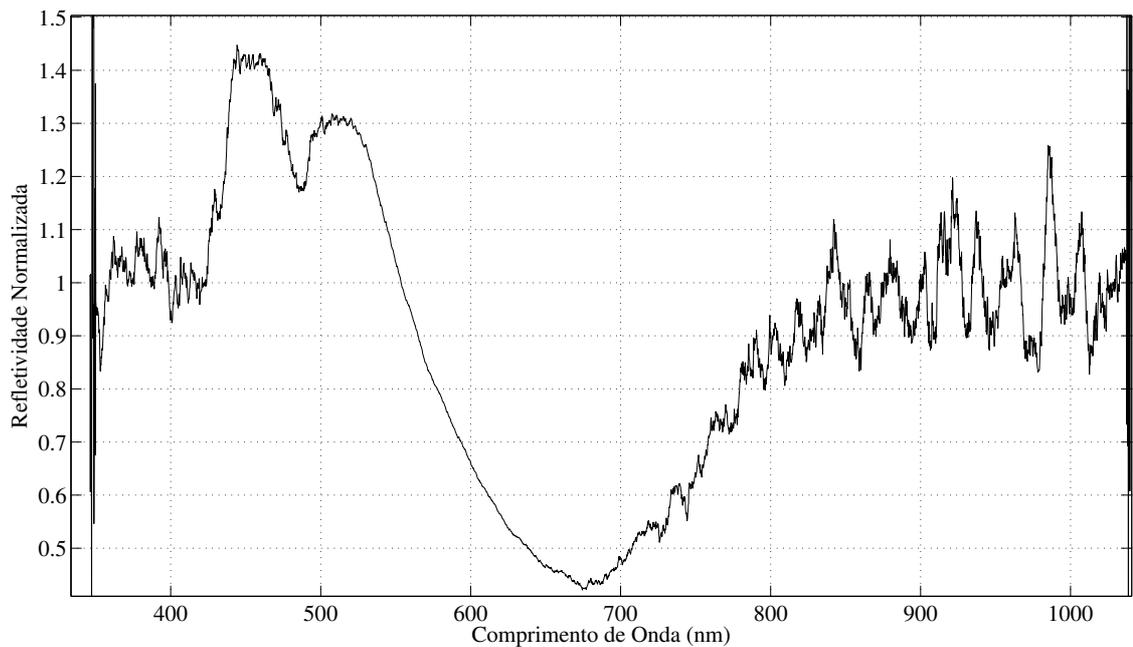


Figura 4.4: Espectro do sinal refletido de um prisma SPR, após a normalização.

Os valores apresentados com este primeiro prisma foram adequados, especialmente a posição de ressonância que corresponde ao comprimento de onda de ressonância projetado. No tocante à largura de banda, o valor medido foi relativamente alto.

No intuito de avaliar outros prismas ópticos fabricados, procurando obter prismas SPR com melhor qualidade, novos testes foram realizados, conforme é ilustrado na Fig. 4.5. Nesta figura, as refletâncias de saída de 4 prismas ópticos são apresentadas. Embora a posição de ressonância seja praticamente a mesma do prisma da Fig. 4.4, observa-se que os mínimos de refletividade e a largura de banda são diferentes. Além disso, a quantidade de ruído é maior que no primeiro prisma testado. Os prismas 1 e 3 foram os que apresentaram piores resultados quanto à largura de banda, embora o prisma 1 tenha apresentado uma menor refletividade. O prisma 2 apresentou resultado similar ao prisma da Fig. 4.4. Este teste serviu para mostrar que os biochips fabricados possuem características diferentes e, de

acordo com a rugosidade e a transparência, o desempenho também é afetado.

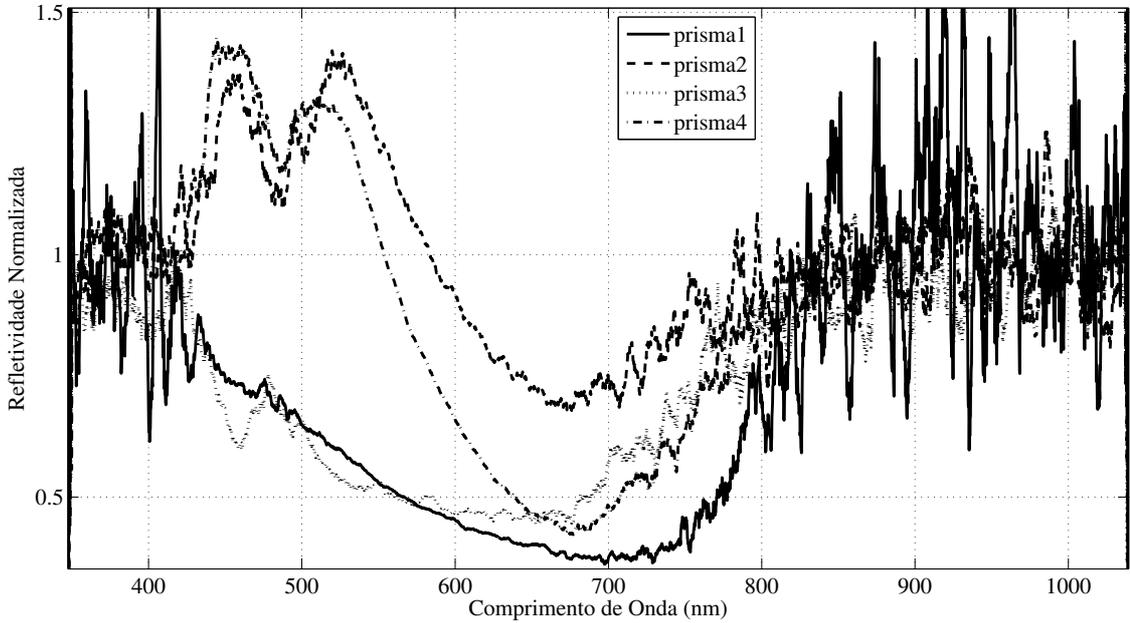


Figura 4.5: Refletividades normalizadas de 4 prismas SPR.

Após testar estes dispositivos e observar a ocorrência do fenômeno SPR e a variação dos parâmetros com a mudança do biochip utilizado, todos os prismas construídos foram testados. Um desses dispositivos, apresentou resultados muito bons, conforme é ilustrado na Fig. 4.6. Nesta figura, além da refletividade com a polarização tipo **p** dos feixes luminosos de entrada, foram feitas medições considerando feixes s-polarizados, em que ambos os sinais de referência e do analito foram adquiridos com a polarização **s**. A mudança da polarização **p** para a **s** rotacionando o filtro polarizador (Fig. 4.1) em 90° . Os resultados confirmaram que não ocorre ressonância para feixes com polarização tipo **s**, e sim apenas quando os feixes luminosos possuem polarização tipo **p** [25].

A resposta do prisma com polarização **p** teve a posição de ressonância com o valor de 670 nm, aproximadamente, à semelhança do resultado mostrado na Fig. 4.4. Todavia, a refletividade mínima (ver Eq. ()) foi menor (0,35, aproximadamente) e a largura de banda (ver página 21 para a formulação matemática da largura de banda) foi de 160 nm, aproximadamente. A quantidade de ruído presente no espectro do sinal na faixa de 500 a 750 nm foi bem reduzida também, o que demonstra que o prisma testado possui uma boa qualidade.

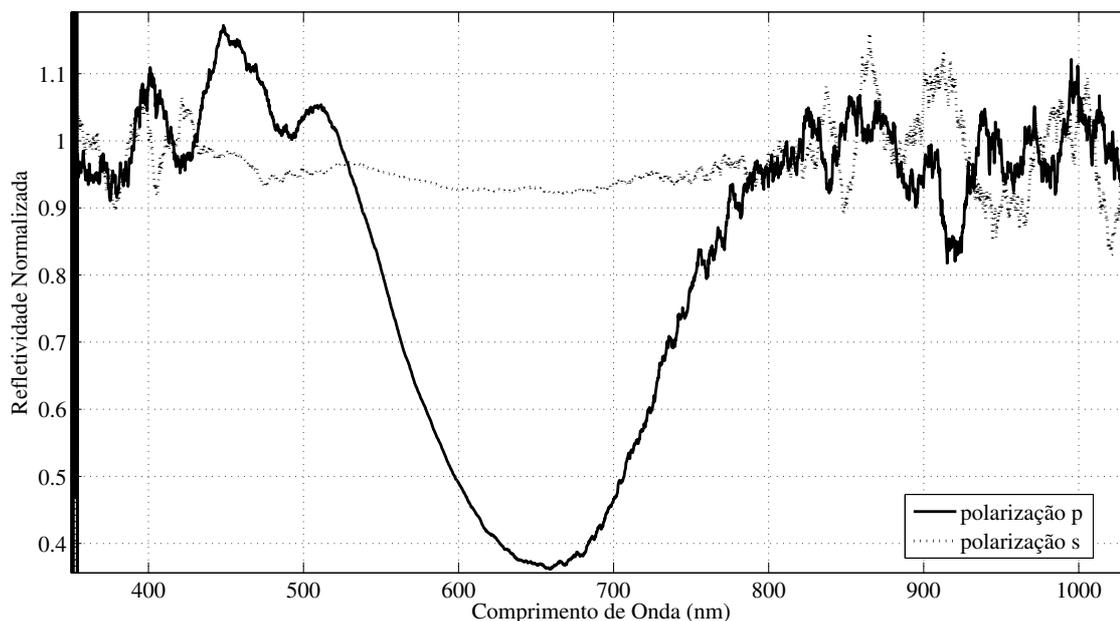


Figura 4.6: Espectro de um prisma SPR para as polarizações tipo **p** e tipo **s**.

Utilizando esse mesmo prisma, água destilada e soluções aquosas de etanol a 10% e 0,2 M (molar) de hidróxido de sódio (NaOH) foram testadas. Usando a mesma referência, gotas dessas substâncias foram depositadas na camada sensível e os resultados são apresentados na Fig. 4.7. Percebe-se claramente que há o deslocamento da posição de ressonância com a mudança do analito, conforme esperado. O índice de refração da água destilada é de 1,33 na temperatura ambiente (25°) e para o comprimento de onda de 670 nm. Os índices de refração de etanol e NaOH a 100% são iguais a 1,36 e 1,41, respectivamente, para as mesmas condições dos parâmetros da água destilada. Todavia, a adição de água nessas substâncias alterou o índice de refração e as soluções aquosas resultantes tem as posições de ressonância próximas à da água [25,61].

Modo AIM

Os resultados dos testes no modo AIM foram observados usando o programa SPLICCO[®], da empresa Thorlabs [128]. Através desse programa, o usuário pode visualizar a intensidade luminosa dos feixes luminosos refletidos capturados pela câmera. É permitido também ao usuário a filtragem espacial (baseada na média de quadros), a suavização de curvas, a

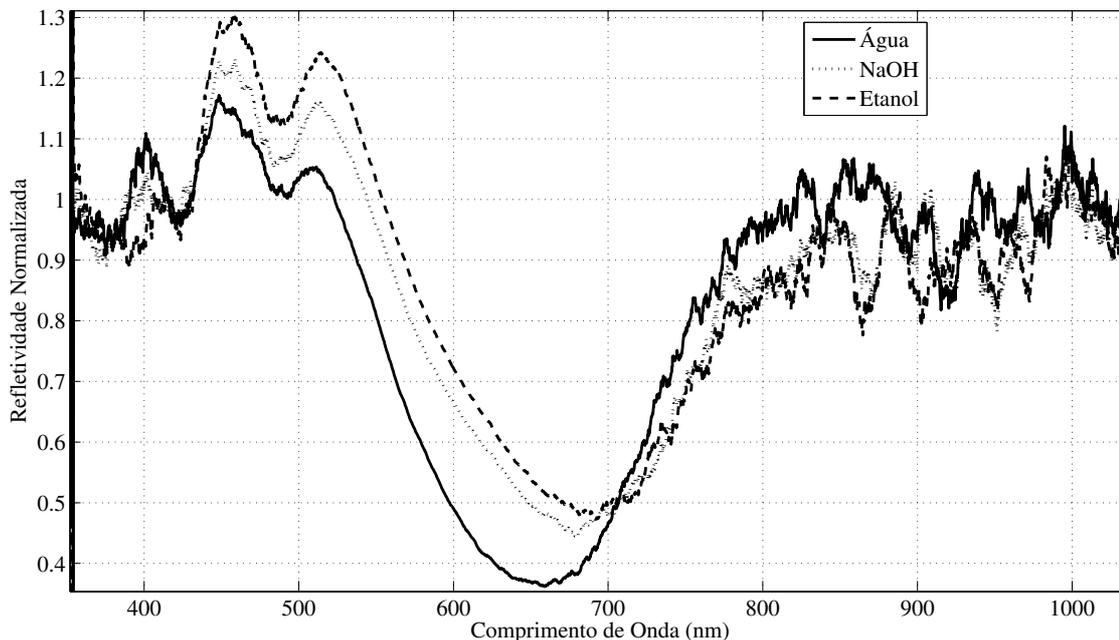


Figura 4.7: Refletividades normalizadas calculadas para as soluções de água destilada, etanol a 10% e 0,20M de NaOH.

redução da corrente escura e várias outras funções que, conforme a aplicação, podem ser bastante úteis [128]. Entretanto, a operação do programa não é tão simples e dificuldades foram encontradas para o desenvolvimento dos experimentos.

Com os devidos ajustes realizados na montagem e com o sinal refletido de maior intensidade obtido na câmera, uma gota de solução aquosa foi depositada sobre a camada sensora do mesmo prisma óptico SPR usado nos experimentos mostrados na Fig. 4.7. Os resultados são exibidos na Fig. 4.8. Com as curvas das refletividades dos sinais de referência e analito armazenadas, o protocolo, anteriormente apresentado, foi seguido e a refletividade normalizada foi calculada. Na Fig. 4.8 já se encontra a conversão pixel-ângulo discutida no capítulo anterior. O valor da refletividade mínima é 0,7483 obtido para o ângulo de incidência de 68 graus. O valor da largura de banda foi igual a 3 graus, aproximadamente.

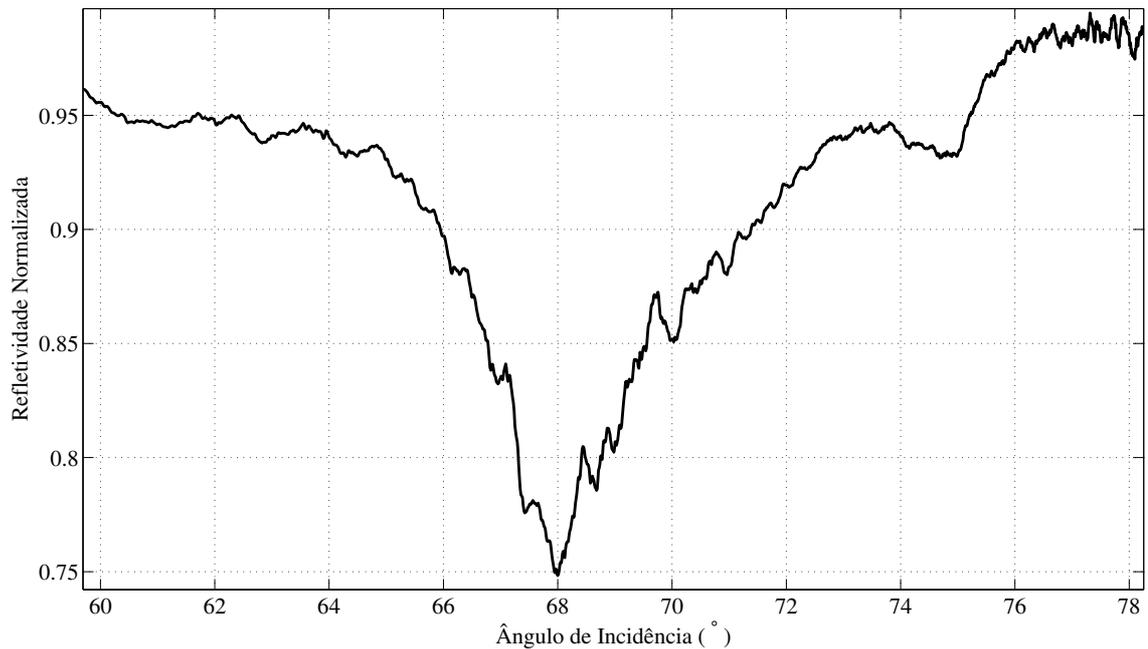


Figura 4.8: Refletividade normalizada para o prisma óptico no modo AIM.

4.2.2 Resultados utilizando os biochips SPR fabricados com o molde de aço

Nos testes realizados com os biochips fabricados com o molde de aço, uma interface gráfica foi construída com o programa LABVIEW. A interface gráfica e os resultados dos testes são apresentados nos próximos itens.

Interface gráfica

O espectrômetro USB2000 fabricado pela empresa Ocean Optics possui arquivos para configuração de interfaces gráficas em vários programas, como o LABVIEW, Java, C++, entre outros [125]. Neste trabalho, escolheu-se o LABVIEW, pela simplicidade na programação. Os elementos gráficos foram adequadamente arrumados para proporcionar leituras automáticas da intensidade do sinal refletido no prisma SPR, da refletividade normalizada e da resposta do sensor (no caso, utilizou-se o comprimento de onda de ressonância). Essa interface possui chamadas do MATLAB para a realização dos cálculos, armazenamento e apresentação dos resultados.

A interface gráfica é ilustrada na Fig. 4.9, em que há botões e controles de componentes do espectrômetro. São apresentados os botões para iniciar e parar a simulação, reduzir a corrente escura e plotar o gráfico. As caixas de controle permitem ao usuário entrar com o tempo de integração (em μs) e ações de suavização da curva e consequente redução da relação sinal-ruído, usando as funções "BOXCAR Width" e "Times to Average"[125]. Embora essa filtragem digital exista, o sinal apresenta ruídos para comprimentos de onda maiores que 800 nm e menores que 400 nm, conforme foi discutido anteriormente.

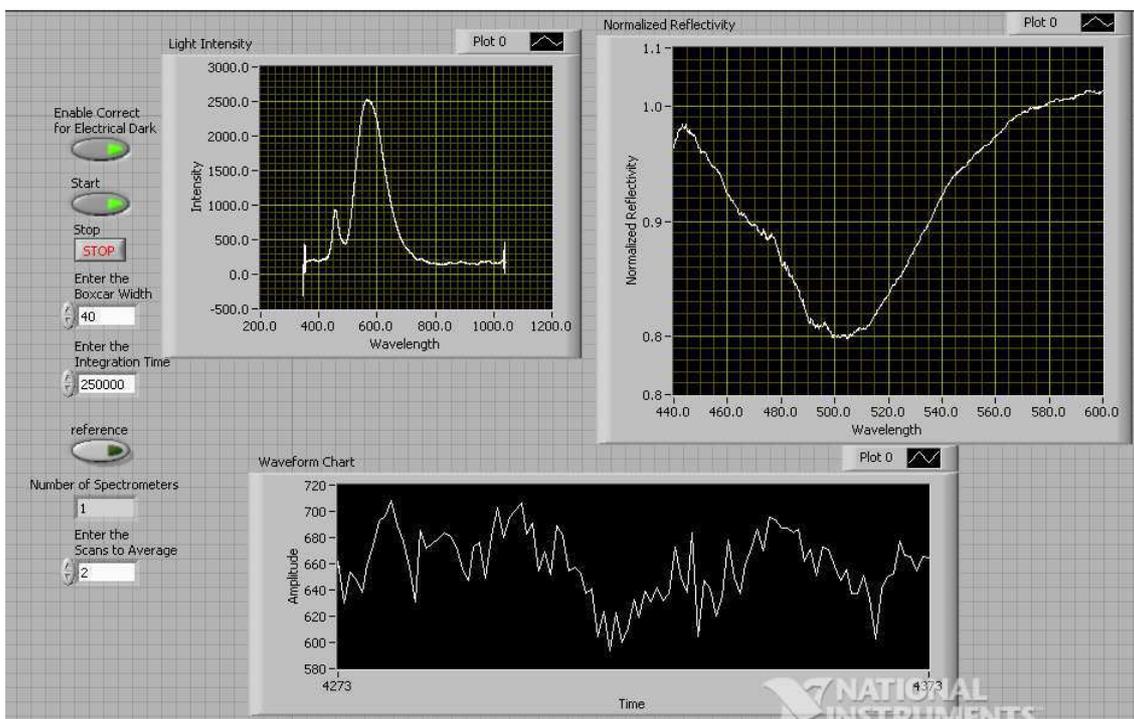


Figura 4.9: Interface gráfica do programa desenvolvido em LABVIEW.

Resultados no modo WIM

Usando os biochips SPR ópticos polidos e submetidos ao recozimento, conforme apresentado no capítulo anterior, os resultados são ilustrados na Fig 4.10. O prisma 1 foi aquecido durante 24 horas antes da deposição do filme fino de ouro. As características da curva SPR estão próximas ao especificado em projeto. O prisma 2 apresenta um comprimento de onda de ressonância menor que o especificado, em torno de 650 nm, embora apresente uma largura de banda maior que àquela apresentada no resultado do prisma 1. O prisma 2

não foi submetido ao processo de recozimento. A birrefringência pode ser o fator que tenha gerado a diferença na posição de ressonância apresentadas.

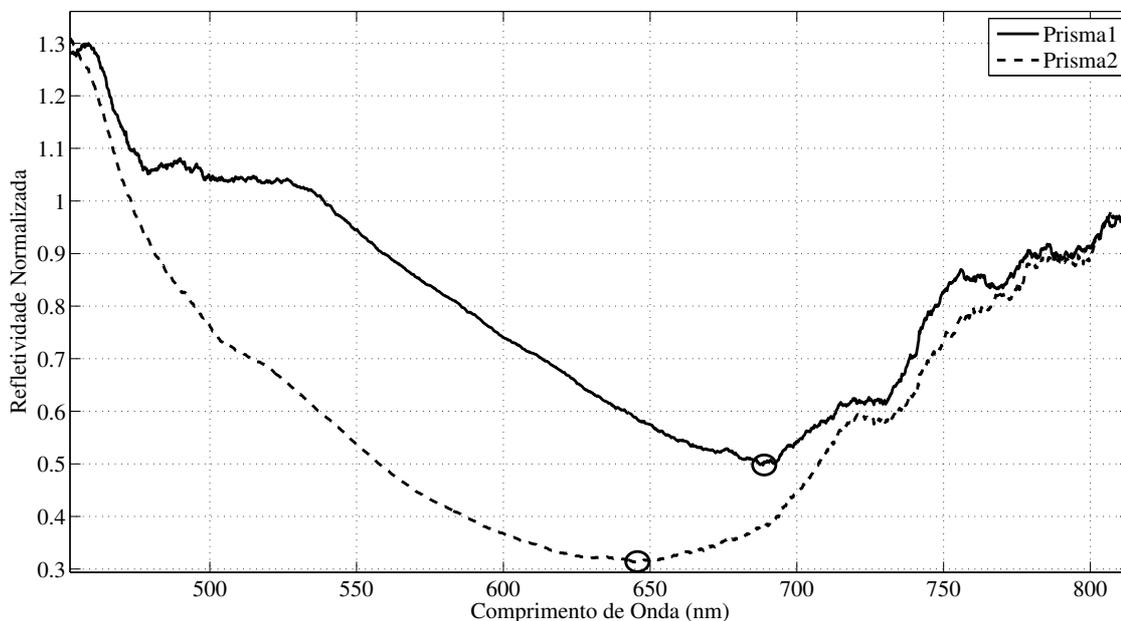


Figura 4.10: Resultados para dois prismas ópticos polidos, um que passou pelo processo de recozimento (prisma 1) e outro que não (prisma 2).

Sobre o prisma 1, soluções de água destilada, etanol a 10% e NaOH foram gotejadas sobre o filme fino de ouro e os feixes refletidos no biochip SPR foram detectados. Os resultados são apresentados na Fig. 4.11 e indicam o aumento do comprimento de onda de ressonância com o aumento do índice de refração, conforme esperado.

4.2.3 Discussões

Embora os resultados iniciais tenham sido promissores, quando eles são observados detalhada e comparativamente à curva teórica da Fig. 2.3, a presença de imperfeições é óbvia. No Capítulo 2 foram apresentadas várias possibilidades para essas imperfeições relacionadas à própria tecnologia SPR. Neste sentido, um controle mais adequado da temperatura e um maior cuidado com a limpeza e composição química dos compostos em análise devem ser levados em consideração. Todavia, além destes fatores há outras possíveis causas para as imperfeições apresentadas:

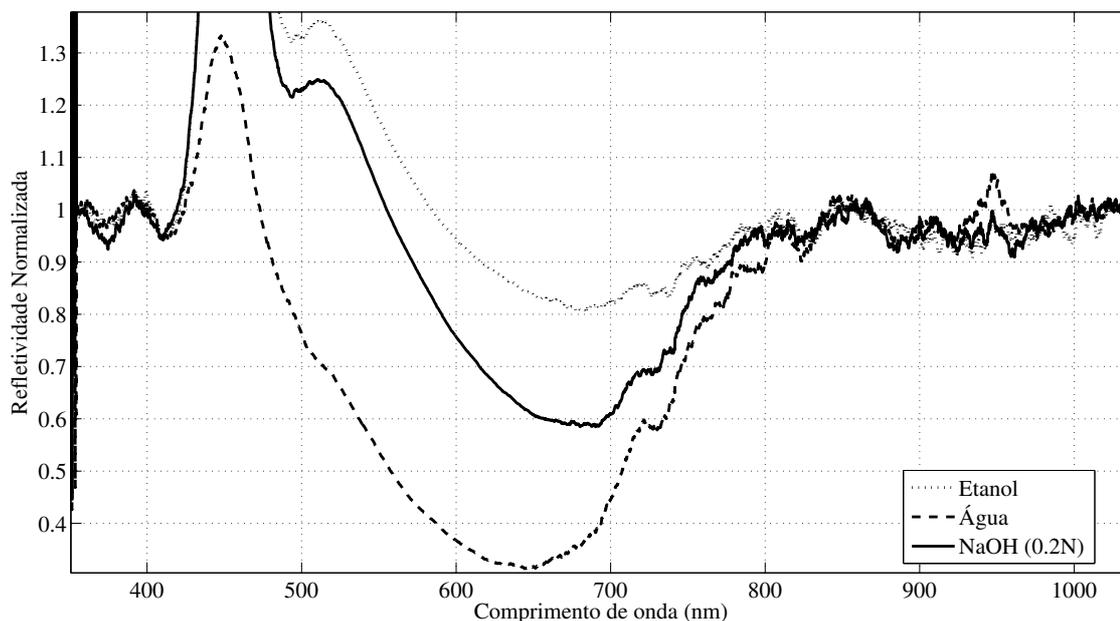


Figura 4.11: Resultados para soluções de água destilada, etanol e NaOH.

- Variação da intensidade luminosa dos diodos laser e de luz branca: isso ocorre devido a flutuações da corrente que excita as fontes ópticas. Variações da temperatura ambiente e da própria tensão de alimentação são as causas mais prováveis para as flutuações da corrente de excitação. Neste sentido, controladores (ou *drivers*) de corrente e de temperatura são necessários para ambos os modos de interrogação;
- Falhas na estrutura do prisma óptico: como tratado no capítulo anterior, os primeiros prismas apresentaram em sua estrutura bolhas e fissuras. Esses defeitos podem ter ocasionado dispersão da luz e uma quantidade reduzida de energia luminosa interagiu com os plásmos de superfície. Dessa forma, os parâmetros associados a curva podem ter sido afetados;
- Falhas na deposição do filme fino de ouro: é necessário que o filme fino de ouro seja homogêneo ao longo da superfície. Com o auxílio de um microscópio biológico, a superfície do filme fino apresentada apresentou-se um pouco rugosa (Fig. 3.13b e Fig. 3.14b). Comprimentos grandes da rugosidade não são adequados para experimentos com biosensores SPR, pois, devido a penetração do campo evanescente ser pequena

(ver Capítulo 2), os efeitos sobre a largura de banda, assimetria e o formato da curva SPR podem ser consideráveis [87]. Outra questão diz respeito à precisão na espessura do filme de ouro que pode afetar o valor do mínimo de ressonância [55];

- Luminosidade da sala: a luminosidade do ambiente pode gerar aquisições erradas pelos detectores ópticos.

O custo total estimado de fabricação e materiais dos biochips SPR fabricados é aproximadamente de $U\$1,00$. Aqui é considerado o custo do processo de injeção e o de deposição do filme fino de ouro. Esse valor é inferior ao estimado para o biosensor VIR que é em torno de $U\$2,45$. Comparativamente, o sensor SPREETA apresenta um valor comercial de $U\$100,00$ [74]. É claro que nesse sensor estão inclusos os elementos ópticos de acoplamento, o diodo laser e a matriz CCD. Já o elemento sensor da BIACORE, o custo é em torno de $U\$142,00$ [129].

Nos resultados dos testes apresentados não foram utilizados quaisquer métodos de otimização, como controle/regulação ou minimização das limitações operacionais presentes em um biosensor SPR (ver Capítulo 2). Também não foram utilizadas quaisquer ferramentas de suavização ou interpolação das curvas SPR cruas, obtidas pelo detector óptico, exceto com a minimização do ruído pela escolha adequada dos parâmetros da câmera CCD e do espectrômetro. O objetivo aqui foi apenas verificar a excitação dos plásmons de superfície para os valores de projeto de ambos os modos de interrogação e verificar o efeito da variação do índice de refração do analito ao desempenho do sistema. Neste sentido, as curvas SPR obtidas atestam que o prisma óptico de baixo custo, descartável e com fabricação nacional (o primeiro assim fabricado no Brasil, conforme verificação junto à literatura) pode ser adequado para aplicações de diagnóstico. Obviamente, caracterizações morfológicas e estruturais dos prismas ópticos fabricados deverão ser realizadas, além de sistemas ópticos e eletrônicos apropriados.

Capítulo 5

Conclusões e trabalhos futuros

Neste trabalho, apresentou-se o projeto e a construção de um biochip óptico para aplicações biológicas (PPBIO), baseado no princípio SPR. O PPBIO é o primeiro biochip SPR, usando prisma óptico, construído no Brasil. Ele usa um prisma polimérico como substrato ótico e um fino filme de ouro de 50 nm foi depositado sobre ele. O polímero TOPAS COC foi o material utilizado para os prismas poliméricos.

Os fundamentos teóricos dos biosensores SPR foram apresentados inicialmente, incluindo as definições, tipos, modos e condições de operação, exemplos de biosensores comerciais e limitações operacionais. No que tange às limitações operacionais, foram apresentados os efeitos da adsorção não-específica e variação da temperatura ambiente, além de mecanismos propostos na literatura para controle e/ou compensação. Um maior detalhamento foi efetuado para os efeitos da variação térmica, baseado no estudo teórico/experimental desenvolvido em duas disciplinas do doutorado e que levou a algumas publicações nacionais e internacionais [89–91]. Especialmente foi observada a dificuldade para caracterização experimental dos efeitos da variação da temperatura, tendo em vista que a temperatura afeta todos os elementos do biosensor. O PPBIO por não possuir elementos internos e pelo fato do material COC utilizado ter um coeficiente de dilatação térmico baixo ($6 \cdot 10^{-6} C^{-1}$ [103]), pode ser uma ótima alternativa para a investigação da influência da temperatura em um biosensor SPR.

O projeto do PPBIO foi apresentado e quando comparado a outros biochips, como o da BIACORE, SPREETA e VIR, apresenta simplicidade e custo. Além das vantagens da

tecnologia SPR, o PPBIO é descartável, possui uma geometria simples e sem componentes internos, como é o caso dos biosensores SPREETA e VIR. Além disso, não requer óleo ou gel como é o caso do sistema BIACORE, nem quaisquer elementos mecânicos rotativos para variação do ângulo de incidência [25, 26, 108, 130].

Simulações usando um programa de traçado de raios auxiliaram o projeto do prisma polimérico e da lente cilíndrica utilizada no modo AIM para convergência dos feixes p-polarizados colimados à região sensível do PPBIO. Esse estudo computacional permitiu também analisar o efeito das distâncias e dos deslocamentos dos componentes para a correta convergência dos feixes luminosos de entrada e, conseqüentemente, propiciar melhores condições de acoplamento fóton-plásmon. No caso WIM, o estudo teórico comprovou a importância de se ter um feixe com abertura limitada, tendo em vista que há uma maior dispersão da luz com o aumento da abertura. Por outro lado, essa característica pode ser útil para a construção de dispositivos com vários pontos sensíveis.

O método de fabricação dos prismas poliméricos utilizou uma máquina de moldagem por injeção. As condições adequadas de moldagem, fornecidas pelo fabricante, foram apresentadas juntamente com sugestões da literatura para minimizar problemas existentes na moldagem de componentes ópticos, como a contração e a birrefringência. Estes aspectos foram levados em consideração na fabricação dos prismas ópticos, no tocante à temperatura e pressão de injeção, tempo de injeção, entre outros.

Dois moldes foram construídos, o primeiro de cobre, contendo apenas uma cavidade (um prisma produzido por ciclo de injeção/extração) e um furo de injeção e o segundo de aço e aço e aço inoxidável, com três cavidades (três prismas produzidos por ciclo de injeção/extração) e furos para injeção e eliminação de excesso de material. A largura dos prismas ópticos com o molde de bronze foi de 10 mm, enquanto que o molde de aço produziu prismas de 20 mm de largura. O projeto e a construção do molde de bronze demoraram quatro meses (de abril a julho de 2009) para serem realizados. Já o molde de aço demorou sete meses para fabricação (de outubro de 2009 a abril de 2010). O molde de aço foi fabricada com os objetivos de melhorar a qualidade dos prismas ópticos fabricados e facilitar a inclusão futura de mecanismos de manipulação microfluídica (célula de fluxo e bomba peristáltica, por exemplo).

O detalhamento do projeto dos moldes e da técnica de fabricação foi apresentado. Uma

empresa de Campina Grande foi contratada para o projeto dos moldes e fabricação dos prismas ópticos. A proximidade do local de construção foi interessante para a redução de custos, tendo em vista que a fabricação em outro local do país ou no exterior teria um ônus bem maior.

A qualidade dos prismas fabricados com os moldes de bronze e aço foram boas, embora no caso do molde de bronze, os prismas apresentaram fissuras e bolhas no interior. Os prismas fabricados com o molde de aço, além de não apresentar bolhas e fissuras, apresentaram uma maior transparência. Um dos prismas fabricados com o molde de aço foi submetida a um processo de recozimento (*annealing*) para reduzir ou eliminar o efeito de birrefringência que geralmente acompanha um processo de moldagem por injeção de componentes ópticos [104].

Os prismas poliméricos passaram por um processo de limpeza/polimento, com materiais de baixa abrasividade, para retirada de excesso de material, impressões digitais, entre outras sujeiras. Após isso, um equipamento de pulverização catódica foi utilizado para depositar um filme fino de ouro de 50 nm sobre a região sensível do prisma polimérico. Imagens microscópicas mostraram que a qualidade da superfície dos prismas era boa e com alta transparência e baixa rugosidade. É claro que um estudo mais aprofundado de análise dos materiais, usando, por exemplo, microscopia eletrônica de transmissão e força atômica. Devido, principalmente, ao atraso na entrega dos moldes essa verificação não foi possível ser realizada.

Os biochips construídos foram submetidos a testes preliminares, que objetivaram verificar a ocorrência do fenômeno SPR na saída dos biochips, usando os modos AIM e WIM, e também verificar o efeito da troca de analitos na resposta SPR.

Os resultados obtidos nos testes preliminares foram muito satisfatórios e promissores. Além da água destilada, soluções aquosas de etanol e hidróxido de sódio foram utilizadas nos testes experimentais. Os valores de projeto foram obtidos para o modo AIM e WIM. No caso do prisma que passou pelo processo de recozimento, verificou-se que ele apresentou uma melhor resposta SPR que um prisma não recozido. Isso corrobora com a teoria e indica a necessidade de um tratamento adequado para biochips SPR cujo substrato é baseado em um polímero.

A utilização para os dois modos de operação, AIM e WIM, é possível e ajustes operacionais devem ser realizados especificamente para o modo AIM. No modo WIM, houve a

facilidade de operação e a robustez da plataforma de testes. Todavia, essas plataformas de testes foram pensadas apenas para uso nos testes preliminares. Ainda não há no sistema quaisquer otimizações, como o uso de mecanismos de manipulação microfluídica. Isso precisa ser incorporado, com vistas a investigar o efeito da velocidade do fluido circulante, espessura do canal microfluídico, adsorção não-específica, entre outros fatores.

Finalmente, o biochip proposto é de baixo custo, descartável, ausente de marcadores colorimétricos ou radioativos, não requer óleo ou gel para fixação do filme fino de ouro ao substrato e nem utiliza quaisquer partes mecânicas rotativas. Neste sentido, atende ao estabelecido em projeto e pode ser utilizado como uma ferramenta analítica de diagnóstico de doenças, como a Dengue e outros patógenos e contaminantes.

5.1 Trabalhos Futuros

Diante do trabalho apresentado e das conclusões delineadas acima, os seguintes trabalhos futuros são vislumbrados e propostos:

- Realizar novos testes experimentais com o modo AIM, com vistas a aperfeiçoar sua operação e, dessa forma, definir uma estrutura adequada de implementação aliada ao modo WIM;
- Investigar os prismas ópticos poliméricos fabricados em termos dos efeitos da rugosidade, transparência, birrefringência, entre outros parâmetros, utilizando microscopia eletrônica de transmissão ou de força atômica, por exemplo. Além de uma investigação experimental, estudar modelos teóricos para analisar o efeito da rugosidade e birrefringência em prismas poliméricos SPR, como aqui proposto. Também realizar a medição da birrefringência usando a estrutura de caixa de luz;
- Construir estruturas experimentais mais robustas para os modos AIM e WIM, incorporando um sistema microfluídico, composto por uma bomba peristáltica e uma célula de fluxo. Isso facilitará o processo de limpeza e funcionalização da superfície sensível e é essencial para aplicações reais. Um estudo teórico/experimental dos efeitos fluidodinâmicos na resposta do biosensor SPR também deve ser realizado. O estudo teórico poderá ser realizado em um programa baseado em elementos finitos;

- A partir dos resultados da investigação teórica e experimental com o modo AIM, projetar e realizar o biosensor usando o PPBIO para os modos de operação AIM e WIM, incluindo um autosampler, uma célula de fluxo e um processador digital (FPGA) como elemento central de processamento e controle;
- Realizar testes experimentais com o biosensor construído com substâncias biológicas, como as utilizadas no diagnóstico de doenças, patógenos em comidas e contaminantes em água;
- Realizar a estrutura para investigação dos efeitos da temperatura usando o PPBIO.

Capítulo 6

Publicações realizadas durante o período do doutorado

1. MOREIRA, C. S., LIMA, A. M. N., THIRSTRUP, C. and NEFF, H.. A disposable, low cost prism-based surface plasmon resonance (SPR) biosensor. BIOSENSORS 2010 Conference, Glasgow, UK.
2. SOUZA FILHO, C. A., LIMA, A. M. N., MOREIRA, C. S., THIRSTRUP, C. and NEFF, H., "Line shape analysis and extended instrumental operation of surface plasmon resonance sensors,"*Plasmonics*, April 2010. [Online].
3. BARRETO NETO, A. G. S., MOREIRA, C. S., LOUREIRO, F. C. C. L., LIMA, A. M. N., and NEFF, H., "Studying molecular diffusivity by using SPR spectrometry: experiment and simulations"First Biosensing Conference, 2009, Bristol, England.
4. MOREIRA, C. S., BARRETO NETO, A. G. S., LIMA, A. M. N., and NEFF, H. Features and application of a microcontroller-driven autosampler applied to a surface plasmon resonance biosensor platform. In: VIII SEMETRO, 2009, João Pessoa - PB. Proceedings of the 8th International Seminar on Electrical Metrology, 2009.
5. LOUREIRO, F. ; BARRETO NETO, A. G. S. ; LIMA, A. M. N. ; MOREIRA, C. S. ; TEJO, F. Molecular Transport and Mutual Diffusion Measurement Method in a Micro-Fluidic System, Based on Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. In:

- EUROSENSORS 2009, 2009, Lausanne. Proceedings of the Eurosensors XXIII conference. Amsterdam : Procedia Chemistry - ELSEVIER, 2009. v. 1. p. 1099-1102.
6. MOREIRA, C. S. ; BARRETO NETO, A. G. S. ; LIMA, A. M. N. ; THIRSTRUP, C. ; NEFF, H. Exchangeable low cost polymer biosensor chip for surface plasmon resonance spectroscopy. In: EUROSENSORS 2009, 2009, Lausanne. Proceedings of the Eurosensors XXIII conference. Amsterdam : Procedia Chemistry - ELSEVIER, 2009. v. 1. p. 1479-1482.
 7. MOREIRA, C. S. ; LIMA, A. M. N. ; NEFF, H.; THIRSTRUP, C. . Temperature dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold-water interface. Sensors and Actuators. B, Chemical, v. 134, p. 854-862, 2008.
 8. MOREIRA, C. S. ; LIMA, A. M. N. ; NEFF, H. Influence of temperature effects on sensitivity of surface plasmon resonance sensors. In: I2MTC 2008 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference, 2008, Victoria, Vancouver Island. International Instrumentation and Measurement Technology Conference PROCEEDINGS. Piscataway, NJ : IEEE Service Center, 2008. p. 170-175.
 9. MOREIRA, C. S. ; LIMA, A. M. N. ; NEFF, H. Sistema Reconfigurável para Monitoramento de Temperatura Baseado na Ressonância de Plásmos de Superfície. In: Congresso Brasileiro de Automática, 2008, Juiz de fora. Congresso Brasileiro de Automática, 2008.l
 10. LOUREIRO, F. C. C L., BARRETO NETO, A. G. S., MOREIRA, C. S., LIMA, A. M. N. and NEFF, H. A method for determining the mutual diffusion coefficient of molecular solutes based on surface plasmon resonance sensing. Sensors and Actuators: B. Chemical, no prelo.

Apêndice A

Princípios da física e matemática do fenômeno SPR

As propriedades óticas dos metais são explicadas pelo modelo do gás de elétrons livres, proposto por Paul Drude em 1900. Nesse modelo, um gás de elétrons livres move-se através de uma rede de íons positivos fixos [28, 131]. A função dielétrica desse gás de elétrons é dada pela seguinte relação [28]:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (\text{A.1})$$

onde

$$\omega_p^2 = \frac{ne^2}{\varepsilon_0} \quad (\text{A.2})$$

é a frequência de plasma do gás de elétrons livres.

A função dielétrica do gás de elétrons livres é dependente da frequência natural de oscilação ω_p . A dispersão ou a oscilação do gás de elétrons ocorre apenas para frequências de entrada maiores ou iguais a ω_p [28]. O quanta dessas oscilações de carga é chamado de plásmon ou plásmon de volume. Quando as oscilações ocorrem ao longo da superfície do metal, elas são chamadas de polarizações de plásmons de superfície (SPPs - *Surface Plasmon Polaritons*) ou simplesmente plásmons de superfície (SPs - *Surface Plasmons*). As quase-partículas SPs são sensíveis à radiação de entrada e, geralmente, a injeção de elétrons ou fótons são os preferidos para a excitação dos plásmons de superfície [27]. No caso da injeção de feixes luminosos, que é a preferida por sua simplicidade, há aplicações

na literatura normalmente variando da faixa infravermelha à visível [28]. Esse é o método que será utilizado neste trabalho.

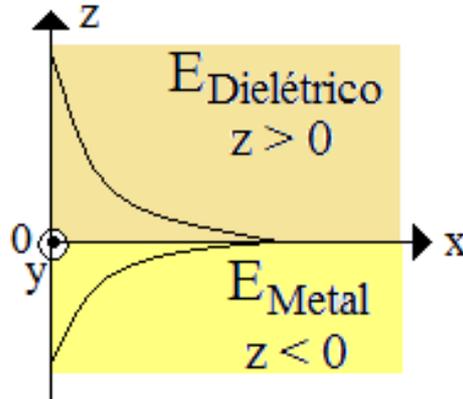


Figura A.1: Interface metal-dielétrica mostrando o perfil do campo elétrico evanescente.

Quando o feixe luminoso incidente de onda p-polarizada, com vetor de onda k_x paralelo ao plano da interface metal-dielétrica (Fig. 2.2), incide na interface metal-dielétrica, nas condições de ocorrência do fenômeno SPR descritas acima, há a transmissão parcial ou total dos fótons incidentes pelo metal. Sob tais condições, os fótons transmitidos interagem com os plásmons de superfície, cujo vetor de onda é k_{SP} . O campo elétrico evanescente E_{ev} , que surge pela transmissão dos fótons, tem uma profundidade de penetração pequena (na ordem de centenas de nanômetros) e o seu valor máximo é encontrado na superfície, conforme mostrado na Fig. A.1 [27]. Dessa forma, quaisquer modificações nas propriedades eletro-ópticas das substâncias próximas à superfície da interface são facilmente detectadas. Essa característica é um dos grandes atrativos da tecnologia SPR e uma das principais causas de sua utilização na análise bioquímica de substâncias nas mais variadas aplicações [25, 26].

Na Fig. A.1, considerando $z > 0$, há um dielétrico com função dielétrica real positiva ε_1 ; e para $z < 0$ há um metal, cuja função dielétrica é $\varepsilon_2(\omega)$.

Para a existência dos plásmons de superfície, é necessário que a parte real de ε_2 seja menor que zero, ou seja, $Re[\varepsilon_2] < 0$. Essa característica é observada para os metais nobres (ouro, prata e cobre). Embora a prata apresente melhores valores de sensibilidade e relação sinal-ruído, o ouro é o preferido por sua inércia química. Todavia, devido à permissividade do ouro, a operação dos biosensores que o utilizam é limitada à região visível e próxima ao

infravermelho [28].

Considerando o feixe luminoso de entrada p-polarizado, as relações seguintes são soluções de onda confinadas à interface da Fig. A.1:

$-z > 0$:

$$H_y(z) = A_1 e^{i\beta x} e^{-k_1 z} \quad (\text{A.3})$$

$$E_y(z) = iA_1 \frac{1}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_1} k_2 e^{i\beta x} e^{-k_1 z} \quad (\text{A.4})$$

$$E_z(z) = -A_1 \frac{\beta}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_1} e^{i\beta x} e^{-k_1 z} \quad (\text{A.5})$$

$-z < 0$:

$$H_y(z) = A_2 e^{i\beta x} e^{k_2 z} \quad (\text{A.6})$$

$$E_y(z) = -iA_2 \frac{1}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_2} k_2 e^{i\beta x} e^{k_2 z} \quad (\text{A.7})$$

$$E_z(z) = -A_2 \frac{\beta}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_2} e^{i\beta x} e^{k_2 z} \quad (\text{A.8})$$

onde k_i ($i = 1, 2$) é o componente do vetor de onda perpendicular à interface nos dois meios, A_1 e A_2 são constantes e β é igual ao vetor de onda no metal k_{SP} na direção de propagação. O parâmetro β é também conhecido como constante de propagação [25]. O inverso do componente do vetor de onda, em ambos os meios, define a profundidade de penetração do campo elétrico evanescente. A continuidade dos campos magnético e elétrico requer que $A_1 = A_2$ e

$$\frac{k_2}{K_1} = -\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1} \quad (\text{A.9})$$

Usando o valor de H_y na equação de onda para ondas polarizadas tipo p [28], a seguinte relação pode ser derivada:

$$k_1^2 = \beta^2 - k_0^2 \varepsilon_1 k_2^2 = \beta^2 - k_0^2 \varepsilon_2 \quad (\text{A.10})$$

onde $k_0 = \omega/c$. Relacionando as equações (A.9) e (A.10), o valor da relação de dispersão entre os dois meios é obtida, ou seja [25, 27, 28, 48]:

$$\beta = k_{SP} = k_0 \left(\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.11})$$

Considerando o meio 1 como o ar e usando o modelo de Drude, a função dielétrica da camada metálica é dada por [48]:

$$\varepsilon_2(\omega) = 1 - \left(\frac{\omega_p}{\omega} \right)^2 \quad (\text{A.12})$$

Substituindo (A.12) em (A.11) e isolando o termo ω obtém-se:

$$\omega^2 = (c\beta)^2 \left(1 + \frac{1}{1 - \left(\frac{\omega_p}{\omega}\right)^2} \right) \quad (\text{A.13})$$

Após alguns arranjos matemáticos torna-se:

$$\omega^2 = \frac{\omega_p^2}{2} + (c\beta)^2 - \left(\frac{\omega_p^4}{4} + (c\beta)^4 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.14})$$

Considerando valores pequenos para β , obtém-se:

$$\omega^2 \approx (c\beta)^2 \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{c\beta}{\omega_p} \right)^2 \right] \quad (\text{A.15})$$

Quando o valor de β é elevado, a Eq. (A.14) torna-se:

$$\omega^2 \approx \omega_p^2 \left[1 - \frac{1}{4} \left(\frac{\omega_p}{c\beta} \right)^2 \right] \quad (\text{A.16})$$

Apêndice B

Definições de alguns termos da Óptica

. Neste Apêndice serão apresentados, de forma resumida, alguns termos que foram utilizados no manuscrito.

B.1 Óptica geométrica, traçado de raios e outros conceitos

Na óptica geométrica, o funcionamento de quaisquer elementos ópticos (lentes, prismas, por exemplo) é descrito unicamente pela denominada óptica de raios e utiliza, basicamente, as leis de Snell de reflexão e refração [12,49]. Um raio óptico é uma simplificação matemática, constituindo-se simbolicamente como uma linha sem espessura. Quando é necessária a investigação de detalhes de uma imagem, a análise de Fourier é utilizada para contabilizar os efeitos de difração [12].

O desenho dos raios, ou o traçado dos raios (*Ray Tracing*), é um procedimento de cálculo da trajetória dos raios ópticos propagando-se pelo sistema. Esse método consome bastante tempo, haja visto que o cálculo é realizado passo-a-passo (ou seja, raio a raio) de uma superfície óptica para outro. Tais cálculos são hoje realizados por programas dedicados a projeto óptico.

No método de traçado de raios, abertura é um parâmetro definido como a quantidade de luz que passa através de uma superfície presente num sistema ótico [12,49]. Esse parâmetro é diretamente relacionado com a qualidade da imagem. Quanto maior o tamanho da abertura,

mais deteriorada será a imagem. O algoritmo básico para traçar raios usa raios transladados de uma superfície para outra, seguindo a refração desses raios pela superfície desde o objeto até a imagem [12]. O mecanismo de translação baseia-se na intersecção de uma linha e uma superfície, enquanto que a refração usa a lei de Snell no ponto de incidência. Se o meio é isotrópico e homogêneo, os feixes de entrada são propagados pelo sistema como linhas retas. O passo de translação é normalmente o mais difícil no cálculo da propagação de um raio através de uma superfície, especialmente se a equação descritiva da superfície não pode ser resolvida analiticamente. Em alguns sistemas óticos tais como tubos de luz (*light pipes*), matrizes de lentes e alguns prismas óticos, não é possível agrupar as superfícies conforme a ordem que os raios de luz batem nelas. Este é o chamado traçado de raios não-sequencial ou *non-sequential ray tracing*, que possui tempo de processamento maior que o traçado de raios convencional.

A descrição das superfícies em um grupo não-sequencial é feita similarmente a um sistema sequencial. Contudo, algumas configurações são totalmente diferentes e incluem ações especiais a serem executadas. Um exemplo disso é quando se projeta um prisma ou um tubo de luz no qual os raios de entrada entram e são refletidos em determinadas paredes do componente ótico. Este foi o caso para o prisma polimérico proposto nesta tese.

B.2 Polarização

A luz natural ou não polarizada é formada de ondas eletromagnéticas que vibram em várias direções. Determinadas substâncias apresentam a propriedade de deixarem passar apenas uma parte da onda luminosa quando são atravessadas por feixes luminosos. A propriedade dessas substâncias é denominada polarização.

Os polarizadores são materiais que funcionam como um filtro, permitindo que a luz passe somente em um plano, conforme é ilustrado na Fig. B.1. A polarização ocorre apenas é formada por ondas transversais [12].

A onda luminosa da Fig B.1 é formada de dois componentes: um paralelo ao plano do campo elétrico, que é denominado tipo **p** e a luz é dita p-polarizada e é formada por ondas TM (*Transverse Magnetic*); e outro perpendicular ao plano do campo elétrico, que é denominado tipo **s** e a luz é dita s-polarizada e é formada por ondas TE (*Transverse*

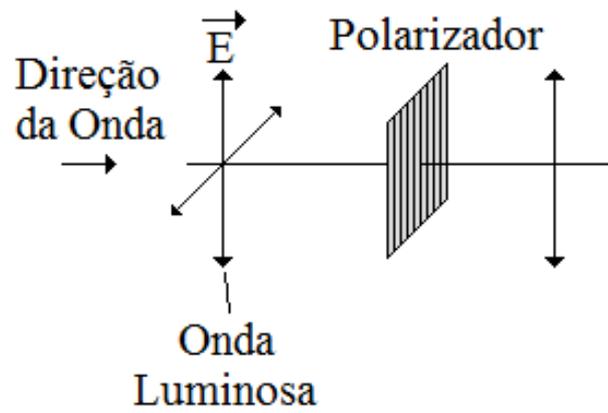


Figura B.1: Plano de incidência de uma onda luminosa com componentes paralelo e perpendicular ao plano do campo elétrico. Um polarizador é utilizado para remover a componente perpendicular.

Electric) [12]. No caso da Fig. B.1, o componente p foi filtrado pelo polarizador.

Referências Bibliográficas

- 1 Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz. *Relatório de Atividades*. 2003. Relatório técnico.
- 2 Salimetrics. *An Introduction to Immunoassay*. 2008. Website. http://www.salimetrics.com/all_things_saliva/immunoassay.php.
- 3 SCHIEL, D.; FREITAS, D. *Proteínas*. 2010. Website. http://www.cdcc.usp.br/exper/medio/quimica/7bioquimg_1.pdf.
- 4 MAYER, G. *Immunoglobulins - Structure and Function*. South Carolina: E-book, 2009.
- 5 MORGAN, C. L.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P. Immunosensors: Technology and opportunities in laboratory medicine. *Clinical Chemistry*, v. 42, n. 2, p. 193–209, 1996.
- 6 CUNNINGHAM, B. T. *Label-free biosensors: and introduction*. Edited by M. Cooper: Cambridge University Press, 2008.
- 7 VOLTA, U.; LENZI, M.; LAZZARI, R.; AL. et. Antibodies to gliadin detected by immunofluorescence and a micro-elisa method: markers for active childhood and adult coeliac disease. *Gut*, v. 26, p. 667–671, 1985.
- 8 LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (eia)/enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). *Clinical Chemistry*, v. 51, p. 2415–2418, 2005.
- 9 PIERCE. *ELISA and ELISPOT products: handbook and technical guide*. 2009. Relatório Técnico. <http://www.piercenet.com>.
- 10 ABCAM. *Sandwich ELISA*. 2010. Relatório Técnico. http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Sandwich_ELISA.pdf.

- 11 MORROW, K. J. *Going a Label-Free Route with Biosensors: New technologies for calorimetry and SPR aim to transcend the drawbacks to labels*. 2007. Website. <http://www.genengnews.com/gen-articles/label-free-biosensors-show-early-promise/2027/>.
- 12 SMITH, C. *Label-free technology: A myriad of approaches*. 2010. Website. <http://www.biocompare.com/Articles/FeaturedArticle/1034/Label-free-Technology-A-Myriad-Of-Approaches.html>.
- 13 MALHOTRA, B. D.; TURNER, A. P. F. *Advances in Biosensors*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, 2003.
- 14 NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Current research activity in biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 377, p. 446–468, 2003.
- 15 TURNER, A. P. F. *Biosensors: Past, present and future*. Cranfield University, 1996.
- 16 BORRE, M. *The Theoretical Background for a Practical Course*. Campina Grande: UFCG, 2005.
- 17 CARDOSI, M. *Enzyme Electrode*. 1998. Website. http://www-biol.paisley.ac.uk/marco/enzyme_electrode/chapter3/chapter3_page1.htm.
- 18 WANG, J. Electrochemical sensors for environmental monitoring: a review of recent technology. *U.S. Environmental Protection Agency*, p. 1–17, 1994.
- 19 THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, p. 121–131, 2001.
- 20 FAN, B.; ZEYL, T. *Optical Biosensors and Applications*. 2005. Website. http://www.ece.mcmaster.ca/~ibruce/courses/EE3BA3_presentation13.pdf.
- 21 MARAZUELA, M. D.; MORENO-BONDI, M. C. Fiber-optic biosensors: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 372, p. 664–682, 2002.

- 22 HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance: review. *Sensors and Actuators B*, v. 54, p. 3–15, 1999.
- 23 WHITE, R. M. Acoustic sensors for physical, chemical and biochemical applications. *Proceedings of 1998 IEEE INTERNATIONAL FREQUENCY CONTROL SYMPOSIUM*, p. 587–594, 1998.
- 24 CHAPLIN, M. *Calorimetric Biosensors*. 2004. Website. <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/calorimetric.html>.
- 25 HOMOLA, J. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Amsterdam, Netherlands: Springer, 2006.
- 26 SCHASFOORT, R. B. M.; TUDOS, A. J. *Handbook of surface plasmon resonance*. 1. ed. Cambridge: RCS Publishing, 2008.
- 27 RAETHER, H. *Surface Plasmons: on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Berlin, Germany: Springer Tracts in Modern Physics 111, 1988.
- 28 MAIER, S. A. *Plasmonics: fundamentals and applications*. 1. ed. New York: Springer, 2007.
- 29 RICH, R. L.; MYSZKA, D. G. Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition*, v. 18, p. 431–478, 2005.
- 30 VAISOCHEROVÁ, H.; FACA, V. M.; TAYLOR, A. D.; HANASH, S.; JIANG, S. Comparative study of spr and elisa methods based on analysis of cd166/alcam levels in cancer and control human sera. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, p. 2143–2148, 2009.
- 31 GUIDI, A.; LARICCHIA-ROBBIO, L.; GIANFALDONI, D.; REVOLTELLA, R.; BONO, G. D. Comparison of a conventional immunoassay (elisa) with a surface plasmon resonance-based biosensor for igf-1 detection in cow's milk. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, p. 971–977, 2001.
- 32 REVOLTELLA, R. P.; ROBBIO, L. L.; LIEDBERG, B. Comparison of conventional immunoassays (ria, elisa) with surface plasmon resonance for pesticide detection and monitoring. *Biotherapy*, v. 11, p. 135–145, 1998.

- 33 HOMOLA, J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 377, p. 528–539, 2003.
- 34 CRAIGHEAD, H. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature*, v. 442, p. 387–393, 2006.
- 35 PSALTIS, D.; QUAKE, S. R.; YANG, C. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature*, v. 442, p. 381–386, 2006.
- 36 CAMPBELL, K.; HUET, A.-C.; CHARLIER, C.; HIGGINS, C.; DELAHAUT, P.; ELLIOT, C. T. Comparison of elisa and spr biosensor technology for the detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 4079–4089, 2009.
- 37 HEGNEROVÁ, K.; BOCKOVÁ, M.; VAISOCHEROVÁ, H.; KRISTOFIKOVÁ, Z.; RÍCNÝ, J.; RÍPOVÁ, D.; HOMOLA, J. Surface plasmon resonance biosensors for detection of alzheimer disease biomarker. *Sensors and Actuators B*, v. 139, p. 69–73, 2009.
- 38 HUANG, J.-G.; HUNG, C.-C. K.; LAI, H.-C.; LEE, C.-K.; LIN, S.-M.; FENG, P.; LIN, C.-W. *Surface Plasmon Resonance Biochips for Tuberculosis Bacillus Detection*. 2004. Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS.
- 39 KUMBHAT, S.; SHARMA, K.; GEHLOT, R.; SOLANKI, A.; JOSHI, V. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 52, p. 255–259, 2010.
- 40 BERGWERFF, A. A.; KNAPEN, F. V. Sensing pathogens: screening strategies in food and environmental safety. *Biacore Journal*, v. 2, p. 10–15, 2003.
- 41 HUA, C.; GANA, N.; CHEN, Y.; BI, L.; ZHANG, X.; SONGA, L. Detection of microcystins in environmental samples using surface plasmon resonance biosensor. *Talanta*, v. 80, p. 407–410, 2009.
- 42 FLEMING, K. K. *Portable Detection of Algal Toxins Using a Surface Plasmon Resonance (SPR) Fiber Optic Probe Coated With a Molecular Imprinted Polymer*. 2004.

Relatório Técnico. http://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/6964/report/F.

- 43 FORZANI, E. S.; FOLEY, K.; WESTERHOFF, P.; TAO, N. Detection of arsenic in groundwater using a surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B*, v. 123, p. 82–88, 2007.
- 44 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, p. 269–275, 1902.
- 45 SHARMA, A. K.; JHA, R.; GUPTA, B. D. Fiber-optic sensors based on surface plasmon resonance: A comprehensive review. *IEEE Sensors Journal*, v. 7, p. 1118–1129, 2007.
- 46 RITCHIE, R. H. Plasma losses by fast electrons in thin films. *Physics Review.*, v. 106, p. 874–881, 1957.
- 47 KITTEL, C. *Introduction to Solid State Physics*. 7. ed. New York: John Wiley and Sons, 1996. ISBN 0-471-11181-3.
- 48 STOLTENBERG, J.; PENGRA, D. *Surface Plasmon Resonance in a Thin Metal Film*. 2004. Website. <http://courses.washington.edu/phys431/spr.pdf>.
- 49 MENN, N. *Practical Optics*. 1. ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 0-12-490951-5.
- 50 YAMAMOTO, M. Surface plasmon resonance (spr) theory: Tutorial. *Review of Polarograph*, v. 48, n. 3, p. 209–237, 2002.
- 51 MOREIRA, C. S. *Análise dos Efeitos da Variação da Temperatura em um Biossensor SPR*. agosto 2007. Relatório de Projeto e Pesquisa 1 - DEE/UFCG.
- 52 SHARMA, A. K.; GUPTA, B. d. Fibre-optic sensor based on surface plasmon resonance with ag-au alloy nanoparticle films. *Nanotechnology*, v. 17, p. 124–131, 2006.
- 53 ZHU, J. Surface plasmon resonance from bimetallic interface in au-ag core-shell structure nanowires. *Nanoscale Res Lett*, v. 4, p. 977–981, 2009.

- 54 INAN, U. S.; INAN, A. S. *Electromagnetic Waves*. New Jersey: Prentice Hall, 2000.
- 55 NEFF, H.; ZONG, W.; BORRE, A. M. N. L. M.; HOLZHÜTER, G.
- 56 CHINOWSKY, T. M. *Optical Multisensors based on Surface Plasmon Resonance*. Tese (Doutorado) — University of Washington, 2000.
- 57 PILIARIK, M.; HOMOLA, J. Surface plasmon resonance (spr) sensors: approaching their limits? *Optics Express*, 2009.
- 58 MELENDEZ, J.; CARR, R.; BARTHOLOMEW, D. U.; KUKANSKIS, K.; ELKIND, J.; YEE, S.; FURLONG, C.; WOODBURY, R. A commercial solution for surface plasmon sensing. *Sensors and Actuators B*, v. 35-36, p. 212–216, 1996.
- 59 BIACORE. Surface plasmon resonance. *Technological Note 1*, set. 2001.
- 60 THIRSTRUP, C.; ZONG, W.; BORRE, M.; NEFF, H.; PEDERSEN, H. C.; HOLZHUETER, G. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B*, v. 100, p. 298–308, 2004.
- 61 NEFF, H.; BEEBY, T.; LIMA, A. M. N.; BORRE, M.; THIRSTRUP, C.; ZONG, W.; ALMEIDA, L. A. L. dc-sheet resistance as sensitive monitoring tool of protein immobilization on thin metal films. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, p. 1745–1752, March 2006.
- 62 SLAVYK, R.; HOMOLA, J.; BRYNDA, E. A miniature fiber optic surface plasmon resonance sensor for fast detection of staphylococcal enterotoxin b. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 17, p. 591–595, 2002.
- 63 YUK, J. S.; JUNG, S.-H.; JUNG, J.-W.; HONG, D.-G.; HAN, J.-A.; KIM, Y.-M.; HA, K.-S. Analysis of protein interactions on protein arrays by a wavelength interrogation-base surface plasmon resonance biosensor. *Proteomics*, v. 4, p. 3468–3476, 2004.
- 64 LIEDBERG, B.; NYLANDER, C.; LUNSTRÖM, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, v. 14, p. 299–304, 1983.
- 65 AB, B. Biotechnology handbook. *RAK Design, Upsala, Sweden.*, 1998.

- 66 MURPHY, M.; JASON-MOLLER, L.; BRUNO, J. Using biacore to measure the binding kinetics of an antibody-antigen interaction. *Current Protocols in Protein Science*, v. 19.14, 2006.
- 67 MEDINA, M. B. A biosensor method for detection of staphylococcal enterotoxin a in ramwhole egg. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, v. 14, p. 119–132, 2006.
- 68 GAAG, B. V. D.; SPATH, S.; DIETRICH, H.; STIGTER, E.; BOONZAAIJER, G.; OSENBRUGGEN, T. V.; KOOPAL, K. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control*, v. 14, p. 251–254, 2003.
- 69 UZAWA, H.; OHGAA, K.; SHINOZAKIA, Y.; OHSAWAB, I.; NAGATSUKAC, T.; SETOB, Y.; NISHIDAD, Y. A novel sugar-probe biosensor for the deadly plant proteinous toxin, ricin. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, p. 923–927, 2008.
- 70 RICH, R. L.; MYSZKA, D. G. Grading the commercial optical biosensor literature - class of 2008: The mighty binders. *Journal of Molecular Recognition*, v. 23, p. 1–64, 2009.
- 71 ANALYTICAL, G. *Biacore sensors prices*. 2008. Website. <http://www.grizzlyanalytical.com/>.
- 72 Nomadics - Advanced Instrumentation Group. *SPREETA - Evaluation Module*. 2003. Website. http://www.aigproducts.com/surface_plasmon_resonance/spr.htm.
- 73 ELKIND, J. L.; STIMPSON, D. I.; STRONG, A. A.; BARTHOLOMEW, D. U.; MELENDEZ, J. L. A commercial solution for surface plasmon sensing. *Sensors and Actuators B*, v. 54, p. 182–190, 1999.
- 74 Sensata Technologies. *SPREETA SPR Sensor*. 2006. Website. <http://www.sensata.com/products/sensors/spreeta-highlights.htm>.
- 75 THIRSTRUP, C.; ZONG, W.; NEFF, H. Surface plasmon resonance sensor. *Patent Application Publication*, v. 0018194 A1, 2005.

- 76 FILHO, C. A. de S. *Desenvolvimento de um Sistema Eletrônico de Aquisição e Processamento para Biosensores*. Tese (Doutorado) — Departamento de Engenharia Elétrica - Universidade Federal de Campina Grande, 2006.
- 77 CHINOWSKY, T. M.; QUINN, J. G.; BARTHOLOMEW, D. U.; KAISER, R.; ELKIND, J. L. Performance of the spreeta 2000 integrated surface plasmon resonance affinity sensor. *Sensors and Actuators B*, v. 95, p. 1–9, 2003.
- 78 SIEGERS, C.; BIESALSKI, M.; HAAG, R. Self-assembled monolayers of dendritic polyglycerol derivatives on gold that resist the adsorption of proteins. *Chemistry - A European Journal*, v. 10, p. 2831–2838, April 2004.
- 79 SHANKARAN, D. R.; MIURA, N. Trends in interfacial design for surface plasmon resonance based immunoassays. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 40, p. 7187–7200, November 2007.
- 80 TRITZ, J. M. *Temperature Controlled Microfluidics for Portable Biosensors*. Dissertação (Mestrado) — University of Washington, 2004.
- 81 SHARMA, A. K.; GUPTA, B. D. Theoretical model of a fiber optic sensor based on surface plasmon resonance for temperature detection. *Optical Fiber Technology*, v. 12, p. 87–100, 2006.
- 82 ÖZDEMİR, S. K.; TURHAN-SAYAN, G. Temperature effects on surface plasmon resonance: Design considerations for an optical temperature sensor. *Journal of Lightwave Technology*, v. 21, n. 3, p. 805–814, 2003.
- 83 CHIANG, H. P.; LEUNG, P. T.; TSE, W. S. The surface plasmon enhancement effect on adsorbed molecules at elevated temperatures. *Journal of Chemical Physics*, v. 108, n. 6, p. 2659–2660, 1998.
- 84 CHIANG, H. P.; WANG, Y. C.; LEUNG, P. T.; TSE, W. S. A theoretical model for the temperature-dependent sensitivity of the optical sensor based on surface plasmon resonance. *Optics Communications*, v. 188, p. 283–289, 2001.

- 85 CHIANG, H. P.; YEH, H.-T.; CHEN, C.-M.; WU, J.-C.; SU, S.-Y.; CHANG, R.; WU, Y.-J.; TSAI, D. P.; JEN, S. U.; LEUNG, P. T. Surface plasmon resonance monitoring of temperature via phase measurement. *Optics Communications.*, v. 241, p. 409–418, 2004.
- 86 CHIANG, H. P.; CHEN, C.-W.; WU, J. J.; LI, H. L.; LIN, T. Y.; SÁNCHEZ, E. J.; LEUNG, P. T. Effects of temperature on the surface plasmon resonance at a metal-semiconductor interface. *Thin Solid Films.*, v. 515, p. 6953–6961, 2007.
- 87 FILHO, C. A. S.; LIMA, A. M. N.; MOREIRA, C. S.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Line shape analysis and extended instrumental operation of surface plasmon resonance sensors. *Plasmonics*, 2010.
- 88 MOREIRA, C. S. *Sensor de temperatura SPR em fibra ótica: análise do desempenho e considerações de projeto*. março 2008. Relatório de Projeto e Pesquisa 2 - DEE/UFCG.
- 89 MOREIRA, C. S.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. *Influence of temperature effects on sensitivity of surface plasmon resonance sensors*. Maio 2008. 170–175 p. Instrumentation and Measurement Technology Conference Proceedings, 2008.
- 90 MOREIRA, C. S.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H.; THIRSTRUP, C. Temperature dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold-water interface. *Sensors and Actuators B*, v. 134, p. 854–862, September 2008.
- 91 MOREIRA, C. S.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. *Sistema Reconfigurável para Monitoramento de Temperatura Baseado na Ressonância de Plásmos de Superfície*. Setembro 2008. Congresso Brasileiro de Automática, 2008, Juiz de fora, Minas Gerais, Brasil.
- 92 HOFFMANN, H.-J. *Differential Changes of the Refractive Index*. [S.l.]: Springer, 2004. 96-123 p.
- 93 POLYMERS, T. A. *TOPAS COC*. 2009. Website. http://www.topas.com/products-topas_coc.

- 94 SCHIEBENER, P.; STRAUB, J.; SENGERS, J. M. H. L.; GALLAGHER, J. S. Refractive index of water and steam as function of wavelength, temperature and density. *Journal of Physical Chemistry Reference Data*, v. 19, n. 3, p. 677–717, 1990.
- 95 HARVEY, A. H.; GALLAGHER, J. S.; SENGERS, J. M. H. L. Revised formulation for the refractive index of water and steam as function of wavelength, temperature and density. *Journal of Physical Chemistry Reference Data*, v. 27, n. 4, p. 761–774, 1998.
- 96 HARVEY, A. *Private Communication*. 2006.
- 97 Schott AG. Refractive index and dispersion. *Technical Information N° 29*, 2005.
- 98 Schott AG. Dispersion formula for the temperature coefficient of the refractive index of glasses. *Technical Information N° 19*, 1988.
- 99 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, 1999.
- 100 NAIMUSHIN, A. N.; SPINELLI, C. B.; SOELBERG, S. D.; MANN, T.; STEVENS, R. C.; ; CHINOWSLY, T.; KAUFFMAN, P.; YEE, S.; FURLONG, C. E. Airborne analyte detection with an aircraft-adapted surface plasmon resonance sensor system. *Sensors and Actuators B*, v. 104, p. 237–248, 2005.
- 101 NAIMUSHIN, A. N.; SOELBERG, S. D.; BARTHOLOMEW, D. U.; ELKIND, J. L.; FURLONG, C. E. A portable surface plasmon resonance (spr) sensor system with temperature regulation. *Sensors and Actuators B*, v. 96, p. 253–260, 2003.
- 102 MAO, X.; MA, Y.; ZHANG, A.; ZHANG, L.; ZENG, L.; LIU, G. Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. *Journal of Molecular Recognition*, v. 23, p. 1–64, 2009.
- 103 WIKIPEDIA. *Injection Molding*. 2010. Website. http://en.wikipedia.org/wiki/Injection_molding.
- 104 BÄUMER, S. *Handbook of plastic optics*. 2. ed. Darmstadt: Wiley-VCH, 2008.

- 105 EMILIYANOV, G.; JENSEN, J. B.; BANG, O.; HOIBY, P. E.; PEDERSEN, L. H.; KJÆRAND, E. M.; LINDVOLD, L. Localized biosensing with topas microstructured polymer optical fiber. *OPTICS LETTERS*, v. 32, p. 460–462, March 2007.
- 106 KARLSEN, S. R.; JOHNSTON, K. S.; YEE, S. S.; JUNG, C. C. First-order surface plasmon resonance sensor system based on a planar light pipe. *Sensors and Actuators B*, v. 32, 1996.
- 107 THORLABS. *Catalog*. 2008. Website. <http://www.thorlabs.com/>.
- 108 MOREIRA, C. S.; JUNIOR, A. G. S. B.; LIMA, A. M. N.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Exchangeable low cost polymer biosensor chip for surface plasmon resonance spectroscopy. *Procedia Chemistry*, v. 1, p. 1479–1482, September 2009.
- 109 THORLABS. *Plano-Convex Cylindrical Lenses, N-BK7, Uncoated*. 2010. Website. http://www.thorlabs.com/NewGroupPage9.cfm?ObjectGroup_ID=2803&pn=LJ1638L1.
- 110 CRUZ, R. A. *Confecção de lentes acrílicas para o ensino da óptica*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo - Instituto de Física de São Carlos, 1997.
- 111 Senai Mário Amato - SP. *Ferramenteiro de moldes para plásticos*. 2010. Website. Apostila.
- 112 Departamento de construção e estrutura - UFBA. *Projeto estrutural de moldes rápidos*. 2010. Website. <http://www.ferramentalrapido.ufba.br/>.
- 113 CORPORATION, M. *What is the Molding Shrinkage Phenomenon?* 2010. Website. <http://www.misumi-techcentral.com/tt/en/mold/>.
- 114 LTDA, D. I. e C. *Injeção de Plásticos*. 2010. Website. http://www.dystray.com.br/Injecao_de_polimeros_apresentacao_04_09_20021.pdf.
- 115 WIKIPEDIA. *Birefringence*. 2010. Website. <http://en.wikipedia.org/wiki/birefringence>.
- 116 TAGAYA, A.; OHKITA, H.; MUKOH, M.; SAKAGUCHI, R.; KOIKE, Y. Compensation of the birefringence of a polymer by a birefringent crystal. *Science*, 2003.

- 117 TAGAYA, A.; OHKITA, H.; HARADA, T.; ISHIBASHI, K.; KOIKE, Y. Zero-birefringence optical polymers. *Macromolecules*, 2006.
- 118 BAN, H. T.; HAGIHARA, H.; NISHI, K.; TSUNOGAE, Y.; NOJIMA, S.; SHIONO, T. A new approach for controlling birefringent property of cyclic olefin copolymers. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 2008.
- 119 MACLEOD, H. A. *Thin-film optical filters*. 3. ed. New York: Taylor & Francis, 2001.
- 120 VELEZ, D.; CALCÔA, I. *Deposição de filmes finos*. 2010. Relatório Técnico. Escola Secundária de Alves Redol.
- 121 ROLO, A. G.; GOMES, M. J. M. *Nanoestruturas Semicondutoras - Fundamentos y Aplicaciones*. Madrid: CYTED, 2003. 155-170 p. Capítulo 2: Técnicas de Producción de Nanoestruturas Semicondutoras.
- 122 EMITECH. *K500X Sputtering Coater*. 2009. Website. <http://www.emitech.co.uk/sputter-coater-k500x.htm>.
- 123 Philips Lumileds. *Power Light Source Luxeon Star*. 2010. Website. <http://www.philipslumileds.com/pdfs/DS23.pdf>.
- 124 ROSA, E. C. de A.; ARAUJO, G. F.; SHIGUE, C. Y. *Diodo emissor de luz*. 2010. Relatório Técnico. <http://www.demar.eel.usp.br/electronica/2010/LED.pdf>.
- 125 Ocean Optics. *USB2000++VIS+NIR*. 2010. Website. <http://www.oceanoptics.com/products/usb2000+precon.asp>.
- 126 Roithner Lasertechnik. *White Light LEDs*. 2010. Website. <http://www.roithner-laser.com/>.
- 127 THORLABS. *LC1-USB - USB 2.0 Line Camera*. 2010. Website. <http://www.thorlabs.com/thorProduct.cfm?partNumber=LC1-USB>.
- 128 THORLABS. *Thorlabs Splioco*. 2010. Website. <http://www.thorlabs.com/thorProduct.cfm?partNumber=LC1-USB>.

- 129 General Electrics. *Biacore System and Consumables*. 2010. Website. http://www.med.yale.edu/wmkeck/biophysics/Biacore_Product_Catalog_2008_USA.pdf.
- 130 MOREIRA, C. S.; LIMA, A. M. N.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. *A disposable, low cost prism-based surface plasmon resonance (SPR) biosensor*. May 2010. World Congress on Biosensors 2010: Biosensors 2010.
- 131 PÉREZ, C. A. S. O modelo do elétron livre de drude completa 100 anos. *Cad. Cat. Ens. Fís.*, v. 17, p. 348–359, December 2000.