

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA**

**Espectrômetro de Plásmons de Superfície no  
Infravermelho para o Desenvolvimento de Biossensores**

**Por**

**Daniel Ferreira da Ponte**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da  
Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Elétrica

**Orientador: Eduardo Fontana, PhD**

**Co-Orientador: Elio Meneses-Pacheco, Dr. rer. nat.**

Recife, Setembro de 2003

© Daniel Ferreira da Ponte, 2003

**P813 Ponte, Daniel Ferreira da**

Espectrômetro de plásmons de superfície no infravermelho para o desenvolvimento de biosensores / Daniel Ferreira da Ponte. – Recife: O Autor, 2003.

xv, 121 f. : il., fig., tabs., gráfs.

Inclui bibliografia e anexos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Depto. de Engenharia Eletrônica e Sistemas. Área de Fotônica.

1. Fotônica. 2. Plásmons de superfície. 3. Biosensores. I. Título.

535 CDD (22 ed.)

UFPE/BCTG/2004-35



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Pós-Graduação em Engenharia Elétrica**

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONALIZANTE DE

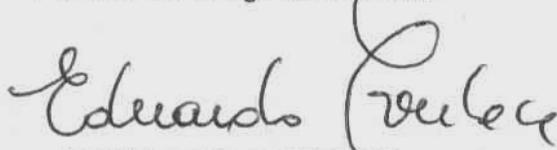
**DANIEL FERREIRA DA PONTE**

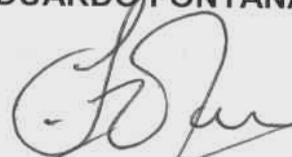
TÍTULO

*“Espectrômetro de Plásmons de Superfície no  
Infravermelho para o Desenvolvimento de Biosensores”*

A comissão examinadora composta pelos professores:  
EDUARDO FONTANA, DES/UFPE, FREDERICO DIAS NUNES,  
DES/UFPE E ANTÔNIO AZEVEDO DA COSTA, DF/UFPE, sob a  
presidência do primeiro, consideram o candidato **DANIEL  
FERREIRA DA PONTE APROVADO.**

Recife, 29 de agosto de 2003.

  
EDUARDO FONTANA

  
FREDERICO DIAS NUNES

  
ANTÔNIO AZEVEDO DA COSTA

*Dedico esta dissertação a minha mãe, Rita  
Albuquerque Ferreira da Ponte e Meu Pai, José Jacinto Ferreira  
da Ponte, pelo exemplo de trabalho e responsabilidade que  
souberam transmitir para mim durante toda minha vida.*

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pela sua presença invisível em tudo que existe no universo e por seu filho, Jesus Cristo, que morrendo por nós nos ensinou a ser humildes e compreender a grandeza do Pai.

Agradeço aos meus pais, Jose Jacinto Ferreira da Ponte e Rita Albuquerque F. Ponte, pela oportunidade de existir e contribuir em toda a minha vida para realização dos meus objetivos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Eduardo Fontana pela realização deste trabalho, contando com sua experiência e disponibilidade, contribuindo de forma singular para minha formação como mestre.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Elio Meneses-Pacheco pelas suas sugestões, críticas e disponibilidade de estar sempre presente em todas as fases deste trabalho, contribuindo para essa realização.

Agradeço à minha noiva Graciete Dias da Silva pela paciência em suportar a minha ausência enquanto me dedicava a este trabalho.

Agradeço aos Professores: Antônio Jerônimo Belfort de Oliveira, Hélio Magalhães, Joaquim Ferreira Martins Filho, Frederico Dias Nunes que contribuíram para minha formação acadêmica.

Agradeço aos meus amigos: Carlos Henrique Duarte, Neide Shinohara, Isnaldo J. S. Coêlho, Sérgio Campello Oliveira, José Paulo Gonçalves de Oliveira, Carmelo José Albanez Bastos Filho, Luciana Reginaldo Soares, Haroldo Vital do Carmo, Ulysses Roberto Chaves Vitor, Vitor Paulo, Reinaldo Golmia, Severino(Biu) da oficina do Dep.de Física, que de forma direta ou indireta contribuíram para essa realização.

Agradeço à Capes pelo apoio financeiro.

“Acredito que[...] os universos abertos pela ciência são muito mais excitantes do que o mistério que resulta da ignorância”

**G. Hesslow**

Resumo da Dissertação apresentada à UFPE como parte dos requisitos necessários  
Para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica

# **ESPECTRÔMETRO DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE NO INFRAVERMELHO PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES**

**Daniel Ferreira da Ponte**

Setembro /2003

Orientador: Eduardo Fontana, PhD

Co-orientador: Elio Meneses-Pacheco, Dr.rer. nat.

Área de Concentração: Fotônica

Palavras-chave: Biossensores, Plásmons de Superfície, RPS, Infravermelho

Número de Páginas: 121

O desenvolvimento de sensores baseados em oscilações de plásmons de superfície (PS) em metais, fundamenta-se na alta sensibilidade dessas oscilações à pequenas flutuações nas propriedades ópticas do meio adjacente à superfície metálica. É também possível através da caracterização dessas oscilações determinar propriedades ópticas e espessuras de filmes finos depositados sobre o metal, bem como a topografia da superfície metálica em escala sub-micrométrica. Além dessas aplicações, essa técnica tem sido empregada no desenvolvimento de sensores biológicos capazes de detectar, quantificar e monitorar em tempo real a interação entre moléculas de antígenos e anticorpos nas proximidades de uma superfície metálica. Neste trabalho, foi montado inicialmente um reflectômetro piloto no visível usando um laser de HeNe adaptado para monitoração e caracterização da cinética de reações biológicas em meios aquosos. Com base em resultados publicados na literatura, onde mostrou-se teoricamente que um ganho na sensibilidade da ressonância de plásmons de superfície (RPS) de um fator de 10 poderia ser obtido através da utilização de luz no infravermelho ( $\lambda \approx 1 \mu\text{m}$ ), foi implementado um sistema de monitoração de reações biológicas em tempo real, operando em  $\lambda = 0,9751 \mu\text{m}$ , que permite monitorar um conjunto de 25 células de reação. Com esse sistema foi possível obter as primeiras medidas registradas na literatura de RPS em  $\lambda = 0,9751 \mu\text{m}$  e estabelecer a metodologia de utilização do sistema para o desenvolvimento de biossensores de alta sensibilidade.

Abstract of Dissertation presented to UFPE as a partial fulfillment of the  
Requirements for the degree of Master in Electrical Engineering.

# **INFRARED SURFACE PLASMON SPECTROMETER FOR THE DEVELOPMENT OF BIOSENSOR**

**Daniel Ferreira da Ponte**

September/ 2003

Supervisor: Eduardo Fontana, PhD.

Area of Concentration: Photonics

Keywords: Surface Plasmons, SPR, Biosensor, Infrared

Number of Pages: 121

The development of sensors based on surface plasmon oscillations (SP) in metals is based on the high sensitivity of these oscillations to small fluctuations in the optical properties of the medium adjacent to the metallic surface. It is also possible through the characterization of these oscillations to determine optical properties and thicknesses of thin films deposited on the metal, as well as the topography of the metallic surface in sub-micrometer scale. Besides these applications, this technique has been used for the development of biological sensors capable to detect, quantify and monitor, in real time, the interaction between antigen and antibody molecules nearby a metallic surface. In this work, we first developed a pilot spectrometer in the visible region using a HeNe laser to observe and characterize the kinetics of biological reactions in aqueous media. Based on theoretical results published in the literature, that show a sensitivity increase in the surface plasmon resonance (SPR) by factor a of 10 through the use of light in the IR ( $\lambda \approx 1 \mu\text{m}$ ), we implemented an optical system at  $\lambda = 0,9751 \mu\text{m}$  for real-time monitoring of 25 reaction cells. Through this system it was possible to obtain the first measurements of SPR at  $\lambda=0,9751 \mu\text{m}$  ever reported in the literature and to establish the methodology of using this system for the development of high sensitivity biosensores.

# Sumário

1. Introdução.....	1
2. Construção de um Reflectômetro e sua Aplicação na Caracterização Óptica de Materiais.....	4
2.1 Introdução.....	4
2.2. Método do Desvio Mínimo.....	4
2.3 Determinação da Precisão do Método do Desvio Mínimo.....	6
2.4 Configuração do Reflectômetro.....	8
2.5 Caracterização do Reflectômetro: Medição Precisa de Índice de Refração.....	12
2.6 Método das Correções Diferenciais.....	15
2.7 Método Algébrico.....	18
2.8 Resultados e Discussão.....	22
2.9 Conclusões e Perspectivas.....	23
3. Plásmons de Superfície.....	24
3.1 Introdução.....	24
3.2 Modelo Clássico da Resposta em Frequência da Permissividade Elétrica de Meios Materiais.....	24
3.3 Condições de Existência de Oscilações de Plásmons de Superfície.....	32
3.3.1. Transmissão Total: Ângulo de Brewster.....	37
3.3.2. Confinamento na Interface: Plásmons de Superfície.....	37
3.4 Técnicas de Observação de Ressonância de Plásmons de Superfície.....	38
3.4.1 Configuração de Otto.....	39
3.4.2 Configuração de Kretschmann.....	40
4. Princípios de Imunologia e o Emprego de RPS na Detecção da Reação Antígeno-Anticorpo.....	44
4.1 Introdução.....	44
4.2 Princípios Básicos de Imunologia.....	44
4.3 Estrutura das Moléculas de Anticorpo.....	47
4.4 Técnicas de Detecção da Reação Antígeno-Anticorpo.....	48
4.4.1 Radioimunoensaio.....	49
4.4.2 Elisa.....	51
4.5 RPS Aplicada na Caracterização de Reações Antígeno-Anticorpo.....	52

5. Espectrômetro de RPS em $\lambda=632,8\text{nm}$ e seu Emprego na Caracterização da Reação Antígeno/Anticorpo.....	55
5.1 Sistema Óptico.....	55
5.2 Sistema Integrado Prisma-Placa Multicélulas.....	56
5.3 Formulação Teórica da Reflectância do Sistema Prisma-Substrato Metalizado.....	59
5.4 Observação Experimental do Efeito de RPS.....	62
5.5 Caracterização em Tempo Real de Reações Imunológicas por RPS.....	65
6. Espectrômetro de RPS em $\lambda = 975,1\text{nm}$ .....	71
6.1 Justificativa.....	71
6.2 Sistema Óptico com Feixe Colimado.....	78
6.2.1 Descrição do Sistema Óptico.....	78
6.2.2 Dificuldades de Realização de Medidas no Modo de Varredura Angular.....	80
6.2.3 Resultados Experimentais no Ar e na Água.....	81
6.3 Sistema Óptico com Feixe Focalizado.....	87
6.3.1 Descrição da Montagem.....	88
6.3.2 Dificuldades em Realizar as Medidas na Montagem Focalizada.....	92
6.3.3 Resultados Experimentais no Ar.....	93
6.3.4 Resultados Experimentais do Efeito de RPS na Configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura.....	95
6.4. Metodologia de Posicionamento para Observação da Cinética de RPS com Feixe Focalizado.....	98
6.4.1 Metodologia de Posicionamento.....	98
6.4.2 Posicionamento do Feixe na Célula Central.....	99
6.4.3 Metodologia para Observação da Cinética de Reações no Sistema Focalizado.....	111
7. Conclusões e Perspectivas.....	113
Referências Bibliográficas.....	116
Apêndice: Cálculo de $d'$ .....	119

## ***Lista de Figuras***

Fig.2.1	Ilustração do desvio de um feixe de luz através de um prisma.....	5
Fig.2.2	Curva do ângulo de desvio do feixe refratado de um prisma para $n=1,52$ e $\alpha=60^\circ$ .....	6
Fig.2.3	Configuração do reflectômetro óptico: P-polarizador; BS-divisor de feixe; S1-feixe incidente; S2-feixe de referência; S3-feixe refletido pelo prisma; D1-fotodetector do sinal; fotodetector da referência.....	9
Fig.2.4	Calibração do parafuso micrométrico.....	10
Fig.2.5	Dependência da variação relativa do ângulo de giro do prisma com o deslocamento do parafuso micrométrico.....	11
Fig.2.6	Diagrama do caminho do feixe de luz no interior do prisma. Algumas reflexões foram omitidas para simplificar o diagrama.....	13
Fig.2.7	Curva Teórica da Reflectância Para $\alpha= \alpha'=60^\circ$ e $n=1,52$ .....	14
Fig.2.8	Dependência angular da função reflectância (linha sólida) após o ajuste aos pontos medidos experimentalmente (círculos) para $n=1,515$ e $\alpha=59,89$ .....	17
Fig.2.9	Detalhamento das curvas da Fig.6 na região em torno do ângulo de Brewster.....	18
Fig.2.10	Curva de intersecção das funções $f(n)$ e $g(n)$ para os pontos $\theta_C=29,02$ e $\theta_B=42,54$ .....	20
Fig.2.11	Determinação do ângulo crítico da curva de reflectância.....	21

Fig.2.12	Interpolação da reflectância em torno do ângulo de Brewster através da função <i>Spline</i> do Mathcad.....	22
Fig.3.1	Distribuição de cargas em um átomo sob a ação de um campo elétrico externo.....	25
Fig.3.2	Dependência espectral das permissividades complexas dos metais ouro, cobre, prata e alumínio[17].....	31
Fig.3.3	Geometria para determinação da condição de existência de uma oscilação confinada a uma interface planar.....	32
Fig.3.4	Configuração de Otto para excitação de RPS.....	39
Fig.3.5	Efeito produzido pela variação da espessura da camada de ar entre o prisma e o metal na configuração de Otto Para $\lambda = 632,8\text{nm}$ e os valores de $n$ e $\epsilon$ ilustrados na Tabela 3.1 .....	40
Fig.3.6	Configuração de Kretschmann para excitação de PS.....	41
Fig.3.7	Efeito produzido pela variação do parâmetro $d_k$ na configuração de Kretschmann em $\lambda = 632,8\text{nm}$ com $n$ e $\epsilon$ ilustrados na Tabela 3.1.....	42
Fig.4.1	Representação simplificada de uma molécula de anticorpo.....	47
Fig.4.2	Aspecto de uma molécula de anticorpo.....	48
Fig.4.3	Teste radioimunoensaio para um soro contendo antígenos.....	49
Fig.4.4	Ensaio competitivo entre antígenos marcados e não marcados. a) Reação competitiva de antígenos do soro e antígenos marcados com solução pura de anticorpos específicos. b) Formação de precipitado antigino-anticorpo em solução.....	50

Fig.4.5	Reação antígeno-anticorpo no teste Elisa. a) Imobilização de antígenos nas paredes da célula de reação. b) Reação entre anticorpos presentes no soro e antígenos imobilizados.....	51
Fig.4.6	Reação enzimática para quantificação de anticorpo. a) Adição de anticorpo Anti-imoglobulina a uma solução resultante da reação antígenos-anticorpos. b) Revelação das enzimas através de uma solução cromogênica.....	52
Fig.4.7	Configuração de Kretschmann para observação de RPS.....	53
Fig.4.8	Princípio de imunossensores em RPS.....	54
Fig.5.1	Sistema usado para investigar RPS em $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ .....	56
Fig.5.2	Fotografia da placa multicélulas.....	57
Fig.5.3	Detalhamento da forma de montagem do sistema integrado.....	58
Fig.5.4	Fotografia do sistema integrado(prisma/substrato/placa multicélulas) afixado no estágio de rotação através do suporte acrílico.....	58
Fig.5.5	Detalhe do sistema prisma-filme-célula.....	60
Fig.5.6	Gráfico teórico (linha contínua) e experimental (círculos ligados) da refletância no ar $n(\text{ar})=1$ e $\varepsilon(\text{Au})= -5,5-1,9j$ . e $d(\text{Au})=56,6\text{nm}$ .....	63
Fig.5.7	Gráfico teórico Eq.5.4(linha contínua) e experimental(círculos ligados) da refletância para uma solução de PBS com $n(632,8\text{nm})=1,333$ .....	65
Fig.5.8	Cinética da reação IgG/anti-IgG para uma solução com concentração final(PBS+Anti-IgG) de $10\mu\text{g/mL}$ e (PBS+IgG) de $10\mu\text{g/mL}$ .....	67

Fig.5.9	Variação relativa da reflectância em função do filme orgânico de índice de refração $n=1,5$ [20] formada sobre o filme metálico de espessura $d_o=56,6\text{nm}$ e permissividade.....	69
Fig.5.10	Deslocamento da curva de RPS para uma camada protéica.....	70
Fig.6.1	Figura da estrutura prisma-metal-meio externo.....	72
Fig.6.2	Curva de ressonância (a) em função de $k_x$ representada no espaço $k_x$ (b) em função de $\theta$ .....	73
Fig.6.3	Dependência espectral obtida na ref.[7] da meia-largura reduzida da RPS para filmes de ouro, cobre, prata e alumínio na configuração metal-ar de Kretschmann em prisma SF2.....	75
Fig.6.4	Dependência espectral obtida na ref.[7] da meia-largura reduzida da RPS para filmes de ouro, cobre, prata e alumínio na configuração metal-água de Kretschmann em prisma SF2.....	76
Fig.6.5	Dependência espectral de RPS obtida na ref.[7] em filmes de ouro, prata, cobre e alumínio na configuração SF2-metal-água.....	77
Fig.6.6	Dependência espectral de RPS obtida na ref.[7] em filmes de ouro, prata, cobre e alumínio na configuração BK7-metal-água.....	78
Fig.6.7	Montagem experimental mecânica para laser Infravermelho.....	79
Fig.6.8	Macrocélula usada para medir RPS em água no Infravermelho.....	81
Fig.6.9	RPS na configuração de prisma de acoplamento de Kretschmann para a estrutura multicamada SF2-BK7-Cr(3nm)-Au(57nm)-ar em $\lambda = 975,1\text{nm}$ . Os pontos representam a medida experimental e a linha contínua, a curva teórica obtida para os parâmetros do filme de ouro indicados na Tabela 6.1.....	83

Fig.6.10	Gráfico comparativo entre a medida experimental de RPS para a estrutura SF2-BK7-Cr-Au-ar em $\lambda = 975,1$ nm e no vermelho( $\lambda = 630-680$ nm).....	84
Fig.6.11	Curva experimental de RPS na configuração de Kretschmann para a estrutura SF2-BK7-Cr-Au-água pura em $\lambda =975,1$ nm.....	85
Fig.6.12	Curva teórica da variação relativa da reflectância em função da espessura de uma camada orgânica hipotética de espessura $d$ ( $n=1,5$ ) formada sobre o filme de ouro.....	87
Fig.6.13	Espectrômetro de RPS em $\lambda=975,1$ nm, no modo focalizado.....	89
Fig.6.14	Distribuição de luz irradiada pelo laser de Infravermelho. Essa distribuição corresponde a uma cintura do feixe de 1 cm.....	89
Fig.6.15	Interface gráfica para medir a distribuição de luz refletida do prisma do espectrômetro.....	90
Fig.6.16	Interface gráfica para monitorar o pixel da curva de RPS.....	91
Fig.6.17	Posicionamento do foco do feixe na extremidade superior do prisma.....	91
Fig.6.18	Focalização do feixe Infravermelho na superfície do prisma.....	92
Fig.6.19	Foto da RPS no ar na montagem da Fig.6.11 a) com polarizador no visível b) com polarizador no Infravermelho.....	94
Fig.6.20	Deslocamento angular da imagem refletida através da linha de ressonância para a estrutura SF2-BK7-Metal-Ar em $\lambda=975,1$ nm.....	94
Fig.6.21	Curva de RPS para ouro exposto ao ar ambiente, obtida com sensor de imagem.....	95

Fig.6.22	Foto de linha de RPS na configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura com polarizador no visível(a) e no infravermelho(b).....	96
Fig.6.23	Deslocamento angular da imagem refletida do prisma através da linha de RPS na configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura.....	96
Fig.6.24	Curva de RPS obtida com sensor de imagem na configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura.....	97
Fig.6.25	Posicionamento do feixe na região central da face superior do prisma (Ponto D).....	100
Fig.6.26	Geometria para determinação do reposicionamento após rotação do prisma.....	103
Fig.6.27	Deslocamento do prisma para reposicionamento do feixe.....	105
Fig.6.28	Gráfico da curva $\Delta x'$ da Eq.(6.22) e da curva polinomial $\Delta x'(\theta)$ da Eq.(6.23).....	106
Fig.6.29	Configuração para determinação da correção da posição do prisma devido a espessura do substrato.....	107
Fig.6.30	Gráfico da curva $\Delta x''$ da Eq.(6.23) e da curva polinomial $\Delta x''(\theta)$ da Eq.(6.25).....	109
Fig.6.31	Geometria para varredura do feixe nas células de reação.....	110
Fig.6.32	Mapa de posicionamento do feixe nas células.....	110
Fig.6.33	Foto dos transladores para posicionamento do prisma.....	111
Fig.6.34	Porção da tela da interface gráfica onde é exibida a curva de RPS.....	112

## ***Lista de Tabelas***

Tabela.2.1	Características do sistema.....	10
Tabela.2.2	Procedimento de interação pelo método de correção diferencial.....	16
Tabela.2.3	Resumo dos resultados experimentais.....	23
Tabela.3.1	Parâmetros ópticos dos elementos do sistema no vermelho para.....	41
Tabela.5.1	Resultados comparativos teóricos, ajuste de curva, e experimental para ângulo de ressonância no ar.....	63
Tabela.5.2	Protocolo para observação experimental de reação IgG/ anti-IgG.....	66
Tabela.6.1	Resultados teóricos e experimentais obtidos no ar em $\lambda=975,1$ nm.....	82
Tabela.6.2	Resultados teórico e experimental obtidos no Infravermelho para a configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura.....	85
Tabela.6.3	Valores de alguns parâmetros do sistema óptico.....	106

### 1. Introdução

O estudo das ondas eletromagnéticas e a sua interação com a matéria tem sido largamente empregada para caracterização de materiais. A possibilidade de extrair parâmetros ópticos através de medidas de espalhamento, reflectividade e transmissividade nesses materiais proporcionou o desenvolvimento de diversas técnicas de espectroscopia.

A ressonância de plásmons de superfície (RPS) [1] é um fenômeno cujo princípio físico possibilita a caracterização de materiais através da medição da reflectância e a partir da sua função característica determinar propriedades ópticas e estruturais de interfaces, incluindo medição da permissividade complexa de metais [2], espessuras de filmes finos [2], bem como a topografia da interface em escala sub-micrométrica [3]. Além dessas aplicações, essa técnica tem sido empregada no desenvolvimento de sensores biológicos capazes de detectar, quantificar e monitorar em tempo real a interação entre moléculas de antígenos e anticorpos nas proximidades de uma superfície metálica [4].

Pesquisadores como Otto [5] e Kretschmann [6] propuseram técnicas de observação do efeito de RPS. Otto propôs o uso de um prisma de vidro com uma das faces posicionada nas proximidades de uma superfície metálica de forma a excitar a oscilação de plásmons de superfície (PS), característica do efeito, na interface metal-ar. Kretschmann por sua vez, utilizou um prisma de acoplamento com uma das faces coberta com um filme metálico, onde a oscilação de PS ocorreria na interface exposta do metal. Esse segundo método tem sido o mais utilizado no desenvolvimento de sensores baseados em RPS, uma vez que aquele proposto por Otto exige um controle preciso do espaçamento entre as superfícies do prisma e do metal.

Esta dissertação tem como objetivo implementar um espectrômetro de plásmons de superfície, baseado na configuração de Kretschmann, para o desenvolvimento de sensores biológicos. O espectrômetro opera em um comprimento de onda fixo, com a componente do vetor de onda do feixe de luz incidente paralela a superfície sendo o parâmetro de varredura no sistema de medição. Assim, quando nos referimos a espectrômetro neste trabalho,

estamos de fato nos referindo ao espectro de vetores de onda associado à linha de absorção contida no efeito de RPS.

Como parte inicial do desenvolvimento do trabalho, montamos uma primeira versão de um reflectômetro utilizando um laser de HeNe e caracterizamos o sistema quanto a sua precisão através de medidas de reflectância em um prisma de vidro BK7. Desenvolvemos dois métodos alternativos de análise para determinação simultânea de dois parâmetros característicos do prisma: o índice de refração e um ângulo interno. Essa fase do trabalho compreendeu também uma discussão da precisão obtida com o emprego desses métodos à luz de técnicas de medição convencionais.

Na segunda etapa do trabalho adaptamos o reflectômetro para caracterização e monitoração de reações biológicas em tempo real através da técnica de RPS. Os trabalhos desenvolvidos nessa etapa incluíram a observação do fenômeno de RPS em filmes de ouro em contato com o ar e com soluções biológicas. Para isso foi fabricada uma placa composta de várias células de reação e implementado um sistema de aquisição de dados para monitoração em tempo real da cinética de reações biológicas do tipo antígeno-anticorpo. Os trabalhos nessa etapa incluíram também o desenvolvimento de protocolos de imobilização de antígenos em filmes de ouro.

A largura de linha da curva de RPS representa um importante parâmetro na quantificação da sensibilidade de sensores biológicos. Esta sensibilidade aumenta à medida que a linha se torna mais estreita. Resultados publicados na literatura mostram que a largura de linha diminui substancialmente para comprimentos de onda no infravermelho. Por exemplo, um ganho de sensibilidade da ordem de 10 pode ser obtido se o comprimento da luz incidente for aumentado de 632,8nm para 1 $\mu$ m [7]. Esse resultado motivou o desenvolvimento de um espectrômetro baseado em RPS, operando com diodo laser em  $\lambda = 975,1\text{nm}$  na etapa final do trabalho desenvolvido nesta dissertação. O sistema foi desenvolvido de forma a ser compacto e versátil, pois sua configuração permite extrair medidas de RPS por varredura do ângulo de incidência ou,

de forma mais rápida e eficiente, através de uma única medida da distribuição de luz refletida, quando o feixe de luz é focalizado em um ponto da superfície sob teste.

Com esse novo arranjo experimental foi possível observar RPS em filmes de ouro expostos ao ar e à soluções aquosas em  $\lambda = 975,1\text{nm}$ . O efeito foi caracterizado através de medidas no modo de varredura angular e no modo focalizado de operação do espectrômetro. Nessa última configuração foi possível registrar de uma só vez todo o espectro do efeito de RPS, identificado como uma linha escura contida na distribuição de luz refletida da superfície. Essa talvez represente a primeira observação experimental da imagem associada ao efeito de RPS em  $\lambda = 975,1\text{nm}$  registrada na literatura. Como parte final de construção do sistema, foi desenvolvida toda a metodologia de operação e protocolos necessários para utilização do espectrômetro infravermelho no desenvolvimento de sensores biológicos baseados em RPS.

O presente trabalho está organizado em sete capítulos e um apêndice. No capítulo 2, apresentamos uma primeira versão de reflectômetro operando com laser de HeNe, onde demonstramos a precisão de determinação simultânea de dois parâmetros de um elemento óptico, utilizando um prisma BK7 como amostra. No capítulo 3 são discutidos os princípios físicos associados às oscilações de plásmons de superfície em interfaces. As técnicas experimentais de observação do efeito de RPS são também descritas nesse capítulo. No capítulo 4, apresentamos uma breve descrição das técnicas convencionais de imunensaio para detecção de antígenos ou anticorpos em meios biológicos e o princípio de utilização do efeito de RPS na caracterização em tempo real da cinética de reações envolvendo a interação dessas macromoléculas. No capítulo 5 apresentamos uma primeira versão do espectrômetro operando em  $\lambda = 632,8\text{nm}$  que é utilizada para observação experimental da cinética da reação de um sistema modelo tendo a imunoglobulina G (IgG) e o anti-IgG como moléculas interagentes. O capítulo 6 descreve a implementação do espectrômetro de plásmons de superfície operando em  $\lambda = 975,1\text{ nm}$  para aplicações biológicas e finalmente no capítulo 7 são apresentadas as conclusões e propostas para futuros trabalhos.

# 2. Construção de um Reflectômetro e sua Aplicação na Caracterização Óptica de Materiais

## 2.1 Introdução

O preciso conhecimento do índice de refração de uma substância é necessário em diversos setores da atividade científica e industrial, como por exemplo, no controle de qualidade do processo de fabricação de vidros, fibras ópticas, plásticos, componentes semicondutores e outros materiais [8]. O uso de estruturas prismáticas tem sido freqüentemente utilizado para determinação de índice de refração de materiais com aplicações, por exemplo, na determinação do grau de pureza da água e do teor de açúcar, sal e de outros solutos em meios aquosos [9]. Diversas técnicas têm sido propostas na literatura para medição precisa do índice de refração, incluindo a medição direta do ângulo de Brewster [10], técnicas interferométricas [11], métodos baseados em efeitos de difração [12], bem como efeitos relacionados à refração da luz transmitida pelo material. Neste capítulo pretende-se inicialmente apresentar o princípio do método do desvio mínimo, que representa uma das técnicas para determinação do índice de refração, fazendo em seguida uma análise da precisão dos resultados que podem ser obtidos com essa técnica. Descrevemos em seguida a implementação de uma montagem piloto de um reflectômetro operando com laser de HeNe para realizar medidas de reflectância de prismas de vidro. Mostramos através de uma formulação teórica e numérica dos resultados, que é possível determinar simultaneamente o índice de refração e o ângulo interno do prisma, com precisão semelhante àquela obtida através do método do desvio mínimo.

## 2.2. Método do Desvio Mínimo

Nesse método o material a ser analisado é moldado na geometria de um prisma com ângulo interno  $\alpha$ , conforme ilustrado na Fig.2.1. Um feixe incidente monocromático sofre um desvio  $\delta$  ao atravessar a amostra. O desvio entre o feixe refratado do prisma e o feixe incidente é uma função do ângulo de incidência  $\theta$ , do comprimento de onda  $\lambda$  e do ângulo  $\alpha$ .

Matematicamente o ângulo de desvio pode ser posto na forma [13]

$$\delta = \theta_i + \text{sen}^{-1}[(\text{sen } \alpha)(n^2 - \text{sen}^2 \theta_i)^{1/2} - \text{sen } \theta_i \cos \alpha] - \alpha, \quad (2.1)$$

onde  $\theta_i$  é o ângulo que o feixe incidente faz com a normal e  $n$  é o índice de refração do prisma.

A determinação do desvio  $\delta$  exige um prévio conhecimento do ângulo interno do prisma  $\alpha$ . A função expressa pela Eq.(2.1) é mostrada na Fig.2.2 para  $n = 1.52$  e  $\alpha = 60^\circ$ . Nesse gráfico pode-se observar um valor mínimo para  $\delta = \delta_m$  no ângulo de incidência  $\theta = \theta_m$ . Este valor mínimo pode se obtido da condição

$$\frac{d\delta}{d\theta} = 0. \quad (2.2)$$

Utilizando a Eq.(2.1) na Eq.(2.2) resulta

$$n = \frac{\text{sen}[(\delta_m + \alpha)/2]}{\text{sen}(\alpha/2)}. \quad (2.3)$$

Pela Eq.(2.3) o índice de refração é dependente do ângulo interno do prisma e do valor do desvio mínimo. A precisão no valor do índice de refração depende da precisão no valores de  $\alpha$  e  $\delta_m$ , ou seja  $n=n(\alpha, \delta_m)$ .

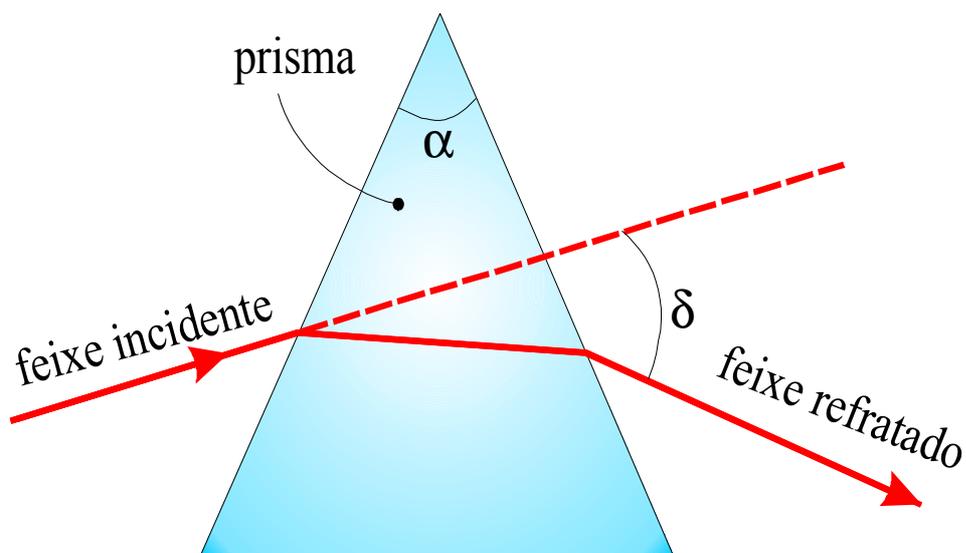


Fig.2.1 Ilustração do desvio de um feixe de luz através de um prisma.

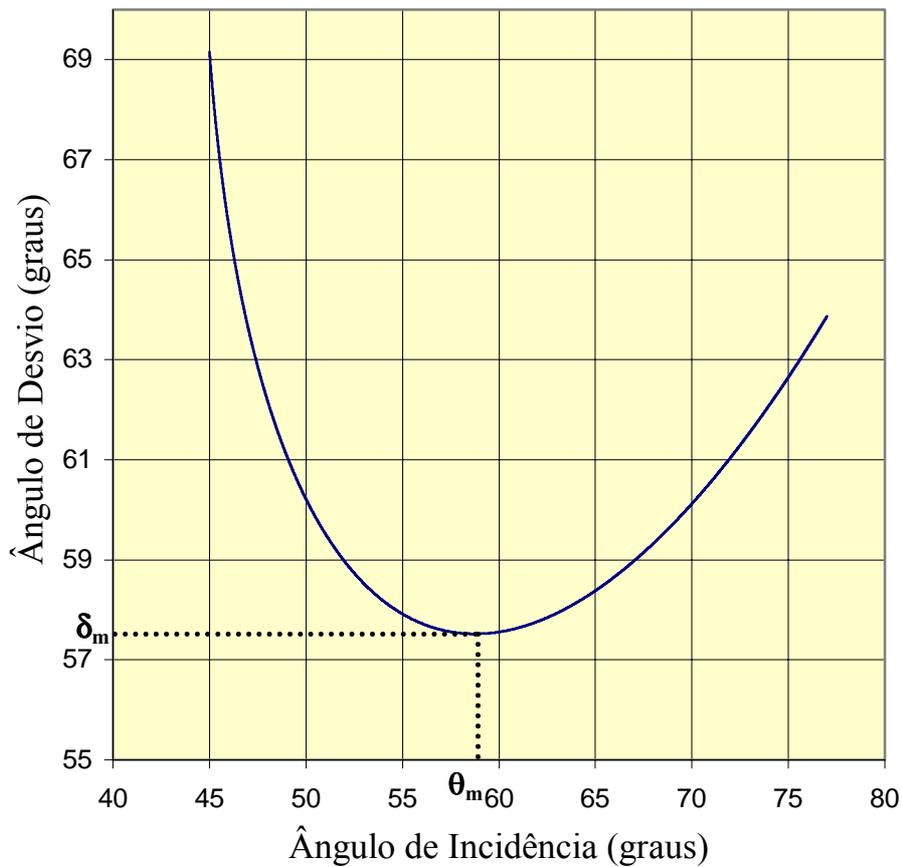


Fig.2.2 Curva do ângulo de desvio do feixe refratado de um prisma para  $n=1,52$  e  $\alpha=60^0$ .

### 2.3 Determinação da Precisão do Método do Desvio Mínimo

A análise da propagação do erro de medição de parâmetros de uma função é feita para uma função genérica,

$$F = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) . \tag{2.4}$$

Pelo método do desvio quadrático cada  $x_i$  da função contribui com um desvio padrão

$$\sigma_F = \frac{\partial F}{\partial x_i} \sigma_i , \tag{2.5}$$

onde  $\sigma_i$  é o desvio padrão médio associado ao erro de medição do parâmetro  $x_i$ . Assim considerando a contribuição das incertezas de todos os parâmetros, o desvio médio quadrático da função assume a forma,

$$\sigma_F^2 = \left( \frac{\partial f}{\partial x_1} \right)^2 \sigma_1^2 + \left( \frac{\partial f}{\partial x_2} \right)^2 \sigma_2^2 + \dots + \left( \frac{\partial f}{\partial x_N} \right)^2 \sigma_N^2. \quad (2.6)$$

Aplicando a Eq.(2.6) para a função  $n(\alpha, \delta_m)$ , obtém-se o erro de medição do índice de refração que pode ser posto na forma

$$\Delta n = (\Delta_1^2 + \Delta_2^2)^{1/2}, \quad (2.7)$$

onde

$$\Delta_1 = \frac{1}{2} \frac{\cos[(\delta_m + \alpha)/2]}{\sin(\alpha/2)} \Delta \delta_m, \quad (2.8)$$

$$\Delta_2 = -\frac{1}{2} \frac{\sin(\delta_m/2)}{\sin^2(\alpha/2)} \Delta \alpha. \quad (2.9)$$

Nas Eqs.(2.8) e (2.9) os termos  $\Delta \delta_m$  e  $\Delta \alpha$  são os erros nas medidas de  $\delta_m$  e  $\alpha$  respectivamente. Por exemplo, para um prisma com índice de refração  $n = 1,5$  e  $\alpha = 60^\circ$ , a Eq.(2.3) fornece  $\delta_m = 37,18$  para esses parâmetros. Admitindo um erro na medição angular tal que  $\Delta \delta_m \cong \Delta \alpha$ , a Eq.(2.7) com auxílio das Eqs.(2.8) e (2.9) fornece  $\Delta n/n = \Delta \delta_m$ . Ou seja, o erro relativo de determinação do índice de refração é aproximadamente igual àquele associado a medição angular. Portanto, a determinação precisa do índice de refração dependerá de quão preciso for medido o desvio  $\delta_m$ . O método acima apresentado é conhecido como método clássico de determinação do

índice de refração e a partir dele outros métodos alternativos foram implementados para determinar esse parâmetro em materiais com estruturas prismáticas. Técnicas como medição direta do ângulo de Brewster, usando um laser e uma câmera de CCD permite determinar o índice de refração da ordem de aproximadamente uma ou duas casas decimais [10], por outro lado usando o espectrômetro goniométrico de Gaertner que combina o método do desvio mínimo com medidas interferométricas [11] permite medir índice de refração de materiais sílicos, em formato prismático e no comprimento de onda de 193nm, da ordem de aproximadamente seis casas decimais. Contudo esse método utiliza motores de passo micrométricos e uma montagem bastante sofisticada e dispendiosa de difícil realização prática. Na seção seguinte apresentamos a construção de um reflectômetro, objetivando inicialmente a determinação do índice de refração e do ângulo interno de um prisma, e a longo prazo para realização dos estudos e aplicações do efeito de ressonância de plásmons de superfície tratados nesta dissertação.

### 2.4 Configuração do Reflectômetro

Com objetivo de realizar estudos e aplicações do fenômeno de RPS foi montado um reflectômetro com o qual foi possível caracterizar um material no formato prismático, extraíndo o índice de refração e ângulo interno do prisma. A Fig.2.3 ilustra a configuração do reflectômetro. Um laser de HeNe ( $\lambda = 632,8\text{nm}$ ) de 5mW é polarizado na direção paralela ao plano de incidência através do polarizador *P*. O feixe é dividido nas componentes *S1* e *S2* através do divisor de feixe *BS*. O feixe *S1* incide sobre o prisma equilátero de vidro crown BK7 (Melles Griot, Irvine, Califórnia - EUA) com arestas de 60mm, e valores nominais para o ângulo interno e índice de refração  $\alpha = 60^\circ \pm 3 \text{ arcmin}$  e  $n(\lambda=632,8\text{nm}) = 1,515 \pm 0,001$ , respectivamente. O prisma está fixado, através de um suporte, a um estágio de rotação que pode girar nos sentidos horário e anti-horário através de um parafuso micrométrico. Dois fotodetectores de silício, *D1* e *D2* são usados para medir as intensidades do feixe refletido pelo prisma *S3* e do feixe de referência *S2*. Os sinais gerados pelos fotodetectores *D1* e *D2* são coletados em dois canais de um conversor analógico-digital DAS-16, 100 kHz (Keithley Instruments, Cleveland, Ohio - EUA) alojado em um dos *slots* de um IBM-PC 486.

Um software desenvolvido no ambiente *quickbasic* é utilizado para processamento e gravação dos dados. Para minimizar ruído, cada medida é obtida da média de 1000 amostras da razão entre o sinal  $S3$  e a referência  $S2$ . Para obter a reflectância do prisma, que corresponde à razão  $S3/S1$ , mede-se a razão  $S1/S2$  antes de cada seqüência de medidas que é independente de flutuações no nível de potência do laser. A partir dessa medida, a reflectância interna da face superior do prisma é dada por

$$R = \frac{S3/S2}{S1/S2} = \frac{S3}{S1}. \quad (2.10)$$

Uma calibração entre a variação relativa de deslocamento  $\Delta l$  do parafuso micrométrico e a variação relativa do ângulo de giro do prisma  $\Delta\theta$  foi obtida variando-se o ângulo entre os feixes  $S1$  e  $S2$ , mantendo o prisma sempre perpendicular ao feixe  $S1$ , conforme ilustrado na Fig.2.4.

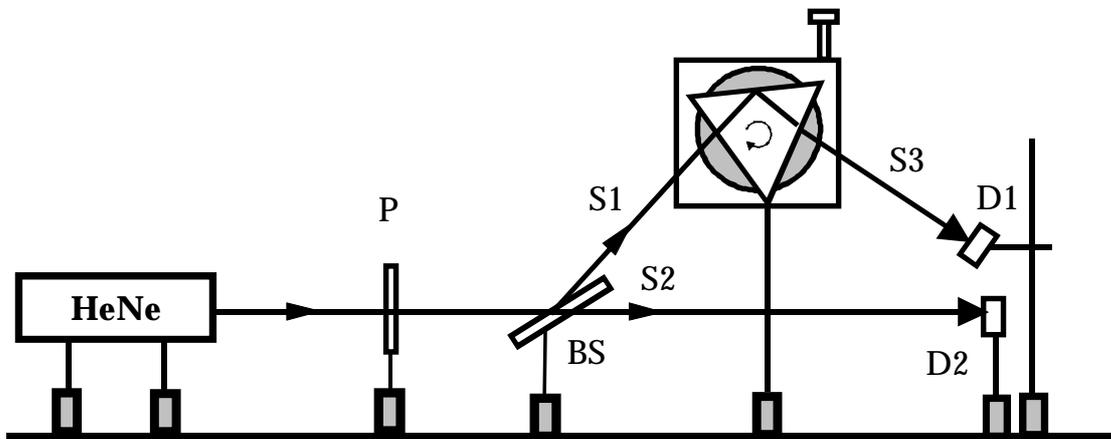


Fig 2.3 Configuração do reflectômetro óptico:  $P$ -polarizador;  $BS$ -divisor de feixe;  $S1$ -feixe incidente,  $S2$ -feixe de referência;  $S3$ -feixe refletido pelo prisma;  $D1$ -fotodetector do sinal;  $D2$ -fotodetector da referência.

A curva de calibração representada na Fig.2.5 foi obtida relacionando-se a variação  $\Delta\theta = \theta_1 - \theta_0$  em função do deslocamento  $\Delta l$  do parafuso micrométrico. A curva fornece uma inclinação  $\Delta\theta/\Delta l = 1,288^\circ/\text{mm}$ . O intervalo máximo de variação do

parafuso é de 10mm, com resolução de 10  $\mu\text{m}$ . O suporte de giro do prisma permite, após atingido um intervalo completo de 10 mm, o reposicionamento do parafuso, gerando assim uma rotação contínua do prisma em uma faixa angular arbitrária.

O sistema atual tem uma incerteza de leitura na posição do parafuso estimada em  $\pm 2,5 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,19$  arcmin). Após essa calibração o divisor *BS* foi mantido numa posição fixa para realização das medidas. A Tabela 2.1 sumariza os parâmetros característicos do sistema.

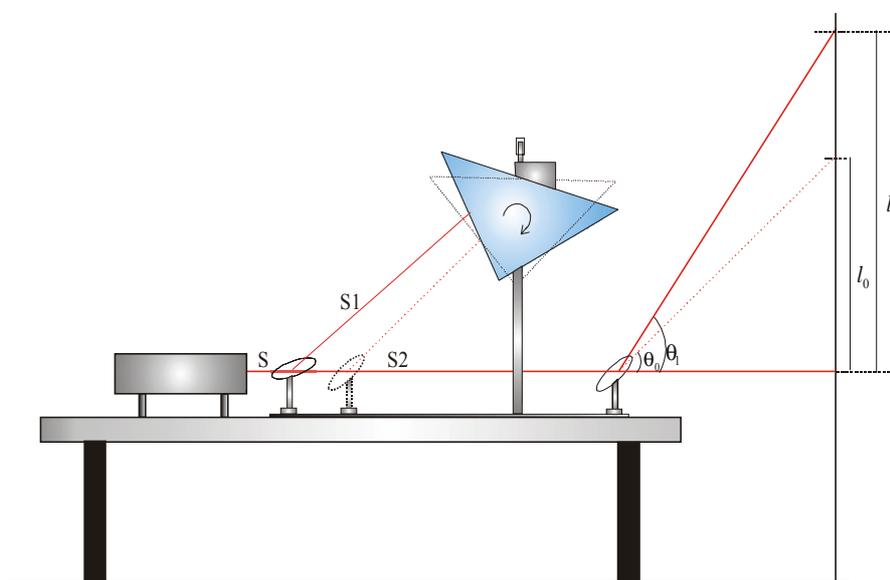


Fig.2.4 Calibração do parafuso micrométrico.

Tabela 2.1 Características do sistema óptico

Varredura do Espectrômetro do ER	10mm
Passo por volta do parafuso do ER	0,5mm
Sub-divisões por volta do ER	50
Resolução do parafuso do ER	10 $\mu\text{m}$
Incerteza	$\pm 2,5\mu\text{m}$
Potência do laser	5mw
Comprimento de onda, $\lambda$	632,8nm
$n_{\text{BK7}}$	1,515 $\pm$ 0,001

\*ER- Estágio de Rotação

Para medição da dependência angular da função reflectância foi adotado o seguinte procedimento. Inicialmente o prisma é posicionado de forma que a sua face frontal fique alinhada perpendicularmente à direção do feixe  $S1$ , ilustrado na Fig. 2.3. Todo posicionamento angular é feito a partir desse ponto de referência inicial, com o estágio sendo rotacionado no sentido horário da Fig.2.3. Para cada ângulo de rotação o detector  $D1$  é posicionado de forma a sempre estar perpendicular ao feixe  $S3$  da Fig.2.3. Quando o parafuso atinge o seu limite máximo de varredura, o fotodetector  $D1$  é retirado de posição de forma a permitir que o raio transmitido  $S3$  atinja a superfície da mesa óptica.

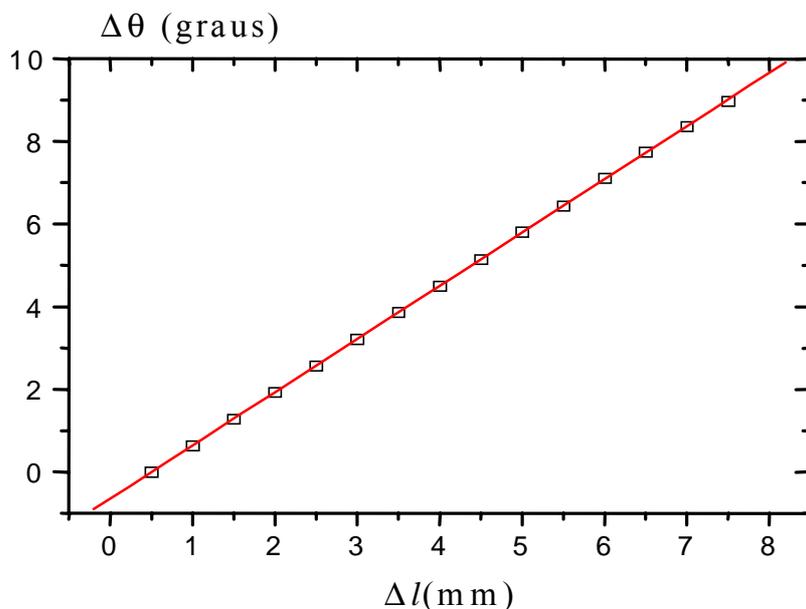


Fig.2.5 Dependência da variação relativa do ângulo de giro do prisma  $\Delta\theta$  com o deslocamento  $\Delta l$  do parafuso micrométrico.

A posição do feixe sobre a mesa é marcada. Essa posição representa o último ângulo medido. Em seguida o parafuso é destravado e girado no sentido anti-horário para sua posição inicial. Com o cuidado de evitar o efeito de histerese o parafuso é travado novamente movendo o prisma sempre na mesma direção. Em implementações futuras do reflectômetro esse problema será evitado pela utilização de um parafuso sem fim acionado por um motor de passo controlado por computador.

Na seção 2.5 o objetivo é demonstrar a viabilidade de medição do índice de refração com o reflectômetro. É demonstrada a seguir a viabilidade de medição simultânea do índice de refração e de um ângulo interno do prisma com o reflectômetro.

### 2.5 Caracterização do Reflectômetro: Medição Precisa de Índice de Refração

A trajetória do feixe no interior do prisma está ilustrada na Fig.2.6. Algumas reflexões foram omitidas para não sobrecarregar a figura. Admite-se que o prisma tenha ângulo  $\alpha$  entre as faces 1 e 2 e  $\alpha'$  entre as faces 2 e 3. O emprego da formulação de Fresnel para polarização no plano de incidência, conforme a indicado na Fig.2.6, a reflectância  $R=S_3/S_1$  pode ser expressa na forma [13]

$$R = T(\theta)T(\theta')|r(\beta)|^2, \quad (2.11)$$

com

$$T(x) \equiv \frac{4n^2 \cos x [n^2 - (\text{sen } x)^2]^{1/2}}{\left\{ n^2 \cos x + [n^2 - (\text{sen } x)^2]^{1/2} \right\}}, \quad (2.12)$$

representando a função transmitância associada a face 1 ou 3 e com

$$r(\beta) = \frac{n[1 - n^2(\text{sen } \beta)^2]^{1/2} - \cos \beta}{n[1 - n^2(\text{sen } \beta)^2]^{1/2} + \cos \beta}, \quad (2.13)$$

representando a refletividade da face 2, onde

$$\beta = \alpha - \gamma, \quad (2.14)$$

$$\gamma = \text{sen}^{-1}\left(\frac{\text{sen } \theta}{n}\right). \quad (2.15)$$

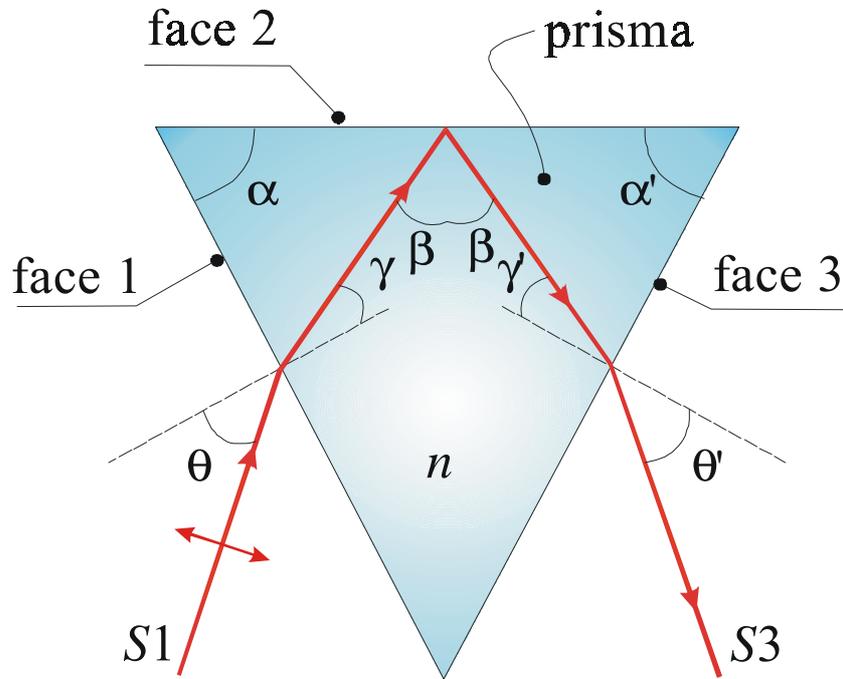


Fig 2.6. Diagrama do caminho do feixe de luz no interior do prisma. Algumas reflexões foram omitidas para simplificar o diagrama.

A Eq.(2.14) é obtida diretamente da geometria da Fig.2.6 a Eq.(2.15) representa a lei de Snell da refração do feixe S1 na face 1.

A refletância dada pela Eq.(2.13) tem duas regiões características importantes em torno do ângulo de Brewster e do ângulo crítico associados ao feixe incidente na face 2. É importante observar que as localizações desses parâmetros são sensíveis aos valores de  $n$  e  $\alpha$ , de acordo com as Eqs.(2.14) e (2.15). Uma vez que o prisma estudado nos experimentos é equilátero satisfazendo a  $\alpha' \approx \alpha$ , e dado que a função  $T(x)$  tem um valor praticamente unitário que pouco varia com o argumento  $x$ , os cálculos podem ser simplificados assumindo-se a condição  $\theta' \approx \theta$ . Nessa aproximação a Eq.(2.11) pode ser posta na forma

$$R = |T(\theta)r(\beta)|^2. \quad (2.16)$$

Um gráfico de  $R(\theta)$  está ilustrado na Fig.2.7 para  $n= 1,52$  e  $\alpha=60^0$  . Nele é possível identificar o ângulo crítico  $\theta_c$  a partir do qual ocorre reflexão interna total na face superior do prisma e o ângulo de Brewster  $\theta_B$  no qual ocorre transmissão total nessa face.

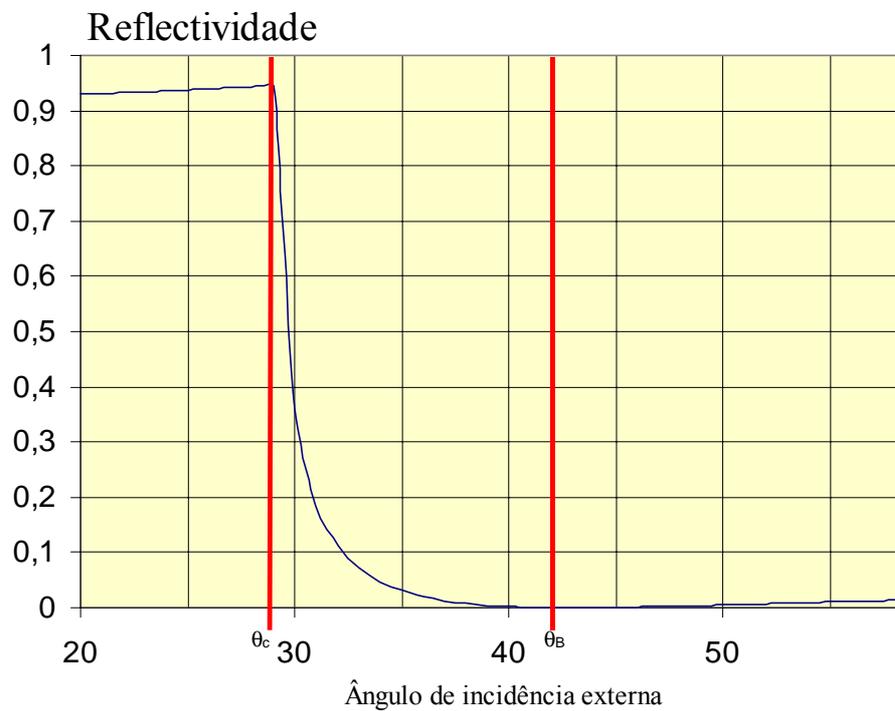


Fig.2.7 Curva teórica da reflectância para  $\alpha=\alpha'=60^0$  e  $n=1,52$ .

Mostraremos a seguir dois métodos alternativos para obtenção dos parâmetros  $n$  e  $\alpha$ . O primeiro método utiliza a medição da reflectância para extração dos parâmetros a partir do método das correção diferenciais. O segundo, que denominamos de método algébrico permite obter esses parâmetros a partir da medição precisa dos ângulos  $\theta_C$  e  $\theta_B$ .

## 2.6 Método das Correções Diferenciais

O método das correções diferenciais permite ajustar os parâmetros característicos do prisma,  $n$  e  $\alpha$ , até que eles atinjam valores que minimizem o erro médio quadrático entre as curva teórica e experimental. Esse método é uma extensão do método dos mínimos quadráticos para mais de um parâmetro. Nele os  $N$  valores medidos da reflectância  $S_3/S_2$ , representados pelos pontos experimentais  $(\theta_i, Y_i)$ ,  $i \in \{1, N\}$  são utilizados para o ajuste dos parâmetros  $n$  e  $\alpha$  da reflectância  $R_i \equiv R(n, \alpha, \theta_i)$  de forma a minimizar o erro quadrático,

$$\xi \equiv \sum_{i=1}^N (Y_i - R_i)^2 . \quad (2.17)$$

A minimização da Eq.(2.17) fornece o sistema de duas equações[25]

$$\sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial R_i}{\partial n} \right)^2 \Delta n + \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial R_i}{\partial n} \right) \left( \frac{\partial R_i}{\partial \alpha} \right) \Delta \alpha = - \sum_{i=1}^N (R_i - Y_i) \left( \frac{\partial R_i}{\partial n} \right) , \quad (2.18)$$

$$\sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial R_i}{\partial n} \right) \left( \frac{\partial R_i}{\partial \alpha} \right) \Delta n + \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial R_i}{\partial \alpha} \right)^2 \Delta \alpha = - \sum_{i=1}^N (R_i - Y_i) \left( \frac{\partial R_i}{\partial \alpha} \right) . \quad (2.19)$$

Nessas expressões  $\Delta n$  e  $\Delta \alpha$  representam as correções diferenciais nos parâmetros  $n$  e  $\alpha$  a partir de estimativas iniciais para esses parâmetros.

Um procedimento iterativo foi implementado no ambiente Mathcad para o cálculo das soluções das Eqs.(2.18) e (2.19) a partir de estimativas iniciais do ângulo interno e índice de refração do prisma, obtidos das especificações do fabricante. O procedimento de iteração é interrompido quando as correções tornam-se inferiores ao parâmetro de erro definido no programa, cujo código está mostrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 Procedimento de interação pelo método das correções diferenciais

$$\begin{array}{l}
 X0(a, b) := \left[ \begin{array}{l}
 \delta \leftarrow \begin{pmatrix} 2 \\ 20 \end{pmatrix} \\
 x \leftarrow \begin{pmatrix} a \\ b \end{pmatrix} \\
 \text{while } |\delta_0| > 0.001 \\
 \quad \text{while } |\delta_1| > 0.001 \\
 \quad \quad \left[ \begin{array}{l}
 \delta \leftarrow A(x_0, x_1)^{-1} \cdot \begin{bmatrix} \sum_{i=0}^{N-1} (f2(x_0, x_1, m_i, 0) - m_{i,1}) \cdot \frac{f2(x_0 + d, x_1, m_i, 0) - f2(x_0, x_1, m_i, 0)}{d} \\ \sum_{i=0}^{N-1} (f2(x_0, x_1, m_i, 0) - m_{i,1}) \cdot \frac{f2(x_0, x_1 + d, m_i, 0) - f2(x_0, x_1, m_i, 0)}{d} \end{bmatrix} \\
 x \leftarrow x + \delta
 \end{array} \right. \\
 x
 \end{array} \right. \\
 \\
 A(a, b) := \begin{pmatrix} dAA(a, b) & dAB(a, b) \\ dAB(a, b) & dBB(a, b) \end{pmatrix}
 \end{array}$$

O gráfico da Fig.2.8 ilustra a comparação entre a curva medida experimentalmente e aquela obtida após o ajuste de parâmetros pelo método das correções diferenciais. Os dados experimentais antes de serem processados pelo método tiveram de ser corrigidos quanto a possíveis fontes de erros. Uma delas é proveniente de o feixe gaussiano do laser de HeNe ter uma pequena divergência angular, o que fornece uma contribuição não nula para a reflectância no ângulo de Brewster. Duas outras fontes são uma componente não nula de polarização na direção perpendicular ao plano de incidência devido a não perfeição do polarizador, e a corrente não nula de escuro do fotodetector. Esse efeito foi corrigido, subtraindo a reflectância residual observada na posição de reflectância mínima. Após o tratamento dos dados, o programa ajusta a curva e fornece os parâmetros procurados. Para essa curva foram obtidos  $n=1,515$  e  $\alpha=59,89^\circ$ . A Fig.2.9 ilustra em mais detalhe a Fig.2.8 na região em torno do ângulo de Brewster.

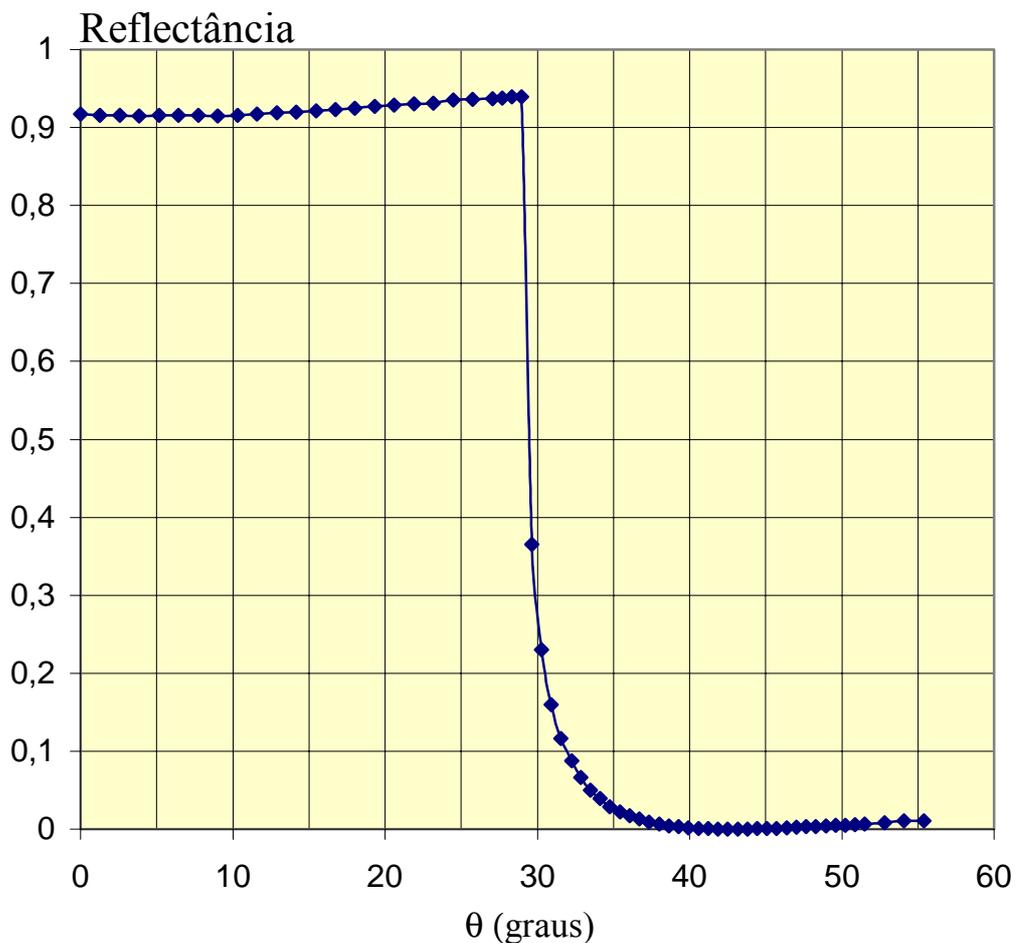


Fig.2.8. Dependência angular da função reflectância (linha sólida) após o ajuste aos pontos medidos experimentalmente (losangulos) para  $n = 1.515$  e  $\alpha = 59.89$ .

Um exame de ambas as figuras ilustra o excelente grau de ajuste entre a curva teórica e os pontos experimentais. Vale observar que para essas medidas os valores de reflectância foram obtidos a intervalos regulares espaçados de cerca de  $0,644^\circ$ .

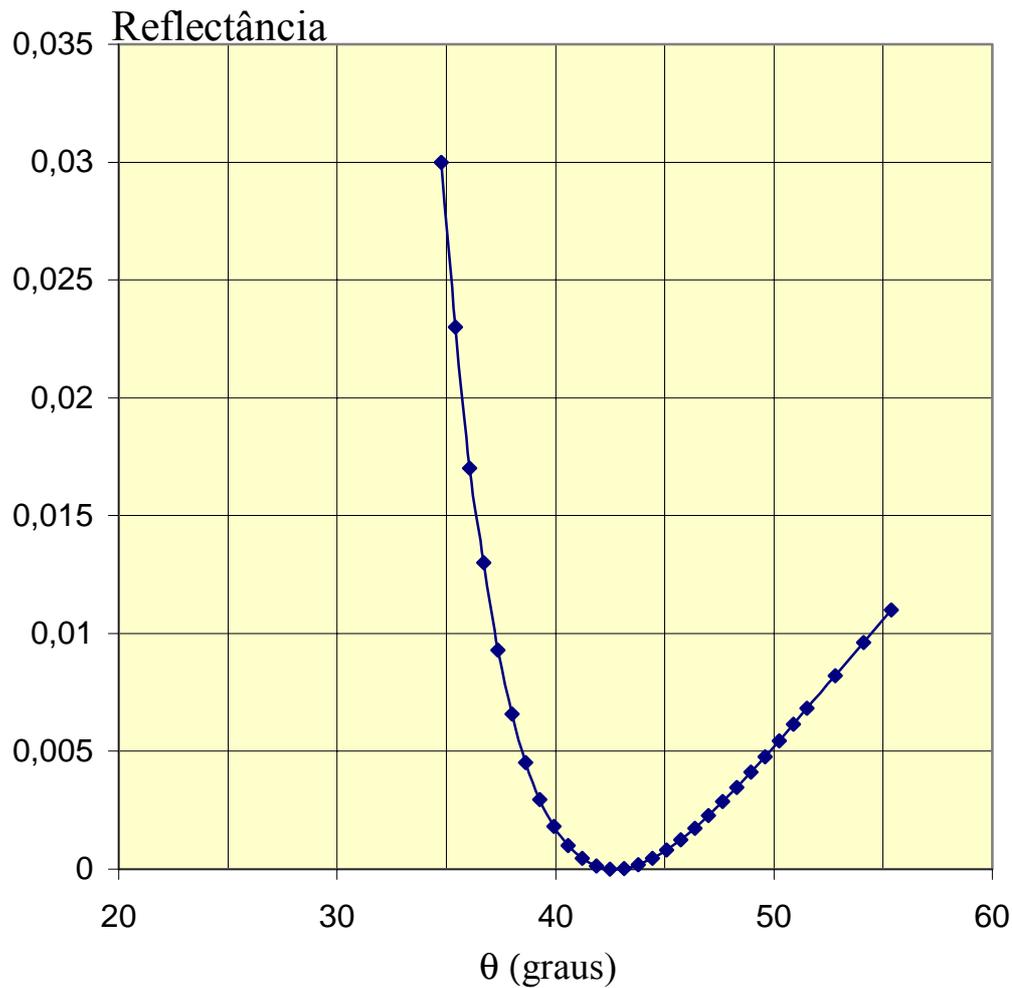


Fig.2.9 Detalhamento das curvas da Fig.2.8 na região em torno do ângulo de Brewster.

## 2.7 Método Algébrico

O método algébrico é uma forma alternativa de determinar o índice de refração e o ângulo interno do prisma. Nessa técnica é necessário obter com precisão o ângulo de Brewster e o ângulo crítico da curva de reflectância e a partir desses valores determinar os dois parâmetros de interesse. No entanto o problema não tem uma solução analítica fechada devido a interdependência dos parâmetros, imposta pela refração na face 1 do prisma. Para obtenção dos parâmetros considere-se a Eq.(2.14). Tomando a função seno em ambos os lados desta equação e utilizando a relação trigonométrica podemos expressá-la na forma

$$\text{sen } \alpha = \frac{1}{n} \left\{ \text{sen } \beta \left[ n^2 - (\text{sen } \theta)^2 \right]^{1/2} + \text{sen } \theta \cos \beta \right\}. \quad (2.20)$$

Na condição de ângulo crítico, observada experimentalmente para  $\theta = \theta_c$ , tem-se  $\beta = \beta_c$  logo pela lei de Snell

$$\text{sen } \beta_c = 1/n, \quad (2.21)$$

e a Eq.(2.20) fornece  $\text{sen } \alpha \equiv f(n)$ , onde

$$f(n) = \frac{1}{n^2} \left\{ \left[ n^2 - (\text{sen } \theta_c)^2 \right]^{1/2} + \text{sen } \theta_c (n^2 - 1)^{1/2} \right\}. \quad (2.22)$$

Por outro lado no ângulo de Brewster, observado experimentalmente para  $\theta = \theta_B$ , tem-se  $\beta = \beta_B$  com

$$\text{sen } \beta_B = \frac{1}{(n^2 + 1)^{1/2}}, \quad (2.23)$$

$$\cos \beta_B = \frac{n}{(n^2 + 1)^{1/2}}, \quad (2.24)$$

e a Eq.(2.20) fornece  $\text{sen } \alpha \equiv g(n)$  onde

$$g(n) = \frac{1}{(n^2 + 1)^{1/2}} \left\{ \text{sen } \theta_B + \frac{\left[ n^2 - (\text{sen } \theta_B)^2 \right]^{1/2}}{n} \right\}. \quad (2.25)$$

Um procedimento numérico foi implementado com o emprego da função embutida root no ambiente Mathcad para determinação da raiz da equação  $f(n) - g(n) = 0$ , a partir do valor de  $n$  especificado pelo fabricante. Obtido o valor de  $n$

a Eq.(2.22) ou a Eq.(2.25) é utilizada para obtenção de  $\alpha$ . A Fig.2.10 ilustra as dependências em  $n$  das funções  $f$  e  $g$ , para um dado par de valores  $\theta_c$  e  $\theta_B$ , obtidos experimentalmente. Como podemos observar, para uma faixa de valores de índice de refração fisicamente realizável há apenas uma interseção entre as duas curvas, não havendo portanto ambigüidade na solução.

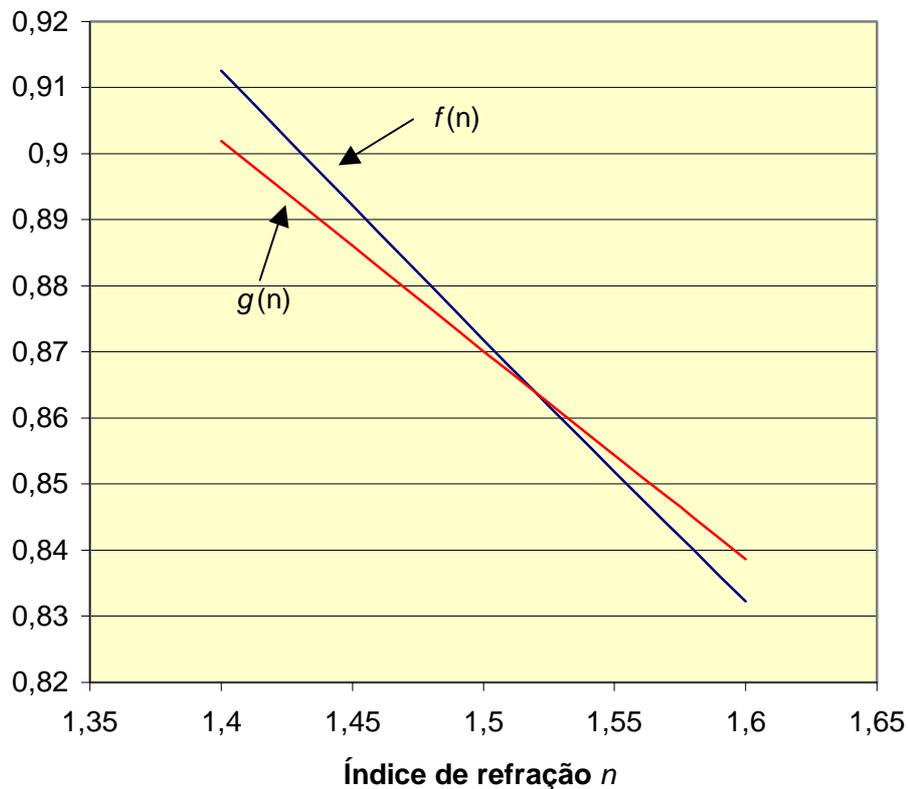


Fig.2.10 Curva de intersecção das funções  $f(n)$  e  $g(n)$  para  $\theta_c = 29,02$  e  $\theta_B = 42,54$ .

A determinação precisa dos parâmetros  $\theta_c$  e  $\theta_B$  não é tão direta. Na região em torno do ângulo crítico, a mudança de declividade da curva de reflectância não é tão abrupta conforme previsto teoricamente devido a pequena divergência do feixe gaussiano do laser. Dessa forma a função exibe um “joelho” que torna difícil a determinação da localização exata do ângulo  $\theta_c$ . Devido a isso utilizou-se uma função

de interpolação do aplicativo do Mathcad para representar a função reflectância em torno do ângulo crítico. A partir da interseção das duas retas tangentes às regiões antes e depois do ângulo crítico o ângulo  $\theta_c$  foi obtido. Esse procedimento está ilustrado na Fig.2.11.

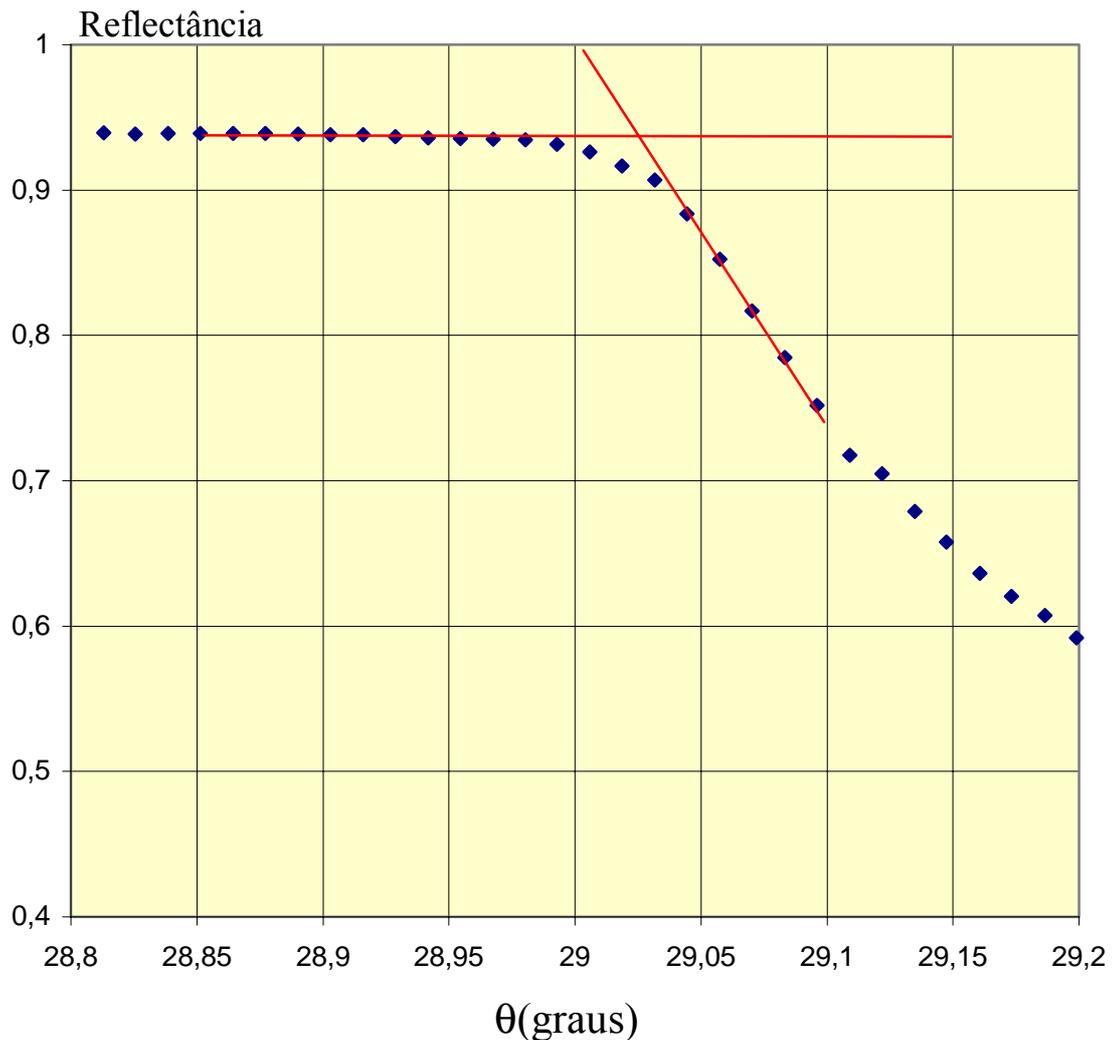


Fig.2.11 Região em torno do ângulo crítico da curva de reflectância.

Na região do ângulo de Brewster o ponto mínimo tem também uma incerteza, conforme ilustrado na Fig.2.12. Assim implementamos também um procedimento de interpolação com uma função *spline* do *Mathcad* para a partir dela determinar o ponto de mínimo  $\theta_B$  com melhor precisão.

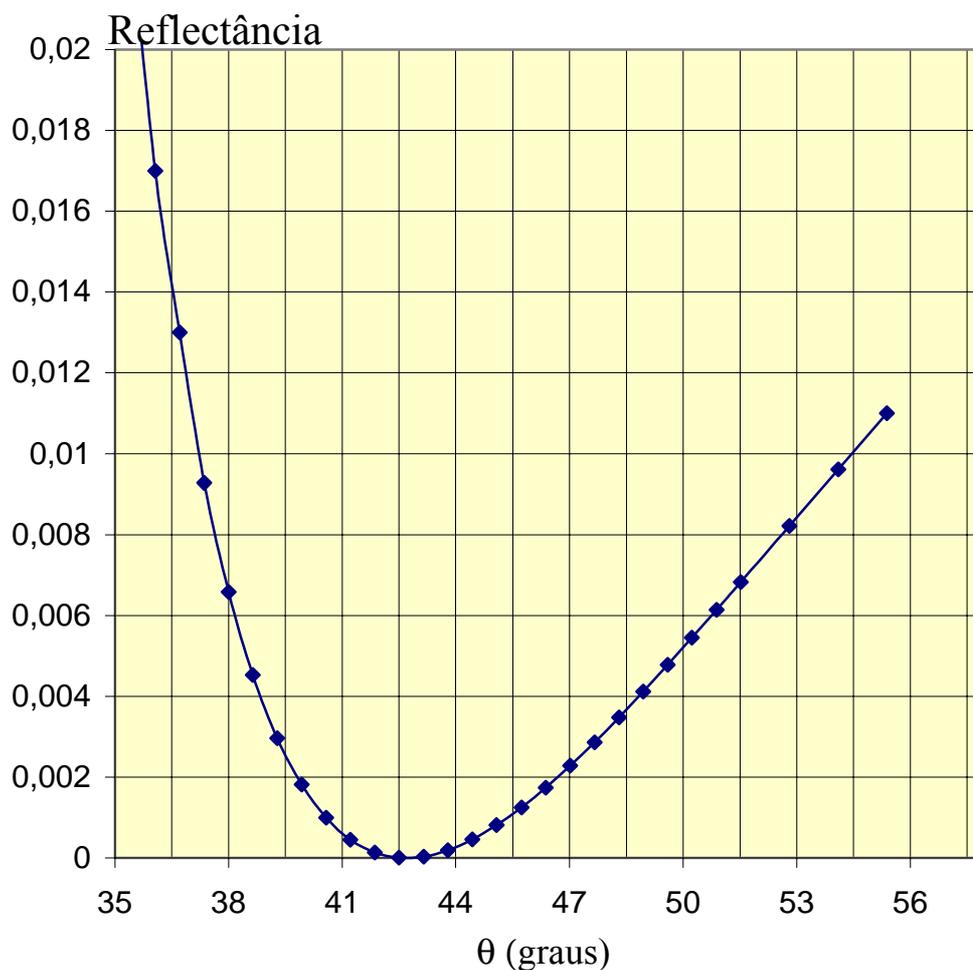


Fig.2.12. Interpolação da reflectância em torno do ângulo de Brewster através da função *Spline* do Mathcad.

## 2.8 Resultados e Discussão

Foram realizadas várias seqüências de medidas de reflectância utilizando a montagem da Fig.2.3. Os resultados obtidos foram analisados através do método das correções diferenciais e pelo método algébrico. Para o método algébrico foram realizadas medidas com duas resoluções angulares para verificação do efeito na precisão dos resultados. A Tabela 2.3 apresenta um conjunto de três resultados obtidos experimentalmente e os valores nominais fornecidos pelo fabricante. A resolução angular entre os pontos para o método das correções diferenciais e para o método algébrico I é 0.644 Graus, e para o método algébrico II é 0,01288 graus.

Tabela 2.3 Resumo dos resultados experimentais

Parâmetro	A	B	C	D
$n$	1,515±0,001	1,516±0,005	1,52±0,05	1,512±0,005
$\alpha$	60 <sup>0</sup> ±0,05 <sup>0</sup>	59,9 <sup>0</sup> ±0,1 <sup>0</sup>	60 <sup>0</sup> ±2 <sup>0</sup>	60 <sup>0</sup> ±0,2 <sup>0</sup>

A- Especificação do fabricante, B- Método das correções diferenciais, C-Método algébrico I, D- Método algébrico II.

Na Tabela 2.3 pode-se perceber uma maior incerteza usando o método algébrico I justamente pela dificuldade de determinação precisa dos ângulos  $\theta_c$  e  $\theta_B$ . Para uma menor resolução, como no método algébrico II, a precisão da medida melhorou sensivelmente. Outro fator importante a ser observado é a incerteza obtida com o método da correção diferencial que foi de aproximadamente  $\Delta n/n \approx 5 \times 10^{-3}$  mesmo com o emprego de uma resolução da ordem de  $\Delta\theta = 0,6^\circ \approx 10^{-2}$  rad. De acordo com as Eqs.(2.8) e (2.9) a resolução angular forneceria uma incerteza  $\Delta n/n \approx 1,3 \times 10^{-2}$  se a medida fosse realizada através do método do desvio mínimo. Isso indica que a medição da curva de reflectância e extração dos parâmetros pelo método das correções diferenciais resulta em uma precisão cerca de 4 vezes maior em relação àquela obtida com o método do desvio mínimo.

## 2.9 Conclusões e Perspectivas

Nesse capítulo apresentamos a montagem de um reflectômetro e o seu uso na medição do índice de refração e do ângulo interno de materiais em formato prismático. A proposta dessa montagem é apresentar uma forma alternativa e simples para determinação desses parâmetros, bem como realizar a etapa inicial de investigação do fenômeno de RPS. Nessa montagem foi possível constatar as dificuldades de realização desse tipo de medida e propor duas técnicas alternativas para determinar os parâmetros envolvidos. A precisão dos valores medidos foi comparável ou melhor do que aquele obtido através de técnicas convencionais.

### 3. Plásmons de Superfície

#### 3.1 Introdução

Plásmons de superfície (PS) são oscilações eletromagnéticas confinadas à interface entre um metal e um meio transparente. A primeira observação do efeito de **Ressonância de Plásmons de Superfície (RPS)** foi realizada por Turbadar [14] em filmes de prata. O autor, no entanto, não atribuiu o efeito à existência de uma oscilação confinada à superfície do metal. A excitação de plásmons de superfície foi primeiro reconhecida por Otto [5], que propôs o acoplamento de luz à oscilação através de um prisma de vidro com uma das faces separada da superfície metálica de uma distância da ordem de um comprimento de onda. Outra proposta de observação do efeito foi sugerida por Kretschmann [6], que utilizou um prisma de acoplamento com uma face coberta com um filme fino de prata.

Neste capítulo apresentamos um estudo detalhado de como se manifesta a oscilação de plásmom de superfície em metais, que é o efeito fundamental investigado neste trabalho.

#### 3.2 Modelo Clássico da Resposta em Frequência da Permissividade Elétrica de Meios Materiais

Compreender o princípio de interação da luz com a matéria é fundamental para o entendimento de diversos fenômenos físicos como a reflexão, a transmissão e a propagação da luz em meios materiais. Aqui, apresentamos o modelo clássico proposto por Drude-Lorentz [15] que considera a matéria do ponto de vista elétrico como formada por cargas livres e cargas ligadas. Com base nesse modelo é possível determinar a permissividade elétrica  $\epsilon(\omega)$  ou alternativamente a condutividade elétrica  $\sigma(\omega)$ . Inicialmente, iremos modelar o meio material [16], como formado por um mar de átomos, cuja distribuição de cargas está ilustrada na Fig.3.1 e sujeitos a aplicação de um campo elétrico externo  $\vec{E}^{\text{ext}}$ . Assume-se que cada átomo seja composto por um núcleo de

massa  $M$  e carga  $Zq$  e por  $Z$  elétrons, cada um com carga  $-q$  e massa  $m$ , com alguns desses elétrons podendo ser livres ou ligados ao núcleo do átomo. O vetor posição da  $i$ -ésima carga do sistema pode ser posto na forma

$$\vec{R}_i = \vec{R}_{eqi} + \vec{r}_i, \quad (3.1)$$

onde  $i = 0, 1, 2, \dots, Z$ ,  $\vec{R}_i$  é o vetor posição da  $i$ -ésima carga, com posição de equilíbrio  $\vec{R}_{eqi}$ , deslocamento relativo  $\vec{r}_i$ , com  $i=0$  representando o índice associado ao núcleo e os  $Z$  índices restantes associados aos elétrons do átomo.

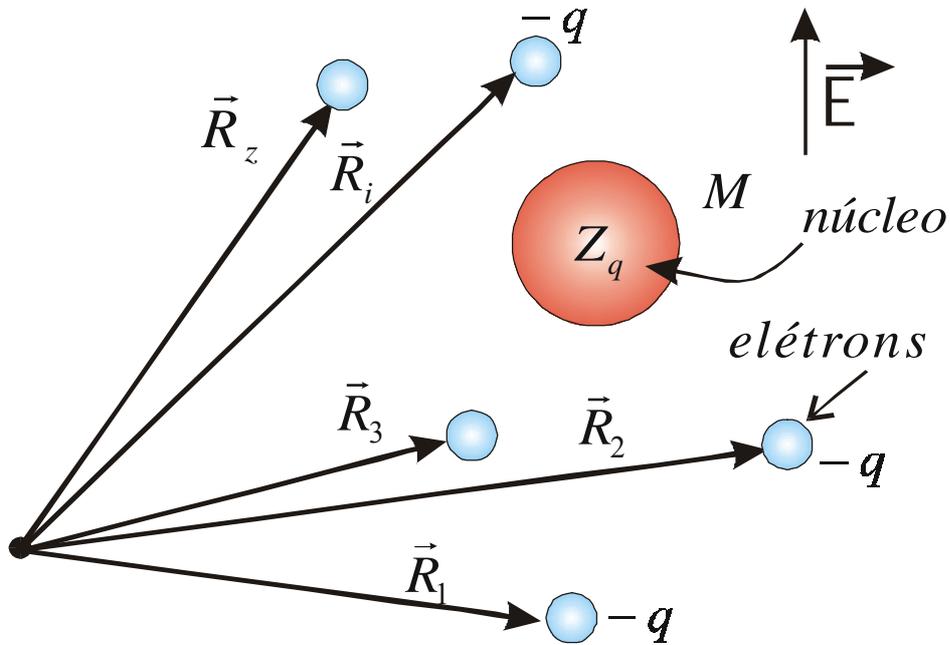


Fig.3.1 Distribuição de cargas em um átomo sob a ação de um campo elétrico externo.

Para um conjunto de cargas discretas como ilustrado na Fig.3.1 o momento de dipolo elétrico é da forma

$$\vec{p} = \sum_{i=0}^Z q_i \vec{R}_i. \quad (3.2)$$

Considerando que cada átomo do material seja não-polar, na ausência de um campo elétrico externo  $\vec{p} = 0$ . Sob essa condição, utilizando a Eq.(3.1) com  $\vec{r}_i = \vec{0}$  na Eq.(3.2), temos

$$0 = Zq\vec{R}_{eq0} - \sum_{i=1}^Z q\vec{R}_{eqi},$$

ou equivalentemente

$$\vec{R}_{eq0} = \frac{1}{Z} \sum_{i=1}^Z \vec{R}_{eqi}. \quad (3.3)$$

Aplicando-se um campo elétrico na direção  $x$ , da forma,

$$\vec{E} = E_x \hat{a}_x \quad (3.4)$$

e admitindo-se que o sistema de átomos seja isotrópico, a equação de movimento para cada carga do sistema pode ser posta na forma[15]

$$m_i \ddot{\vec{R}}_i = q_i \vec{E} - m_i \gamma_i \dot{\vec{R}}_i - m_i \omega_i^2 (\vec{R}_i - \vec{R}_{eqi}), \quad (3.5)$$

onde  $m_0 = M$ ,  $m_i = m$  ( $i=1,2,\dots,Z$ ),  $q_0 = Zq$ ,  $q_i = -q$  ( $i=1,2,\dots,Z$ ) e com  $\gamma_i$  e  $\omega_i$  representando a constante de amortecimento e frequência natural de oscilação da  $i$ -ésima carga do sistema, respectivamente. Com base na Eq.(3.1) e nas relações  $\ddot{\vec{R}}_i = \ddot{\vec{r}}$  e  $\dot{\vec{R}}_i = \dot{\vec{r}}_i$ , tem-se,

$$m_i \ddot{\vec{r}}_i = q_i \vec{E} - m_i \gamma_i \dot{\vec{r}}_i - m_i \omega_i^2 \vec{r}_i. \quad (3.6)$$

Definindo  $\vec{r}_i = (x_i, y_i, z_i)$ , a Eq.(3.6) gera as três equações diferenciais

$$\ddot{x}_i = \frac{q_i}{m_i} E_x - \gamma_i \dot{x}_i - \omega_i^2 x_i, \quad (3.7)$$

$$\ddot{y}_i = -\gamma_i \dot{y}_i - \omega_i^2 y_i, \quad (3.8)$$

$$\ddot{z}_i = -\gamma_i \dot{z}_i - \omega_i^2 z_i. \quad (3.9)$$

As Eqs.(3.8) e (3.9) exibem a forma geral

$$S'' + \gamma_i S' + \omega_i^2 S = 0, \quad (3.10)$$

que para o caso  $\omega_i \gg \gamma_i$ , tem como solução geral

$$S(t) = A e^{-\gamma_i t/2} \cos(\omega_i t + \phi_i), \quad (3.11)$$

com  $A$  e  $\phi_i$  representando a amplitude e fase, determinadas a partir da condição inicial para a função  $S$ . Esse último resultado mostra que na ausência de um campo elétrico aplicado nas direções  $y$  e  $z$ , as componentes de deslocamento representadas por  $S(t)$  tendem ao valor de equilíbrio nulo. Assumindo-se que o campo externo seja senoidal na frequência  $\omega$ , i.e.,

$$E_x = \text{Re}(E_x e^{j\omega t}), \quad (3.12)$$

no regime permanente senoidal, tem-se

$$x_i = \text{Re}(X_i e^{j\omega t}), \quad (3.13a)$$

$$y_i = z_i = 0. \quad (3.13b)$$

Substituindo-se as Eqs.(3.12) e (3.13a) na Eq.(3.7) resulta em

$$X_i = \frac{q_i / m_i}{(\omega_i^2 - \omega^2) + j\omega\gamma_i} E_x. \quad (3.14)$$

Com base na Eq.(3.2) e Eq.(3.3), o momento de dipolo do átomo pode ser posto na forma

$$\vec{p} = Zq\vec{r}_0 - \sum_{i=1}^Z q\vec{r}_i. \quad (3.15)$$

No regime permanente, as componentes do momento de dipolo induzido pelo campo externo são dadas por  $p_x = \text{Re}(p_x e^{j\omega t})$ ,  $p_y = 0$ ,  $p_z = 0$ , e usando as Eqs.(3.14) e (3.15) obtém-se

$$p_x = \left( \frac{(Zq)^2 / M}{(\omega_0^2 - \omega^2) + j\omega\gamma_0} + \sum_{i=1}^Z \frac{q^2 / m_i}{(\omega_i^2 - \omega^2) + j\omega\gamma_i} \right) E_x. \quad (3.16)$$

Admitindo-se que haja  $N$  átomos por unidade de volume, o vetor polarização em regime permanente pode ser escrito na forma

$$\vec{P} = N\vec{p}. \quad (3.17)$$

Utilizando-se a Eq.(3.17) na relação constitutiva

$$\vec{D} = \epsilon\vec{E} = \epsilon_0\vec{E} + \vec{P} \quad (3.18)$$

obtém-se

$$\frac{\epsilon}{\epsilon_0} = 1 + \frac{N(Zq)^2 / M\epsilon_0}{(\omega_0^2 - \omega^2) + j\omega\gamma_0} + \sum_{i=1}^Z \frac{Nq^2 / m_i\epsilon_0}{(\omega_i^2 - \omega^2) + j\omega\gamma_i}. \quad (3.19)$$

Consideremos que em cada átomo do material existam  $K$  grupos de elétrons, com cada grupo composto de  $f_j$  elétrons exibindo mesma frequência natural  $\omega_j$  e constante de amortecimento  $\gamma_j$ . Nessas condições,

$$\sum_{j=1}^K f_j = Z$$

e a Eq.(3.19) pode ser escrita na forma

$$\varepsilon_r \equiv \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} = 1 + \frac{\Omega_0^2}{(\omega_0^2 - \omega^2) + j\omega\gamma_0} + \sum_{j=1}^K \frac{\Omega_j^2}{(\omega_j^2 - \omega^2) + j\omega\gamma_j}, \quad (3.20)$$

com

$$\Omega_0^2 \equiv \frac{N(Zq)^2}{M\varepsilon_0}, \quad (3.21)$$

$$\Omega_j^2 \equiv \frac{f_j Nq^2}{m\varepsilon_0}. \quad (3.22)$$

Para o caso de metais, admite-se que o  $K$ -ésimo grupo de elétrons seja composto de cargas livres com constante de amortecimento  $\gamma_K$ , e com frequência de ressonância  $\omega_K = 0$ . Considerando que a frequência de ressonância  $\omega_0$  do núcleo do átomo ocorre geralmente em baixas frequências, na região espectral que vai do infravermelho até o ultravioleta tem-se  $\omega \gg \omega_0$ . Estando as frequências de ressonância de elétrons ligados geralmente localizadas na região do ultravioleta distante, tal que  $\omega_j \gg \omega$ , a Eq.(3.20) pode ser simplificada para a forma

$$\varepsilon_r = \varepsilon_{r0} - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - j\omega\gamma_K}, \quad (3.23)$$

onde

$$\varepsilon_{r0} \equiv 1 - \frac{\Omega_0^2}{\omega^2} + \sum_{j=1}^{K-1} \frac{\Omega_j^2}{\omega_j^2} \quad (3.24)$$

representa uma permissividade relativa, associada ao *background* de contribuições do núcleo e dos elétrons ligados e que longe das ressonâncias do material varia monotonicamente com a frequência, podendo ser próxima de 1 dependendo da região espectral considerada [16]. Na Eq.(3.23) define-se a frequência de plasma, diretamente da Eq.(3.22) com  $j = K$ , ou seja,

$$\omega_p^2 \equiv \frac{f_K Nq^2}{m\varepsilon_0}. \quad (3.25)$$

Admitindo a hipótese simplificadora  $\epsilon_{r0} \approx 1$  na Eq.(3.23), válida para um gás de elétrons livres, e definindo-se  $\gamma \equiv \gamma_K$ , a permissividade relativa de metais assume a forma simples

$$\epsilon_r = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - j\omega\gamma}. \quad (3.26)$$

A permissividade relativa do material pode ser decomposta em partes real e imaginária na forma

$$\epsilon_r = \epsilon' - j\epsilon''. \quad (3.27)$$

Da Eq.(3.26), para o caso de um metal modelado como um gás de elétrons,

$$\epsilon' = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2}, \quad (3.28)$$

$$\epsilon'' = \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} \frac{\gamma}{\omega}. \quad (3.29)$$

Para o caso  $\omega \gg \gamma$ , o que é sempre satisfeito na maioria dos metais, essas expressões podem ser simplificadas para

$$\epsilon' \approx 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (3.30)$$

$$\epsilon'' = \frac{\gamma\omega_p^2}{\omega^3} \quad (3.31)$$

A Eq.(3.30) mostra que a parte real da permissividade relativa torna-se negativa para  $\omega < \omega_p$ . Essa é uma condição necessária (mas não suficiente) para observação de

oscilações de plásmons de superfície em metais, como será discutido na Seção seguinte. A frequência de plasma em metais, caracterizados por uma alta densidade de elétrons livres, situa-se geralmente na região do espectro entre o azul e o ultravioleta, como evidencia a Eq.(3.25). Para o caso real, a região de mudança de sinal da parte real da permissividade relativa de metais é influenciada pelas várias ressonâncias no material.

Os gráficos da Fig.3.2 ilustram as dependências espectrais das partes real e imaginária da permissividade de alguns metais nobres, medidas experimentalmente [17]. Como podemos observar, a parte real da permissividade desses metais é negativa na região entre o visível e o infravermelho, com o alumínio sendo o único metal exibindo  $\epsilon' < 0$  até a região do ultravioleta.

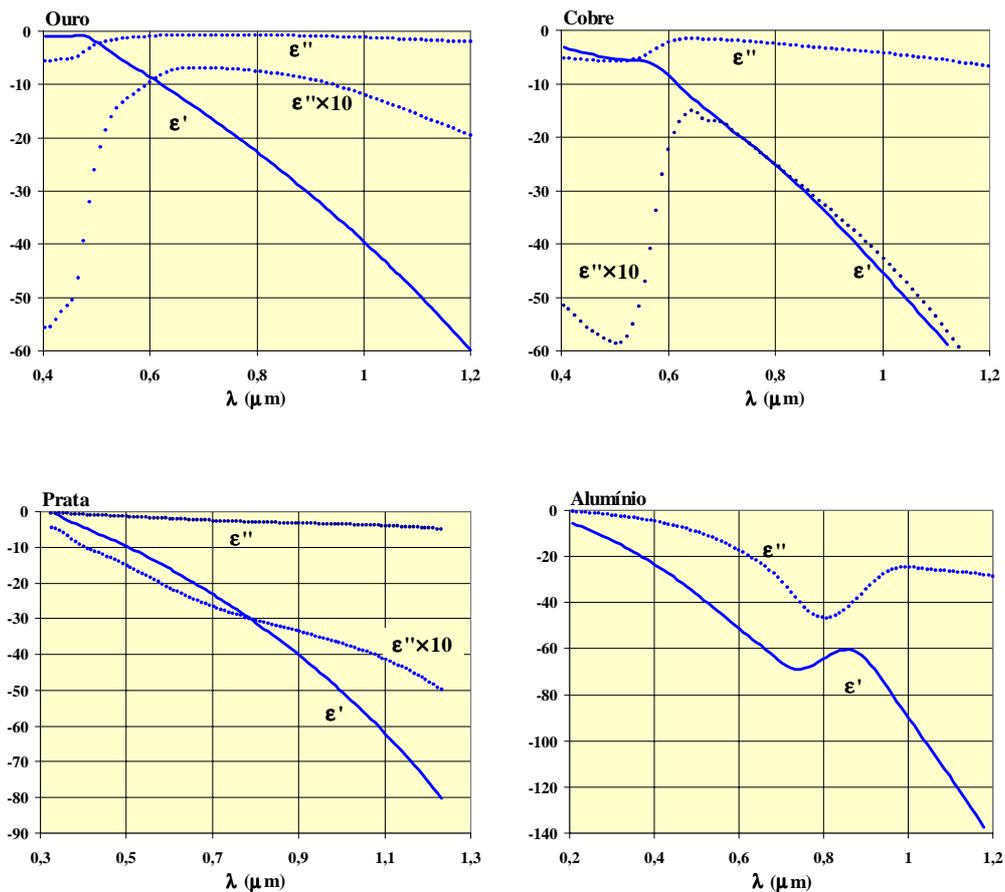


Fig.3.2 Dependência espectral das permissividades complexas dos metais ouro, cobre, prata e alumínio [17].

### 3.3 Condições de existência de oscilações de plásmons de superfície

Na secção anterior, foi feito um breve estudo da dependência espectral da permissividade de metais que exibem a característica principal para observação de oscilações de plásmons de superfície, qual seja, a existência de uma região espectral onde a parte real da permissividade relativa é negativa. Nesta secção aplicaremos os resultados obtidos para satisfazer as condições impostas. Para isso consideramos a interface planar entre dois meios com permissividades relativas  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$ , conforme ilustrado na Fig.3.3. Quer-se determinar a condição necessária e suficiente para existência de uma oscilação confinada à interface, característica da oscilação de plásmons de superfície. O problema pode ser modelado impondo-se a condição de inexistência de reflexão na interface, a partir da incidência de uma onda plana no meio 1, indicado na Fig.3.3 [16]. Essa inexistência de reflexão pode levar ao fenômeno de transmissão total na interface ou à existência de uma oscilação confinada à interface.

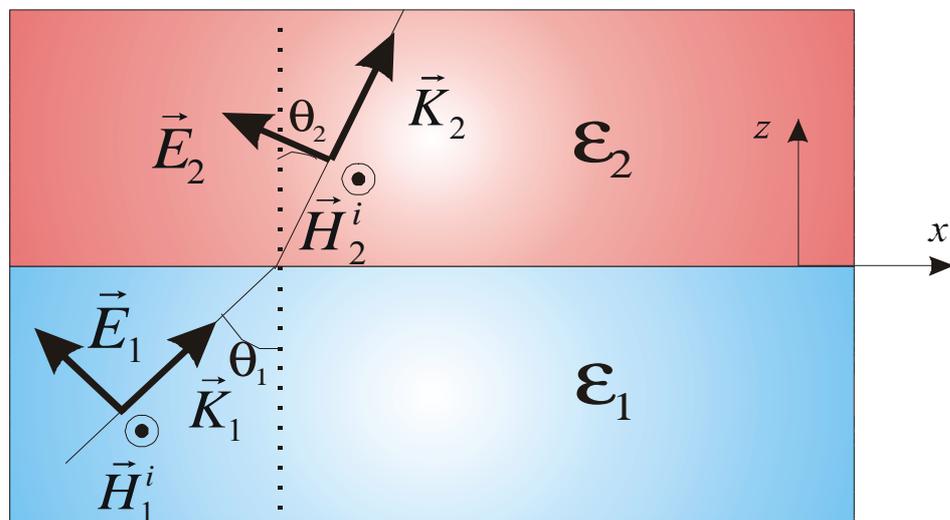


Fig.3.3. Geometria para determinação da condição de existência de uma oscilação confinada a uma interface planar.

O problema pode ser resolvido separadamente para os casos de polarização perpendicular e paralela ao plano de incidência. Os campos de uma onda plana eletromagnética podem ser expressos na forma [18],

$$\vec{E}_i = \vec{E}_i e^{-j(\vec{K}_i \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (3.32a)$$

$$H_i = \frac{(\vec{K}_i \times \vec{E}_i)}{\omega \mu_0} \quad (3.32b)$$

onde,  $\vec{K}_i$  é o vetor de onda no meio  $i$  na frequência  $\omega$  e  $\vec{r}$  é o vetor posição. No sistema de coordenadas da Fig.3.3, o vetor de onda e o vetor posição podem ser decompostos nas formas,

$$\vec{K}_i = k_x \hat{a}_x + k_i \hat{a}_z, \quad (3.33)$$

$$\vec{r} = x \hat{a}_x + z \hat{a}_z. \quad (3.34)$$

Dado que

$$K_i = k_0 \sqrt{\epsilon_i}, \quad (3.35)$$

com  $k_0 = \omega/c$ , a Eq.(3.33) fornece

$$k_x^2 + k_i^2 = k_0^2 \epsilon_i \quad (3.36)$$

Para ondas TE, definidas como tendo polarização perpendicular ao plano de incidência, os campos podem ser escritos como

**Meio 1:**

$$\vec{E}_1 = A(0,1,0)e^{-j(k_x x + k_1 z)}, \quad (3.37a)$$

$$\vec{H}_1 = \frac{\vec{K}_1 \times \vec{E}_1}{\omega \mu_0} = A(-k_1, 0, k_x)e^{-j(k_x x + k_1 z)}. \quad (3.37b)$$

#### Meio 2:

$$\vec{E}_2 = B(0,1,0)e^{-j(k_x x + k_2 z)}, \quad (3.37c)$$

$$\vec{H}_2 = \frac{\vec{K}_2 \times \vec{E}_2}{\omega \mu_0} = B(-k_2, 0, k_x)e^{-j(k_x x + k_2 z)}, \quad (3.37d)$$

onde  $A$  e  $B$  são as amplitudes dos campos elétricos nos meios 1 e 2, respectivamente. Aplicando-se as condições de contorno em  $z = 0$ , i.e.,

$$\vec{n} \times \begin{cases} \Delta \vec{E} \\ \Delta \vec{H} \end{cases} = \begin{cases} \vec{0} \\ \vec{0} \end{cases}, \quad (3.38)$$

com  $\vec{n}$  correspondendo ao vetor unitário normal à interface, obtém-se

$$A - B = 0,$$

$$-Ak_1 + Bk_2 = 0.$$

A forma matricial desse sistema de duas equações é da forma

$$\begin{pmatrix} 1 & -1 \\ -k_1 & k_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix}.$$

Para que esse sistema admita solução não trivial é necessário impor a condição

$$\det \begin{vmatrix} 1 & -1 \\ -k_1 & k_2 \end{vmatrix} = 0,$$

o que fornece  $k_1 = k_2$ . Da Eq.(3.36) essa condição só pode ser satisfeita se

$$\epsilon_1 = \epsilon_2. \quad (3.39)$$

A Eq.(3.39) implica na inexistência de meios com propriedades ópticas distintas na Fig.3.3, o que corresponde a situação trivial de propagação de uma onda TE em um meio homogêneo.

Para ondas TM, i.e., com polarização no plano de incidência, os campos podem ser expressos como

**Meio 1:**

$$\vec{E}_1 = A(-k_1, 0, k_x) e^{-j(k_x x + k_1 z)} \quad (3.40a)$$

$$\vec{H}_1 = \frac{\vec{K}_1 \times \vec{E}_1}{\omega \mu_0} = \frac{-A \epsilon_1 k_0^2}{\omega \mu_0} (0, 1, 0) e^{-j(k_x x + k_1 z)} \quad (3.40b)$$

**Meio 2:**

$$\vec{E}_2 = B(-k_2, 0, k_x) e^{-j(k_x x + k_2 z)} \quad (3.40c)$$

$$\vec{H}_2 = \frac{\vec{K}_2 \times \vec{E}_2}{\omega \mu_0} = \frac{-B \epsilon_2 k_0^2}{\omega \mu_0} (0, 1, 0) e^{-j(k_x x + k_2 z)} \quad (3.40d)$$

Aplicando-se a Eq.(3.38) na interface  $z=0$ , obtemos as relações

$$A k_1 - A k_2 = 0,$$

$$B \epsilon_1 - B \epsilon_2 = 0.$$

Em forma matricial,

$$\begin{pmatrix} k_1 & -k_2 \\ \epsilon_1 & -\epsilon_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix}.$$

Semelhantemente análise anterior, para a existência de solução não trivial impõe-se a condição

$$\det \begin{vmatrix} k_1 & -k_2 \\ \varepsilon_1 & -\varepsilon_2 \end{vmatrix} = 0,$$

o que fornece

$$\varepsilon_2 k_1 = \varepsilon_1 k_2. \quad (3.41)$$

Usando as Eq.(3.36) e Eq.(3.41) obtém-se

$$\varepsilon_2^2 (k_0^2 \varepsilon_1 - k_x^2) = \varepsilon_1^2 (k_0^2 \varepsilon_2 - k_x^2).$$

Após algumas manipulações algébricas essa última expressão pode ser posta na forma,

$$k_x = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}}. \quad (3.42)$$

Usando as Eq.(3.36) e Eq.(3.42) obtém-se

$$k_1 = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_1^2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}}, \quad (3.43)$$

$$k_2 = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_2^2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}}. \quad (3.44)$$

As Eqs.(3.42) a (3.44) expressam as condições que devem ser obedecidas para existência de transmissão total ou confinamento na interface, como examinado a seguir.

### **3.3.1. Transmissão total: ângulo de Brewster**

Consideremos a situação mais simples na qual ambos os meios sejam transparentes, exibindo assim um valor positivo da permissividade relativa. Nessas condições os parâmetros definidos pelas Eqs.(3.42) a (3.46) são todos reais e a solução do problema corresponde à transmissão total da onda incidente no meio 1 através da interface, sem ocorrência de reflexão. Essa condição ocorre para um ângulo de incidência  $\theta_1=\theta_B$  que pode ser obtido, a partir da geometria mostrada na Fig.3.3, da condição

$$tg\theta_1 = tg\theta_B = \frac{k_x}{k_1},$$

e das Eqs.(3.42) e (3.43) obtém-se

$$tg\theta_B = \sqrt{\frac{\epsilon_2}{\epsilon_1}},$$

ou equivalentemente

$$tg\theta_B = \frac{n_2}{n_1} \tag{3.45}$$

onde  $n_i$  ( $i = 1, 2$ ) é o índice de refração do meio  $i$ . A Eq.(3.45) define portanto o ângulo de Brewster para uma onda TM incidente no meio 1, que é totalmente transmitida para o meio 2.

### **3.3.2. Confinamento na interface: plásmons de superfície**

A condição obtida anteriormente não fornece uma onda confinada pois restringimos a situação para dois meios transparentes. É possível obter uma onda que seja evanescente em ambos os lados da interface e que se propague paralelamente à mesma se impormos que os parâmetros  $k_1$  e  $k_2$  sejam imaginários puros e que  $k_x$  seja um número real. Das Eqs.(3.43) e (3.44) a condição de obtermos números imaginários puros pode ser satisfeita se  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$  forem números reais tal que

$$\varepsilon_1 + \varepsilon_2 < 0. \quad (3.46)$$

O parâmetro  $k_x$  será real se além da condição expressa pela Eq.(3.46), a condição

$$\varepsilon_1 \varepsilon_2 < 0, \quad (3.47)$$

for satisfeita. Satisfazendo-se simultaneamente as Eqs.(3.46) e (3.47) obtém-se uma onda fisicamente confinada à interface escolhendo-se

$$k_1 = j\kappa_1 \quad (3.48)$$

$$k_2 = -j\kappa_2 \quad (3.49)$$

com  $\kappa_1$  e  $\kappa_2$  obtidos diretamente das Eqs.(3.43) e (3.44). Essa escolha fornece um perfil de campo exponencialmente decrescente em cada lado da interface, como pode ser examinado a partir das expressões para os campos da onda TM dados pelas Eqs.(3.40a) a (3.40d). Da análise desenvolvida na seção 3.2, essa condição pode ocorrer se um dos meios for um metal, na região de frequências  $\omega < \omega_p$ , com o outro sendo um meio transparente, tal que a Eq.(3.46) seja satisfeita. Essa oscilação confinada à interface é denominada de **plásmon de superfície**, uma vez que a resposta de metais nessa região espectral é basicamente governada pelo movimento coletivo dos elétrons livres do material.

### 3.4 Técnicas de Observação de Ressonância de Plásmons de Superfície

Os primeiros investigadores do efeito de RPS, Otto [5] e Kretschmann[6], propuseram técnicas para investigar esse fenômeno, considerando que o mesmo não pode ser observado pela incidência direta da luz. A proposta de ambos utiliza um prisma, cuja função é criar uma onda evanescente para ângulos de incidência superior ao da reflexão interna total. Nessas condições, como vimos na secção anterior, cria-se

também uma onda evanescente em um metal e sob condições de acoplamento crítico é possível transferir toda energia do feixe incidente para a oscilação conforme examinado a seguir.

### **3.4.1 Configuração de Otto**

A configuração proposta por Otto para excitação de plásmons de superfície é ilustrada na Fig.3.4. Como é possível observar nessa figura, um filme metálico é posicionado a uma certa distância  $d$  de uma das faces do prisma.

É necessário que o meio transparente entre o metal e o prisma tenha índice de refração menor que o do prisma, permitindo que a onda incidente, na face superior do prisma como ilustrado na Fig.3.4, possa sofrer reflexão interna total, criando assim uma onda evanescente no meio transparente. Sob condições críticas, quando o vetor de onda no interior do prisma dado por

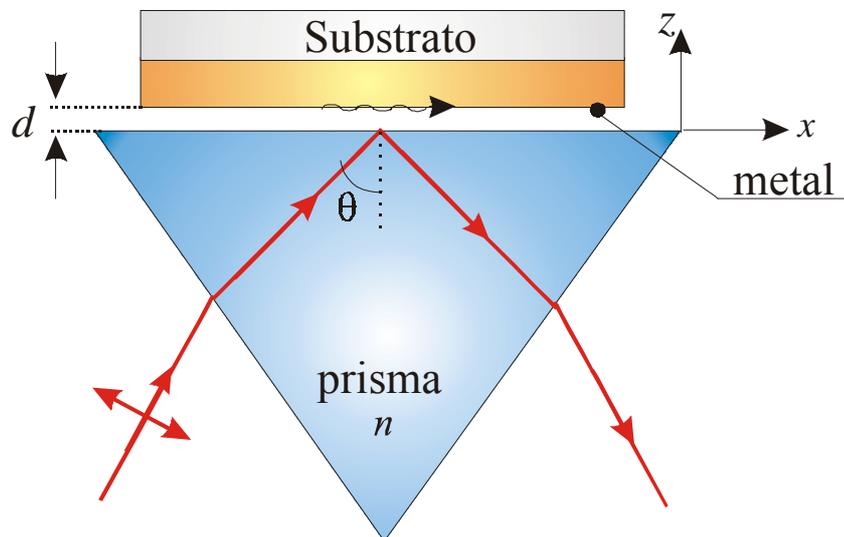


Fig.3.4. Configuração de Otto para excitação de RPS

Portanto, sob condições críticas, quando o vetor de onda no interior do prisma dado por

$$k_x = n_1 k_0 \sin \theta \quad (3.50)$$

atingir o valor  $k_x = k_{PS}$ , é possível observar uma forte absorção de luz pela oscilação.

O grau de absorção depende do espaçamento  $d$  entre o prisma e o metal, e o valor típico desse “gap” é da ordem do comprimento de onda do feixe incidente. Na Fig.3.5 são mostradas três curvas em  $\lambda=632,8\text{nm}$  teóricas para alguns valores de  $d$ , para o caso de um prisma de vidro BK7, cujas constantes ópticas estão listadas na Tabela 3.1. O cálculo foi feito com o emprego da formulação de Fresnel para reflectância de estrutura mostrada na Fig.3.4[5]

#### 3.4.2 Configuração de Kretschmann

A configuração proposta por Kretschmann ilustrada na Fig.3.6 se baseia no mesmo princípio da configuração de Otto, a diferença é que o filme metálico está em contato direto com a superfície do prisma e nessa condição uma onda evanescente é naturalmente criada quando o feixe de entrada incide na face superior do prisma a um ângulo  $\theta > \theta_c$ .

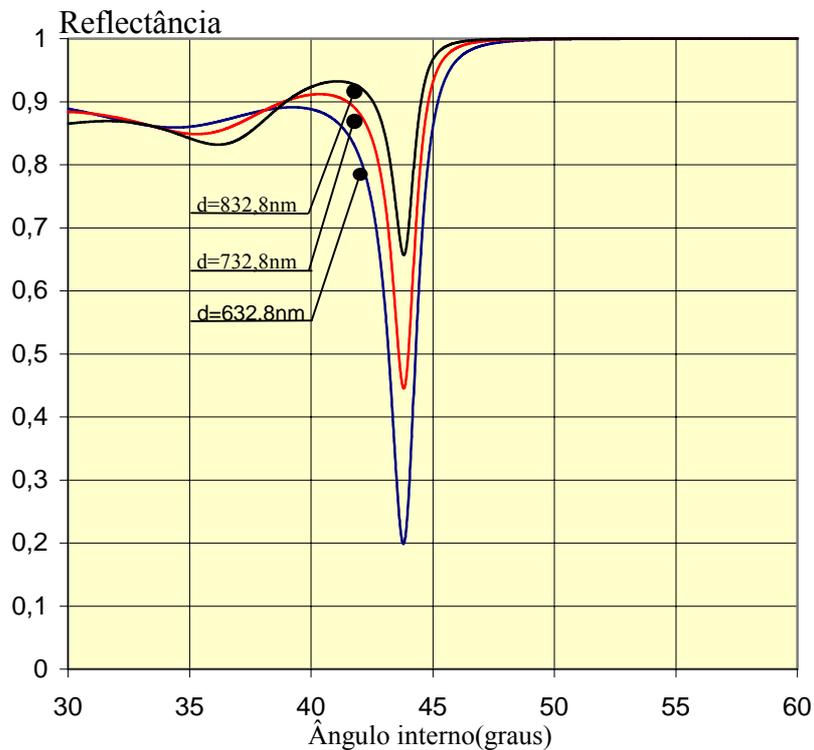


Fig.3.5 Efeito produzido pela variação da espessura da camada de ar entre o prisma e o metal na configuração de Otto, para  $\lambda=632,8\text{nm}$  e os valores de  $n$  e  $\epsilon$  listados na Tabela 3.1.

Nesse caso, a oscilação de plásmon de superfície ocorrerá na interface externa do metal. A absorção do feixe incidente é fortemente dependente da espessura  $d_k$  do metal como pode ser visualizado na Fig.3.6. Essas curvas foram calculadas para os parâmetros da Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Parâmetros ópticos utilizados nos cálculos das curvas das Figs.(3.5) e (3.7)

$\lambda(\text{nm})$	$\epsilon'$	$\epsilon''$	$n$
632,8nm	-10,333	-1,685	1,515

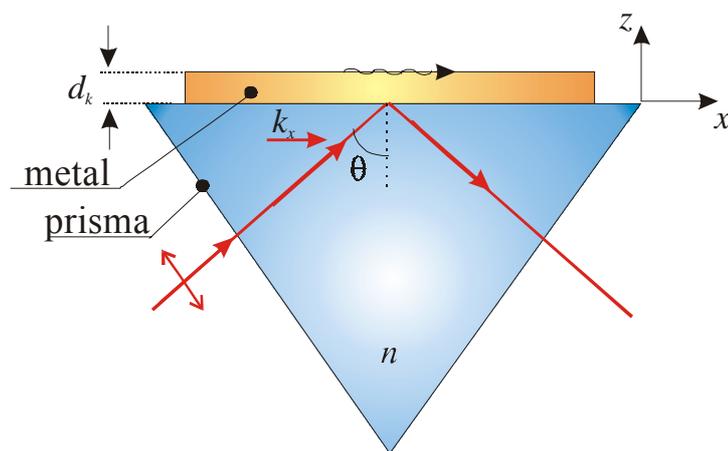


Fig.3.6 Configuração de Kretschmann para excitação de PS.

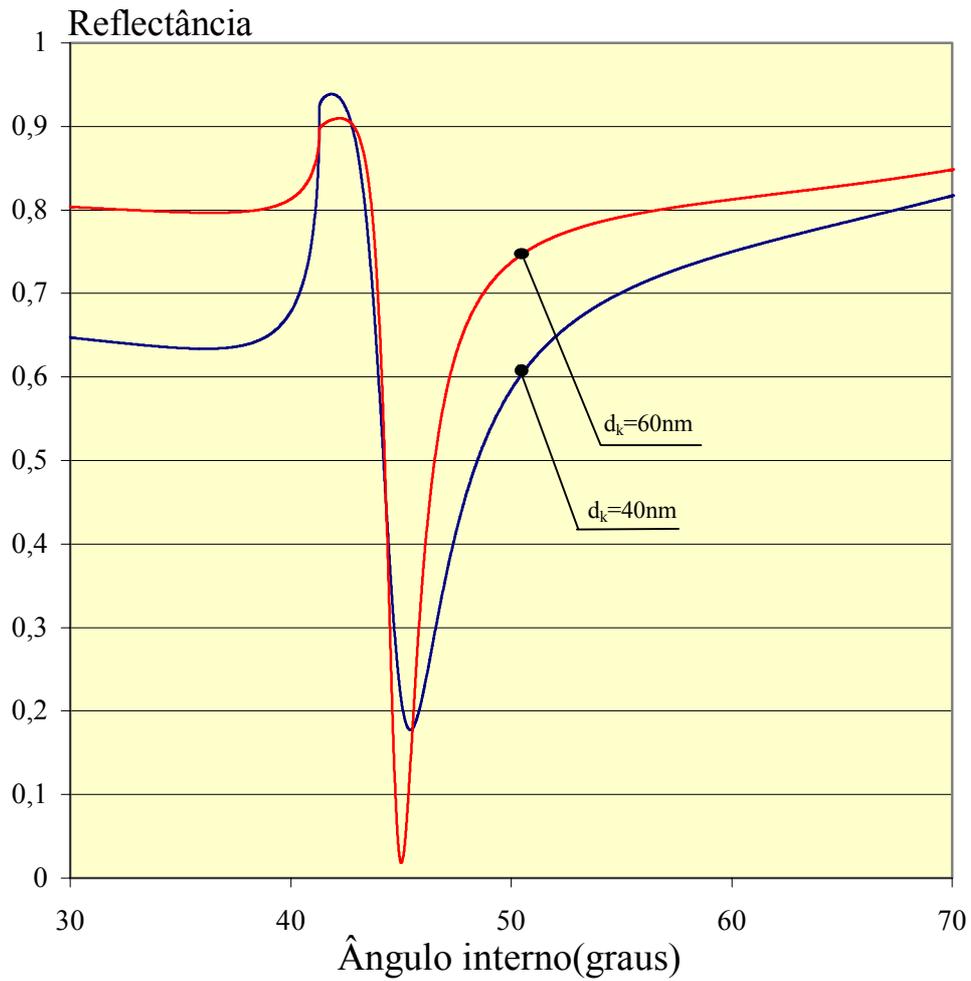


Fig.3.7 Efeito produzido pela variação do parâmetro  $d_k$  na configuração de Kretschmann em  $\lambda=632,8\text{nm}$ , com  $\epsilon$  e  $n$  listados na Tabela 3.1.

Nesta dissertação usaremos a configuração de Kretshmann para aplicação do efeito de RPS no desenvolvimento de sensores biológicos. A reflectância para essa configuração é dada por[6]

$$R = \left| \frac{r_{12} + r_{23} \exp(-2jk_2d)}{1 + r_{12}r_{23} \exp(-2jk_2d)} \right|^2, \quad (3.51)$$

onde

$$r_{12} = \frac{\epsilon_1 k_2 - \epsilon_2 k_1}{\epsilon_1 k_2 + \epsilon_2 k_1}, \quad (3.52)$$

$$r_{23} = \frac{\epsilon_2 k_3 - \epsilon_3 k_2}{\epsilon_2 k_3 + \epsilon_3 k_2}, \quad (3.53)$$

onde  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$ , representam as permissividades relativas do prisma, do metal e do meio externo, respectivamente, e  $d$  é a espessura do filme metálico.

Como podemos observar das Eqs.(3.51) a (3.53) o efeito de RPS depende dos parâmetros ópticos e estruturais dos meios envolvidos. A linha estreita de absorção ressonante mostrada na Fig.3.7 permite obter com alta precisão os parâmetros do filme metálico[2]. O fato de a absorção ressonante estar localizada numa região angular extremamente estreita permite também que o efeito seja utilizado para detectar pequenas variações da permissividade do meio externo, princípio básico utilizado no desenvolvimento de sensores biológicos baseados em RPS.

# 4. Princípios de Imunologia e o Emprego de RPS na Detecção da Reação Antígeno-Anticorpo

## 4.1 Introdução

O estudo das reações imunológicas vem cada vez mais contribuindo para o desenvolvimento das ciências biológicas. As descobertas de agentes causadores de doenças e a criação de novas vacinas têm evitado muitas catástrofes. As técnicas de observação e diagnóstico têm evoluído bastante. Contudo essas inovações vêm acompanhadas de encargos que tornam os exames laboratoriais muito caros. As técnicas ELISA(Enzyme-Linked-Immunosobent Assay) e RIA(Radioimunoensaio) são muito usadas no estudo dessas reações e têm sido as responsáveis pela maioria dos diagnósticos fornecidos pelos laboratórios nesses últimos anos [19]. Neste capítulo tratamos de alguns princípios básicos de imunologia e descrevemos brevemente as técnicas comumente usadas para caracterizar reações entre macromoléculas biológicas. No final do capítulo mostramos qualitativamente como o efeito de RPS é utilizado para monitorar a dinâmica de reações antígeno-anticorpo [20].

## 4.2 Princípios Básicos de Imunologia

O termo latim *immunis* significa encargos e nos leva ao termo imunidade. Na biologia, o encargo é a doença causada por uma variedade de vírus, fungos, bactérias, protozoários, etc. Historicamente o conceito de imunologia começou a se desenvolver no início do século dezoito e sua origem tem sido atribuída usualmente a Edward Jenner, que descobriu em 1776 que a vacina ou *cowpox* induzia proteção contra a varíola humana, uma doença geralmente fatal [19]. Jenner deu ao seu processo o nome de vacinação, termo que ainda hoje descreve a inoculação em indivíduos sadios de amostras enfraquecidas ou atenuadas de agentes causadores de doenças, a fim de obter proteção contra a enfermidade.

Mesmo diante do sucesso experimental de Jenner, a vacinação contra a varíola levou dois séculos para tornar-se universal [19]. Esse progresso levou a Organização Mundial de Saúde em 1976 anunciar que a varíola tinha sido erradicada [19]. Quando Jenner introduziu a vacinação, ele não sabia a respeito do agente causador da varíola ou

dos princípios básicos da imunologia em geral. Apenas no século XIX que Robert Koch provou que doenças infecciosas eram causadas por microorganismos patogênicos, cada um deles responsável por uma determinada enfermidade ou patologia [19].

Reconhecemos atualmente que há quatro grandes categorias de microorganismos causadoras de doenças: vírus, bactérias, fungos e outros organismos relativamente grandes e complexos, coletivamente chamados de parasitas [19]. As descobertas de Koch e de outros grandes microbiologistas possibilitaram o desenvolvimento da microbiologia e o entendimento da vacina de Jenner cujo princípio pôde ser estendido para o tratamento de outras doenças.

Na década de 1880, Louis Pasteur projetou uma vacina contra a cólera aviária e desenvolveu uma vacina anti-rábica, que obteve sucesso espetacular em um rapaz mordido por um cão raivoso [19]. Tantos sucessos práticos levaram os microbiologistas a entenderem melhor o mecanismo da imunização das doenças, e em 1890, Emil Von Behring e Shibasaburo descobriram que os soros dos indivíduos vacinados continham substâncias que eles chamaram de **anticorpos** que se ligavam especificamente aos agentes infecciosos [19].

A produção de anticorpos é uma resposta à infecções específicas denominada de resposta **imune adaptativa**, uma vez que é realizada durante a vida do indivíduo, como uma reação adaptativa à presença de patógenos específicos [21]. Há também a resposta **imunidade inata** aos agentes patogênicos. Nesse caso, os microorganismos causadores de doenças são ingeridos e digeridos por células chamadas de macrófagos. Essas células permitem proteção contra uma infinidade de doenças sem exigir uma exposição às mesmas [22].

Como vimos, os anticorpos são uma resposta as infecções específicas e sua presença em um indivíduo reflete as infecções às quais o mesmo foi exposto. Durante o estudo das vacinas, tornou-se claro que anticorpos poderiam ser induzidos por uma gama de substâncias que foram geralmente denominadas de **antígenos**.

Tanto a imunidade inata quanta a imunidade adaptativa dependem da atividade das células brancas do sangue, os leucócitos. Os leucócitos são formados por dois conjuntos de células: granulócitos, responsáveis pela imunidade inata, e os linfócitos, responsáveis pela imunidade adaptativa, que resulta na produção de anticorpos quando o sistema imune é exposto aos antígenos.

Os linfócitos não exibem atividade funcional até se encontrarem com o respectivo antígeno, necessário para o início de sua proliferação e por suas ações específicas. Os linfócitos possuem em suas superfícies receptores altamente diversificados, tal que cada linfócito é específico para um dado antígeno e em conjunto são capazes de reconhecer uma grande variedade de substâncias antigênicas. O **receptor de antígeno** nos linfócitos é uma forma de anticorpo que será secretado quando a célula for devidamente ativada.

No sistema imunológico, cada linfócito virgem que penetra na corrente circulatória é portador de uma única especificidade. A especificidade desses receptores é determinada por um mecanismo genético único que opera durante o desenvolvimento dos linfócitos na medula óssea e no timo, órgão linfóide, a fim de gerar centenas de diferentes variantes dos genes codificadores das moléculas receptoras. Assim, embora o linfócito individual seja portador de uma especificidade única, a especificidade de cada linfócito é diferente, e os milhões de linfócitos do organismo podem dar origem à milhões de diferentes especificidades. O processo de geração de anticorpos inicia-se após a ligação do antígeno à membrana receptora dos linfócitos. A célula é então ativada para secretar anticorpos com especificidade idêntica à do receptor de superfície.

Do ponto de vista bioquímico, os anticorpos são conhecidos pela denominação de imunoglobulina, usualmente representada pela sigla Ig. Existem diferentes classes de Igs no sistema imune com pesos moleculares distintos. Em humanos existem cinco classes distintas:  $\gamma$ -Ig,  $\mu$ -Ig,  $\delta$ -Ig,  $\alpha$ -Ig e  $\epsilon$ -Ig. A  $\gamma$ -imunoglobulina humana ou IgG, por exemplo, é uma macromolécula com peso molecular típico de 150.000 e de dimensão máxima de aproximadamente 5nm [22]. Outras imunoglobulinas podem ter pesos moleculares de até 1.000.000, como é o caso da  $\mu$ -imunoglobulina ou IgM [21].

### 4.3 Estrutura das Moléculas de Anticorpo

Os anticorpos, como foi discutido anteriormente, são as formas secretadas pelo receptor de antígenos dos linfócitos. Uma vez que são produzidos em grandes quantidades, como resposta aos antígenos, eles podem ser usados para estudos mediante técnicas bioquímicas de análise. O fato importante compreendido pelos bioquímicos é que as moléculas de anticorpo são formadas por duas regiões distintas: uma região constante, capaz de assumir de quatro a cinco formas, e uma variável, que pode apresentar uma infinidade de formas sutilmente diferentes, permitindo que se liguem especificamente a uma variedade igualmente vasta de diferentes antígenos conforme ilustrado de forma simplificada na Fig.4.1. De forma simplificada, a molécula pode ser visualizada como sendo em forma de Y. A Fig.4.2 mostra o aspecto real de uma molécula de anticorpo [21].

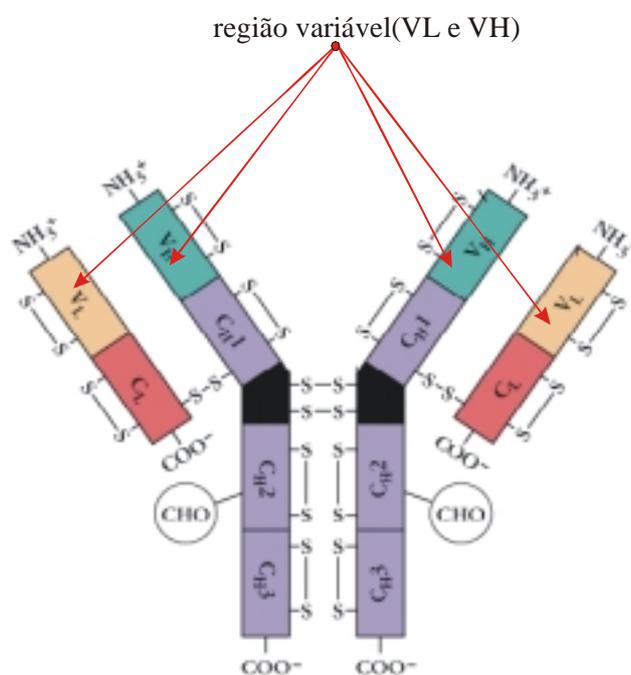


Fig.4.1 Representação simplificada de uma molécula de anticorpo.

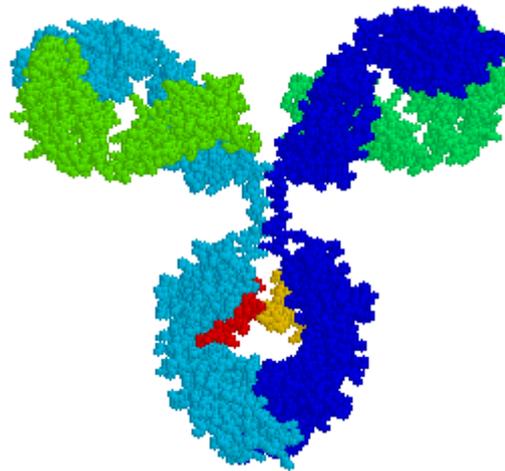


Fig.4.2 Aspecto de uma molécula de anticorpo.

A região variável determina a especificidade de ligação ao antígeno, ao passo que a região constante determina como o anticorpo interage com o antígeno, uma vez ligado a ele. O estudo dessa interação antígeno-anticorpo, da especificidade e quantificação dessas substâncias é muito importante para compreender, diagnosticar e criar vacinas contra doenças que atacam o homem e os animais.

### 4.4 Técnicas de Detecção da Reação Antígeno-Anticorpo

A necessidade de detectar e quantificar antígenos ou anticorpos, tanto na pesquisa quanto em exames laboratoriais, fez surgir o interesse em várias técnicas de imunoensaio. Uma das primeiras técnicas conhecida como método de Ouchterlony da “difusão dupla” [19] permite que antígenos e anticorpos colocados em poços diferentes separados por um gel possam se difundir para formar uma linha de precipitado. Analisando a posição dessa linha é possível extrair informações sobre a concentração de antígenos ou anticorpos. Realizando uma comparação das posições das linhas de precipitação formadas por diferentes soluções de antígenos permite obter padrões estruturais sobre semelhanças ou diferenças antigênicas e assim quantificar e determinar a existência de uma relação interespecífica.

Outro método consiste na separação de antígenos e anticorpos incorporados em um gel por eletroforese. A técnica permite realizar estudos em proteínas através da

migração das componentes da mistura de várias espécies iônicas e diferentes massas moleculares submetidas a um campo elétrico. A escala de migração durante a eletroforese fornece informação sobre a estrutura do antígeno analisado. Esses métodos foram de grande importância nos estudos iniciais da imunologia em testes de imunoenaios, mas agora foram quase inteiramente substituídos por métodos mais simples. Dois métodos são atualmente bastante utilizados: Radioimunoensaio (RIE) e análise por imun absorção por ligação enzimática (ELISA-Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay), descritos a seguir.

#### 4.4.1 Radioimunoensaio

Os radioimunoensaios são amplamente utilizados para a detecção de macromoléculas (frequentemente denominadas de “analisados”) no soro sanguíneo. O princípio baseia-se na preparação do soro a ser testado e na preparação de uma solução pura de antígenos marcados com radioisótopos. Mistura-se as duas amostras formando uma única solução conforme a Fig.4.3.

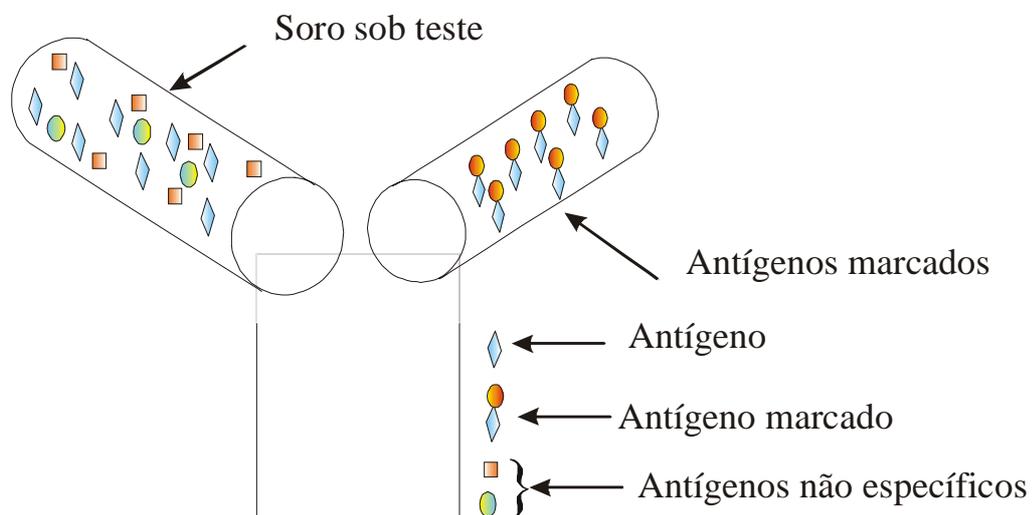


Fig.4.3 Teste radioimunoensaio para um soro contendo antígenos.

A essa solução é adicionada uma solução de anticorpos específicos aos antígenos sob teste, conforme ilustrado na Fig.4.4. Através de um procedimento denominado de ensaio competitivo os antígenos marcados e não-marcados competem para reação com os anticorpos, formando precipitados antígeno-anticorpo que são separados da solução por ultracentrifugação.

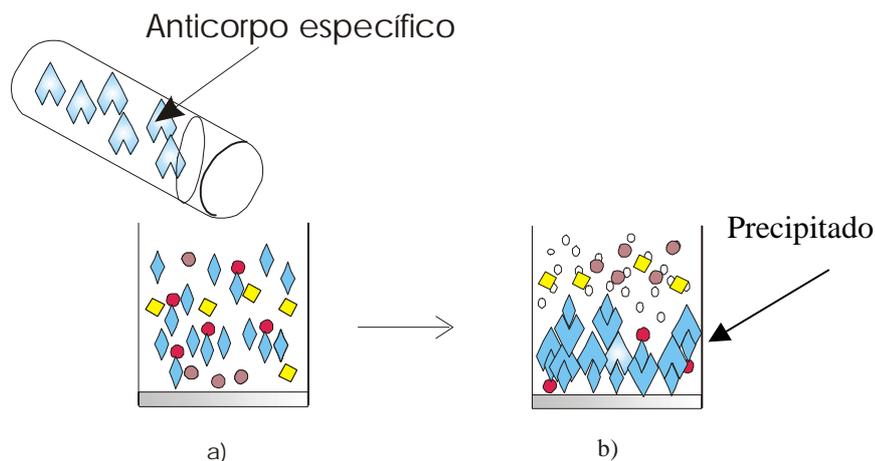


Fig.4.4 Ensaio competitivo entre antígenos marcados e não marcados. a) Reação competitiva de antígenos do soro e antígenos marcados com solução pura de anticorpos específicos. b) Formação de Precipitado antígeno-anticorpo em solução.

A seguir, mede-se a radioatividade do precipitado. A presença de altos níveis de radioatividade no precipitado indica que a amostra de soro sob teste possui baixa concentração do antígeno. Por outro lado, baixas contagens radioativas indicam níveis elevados do antígeno na amostra de soro.

Nesse processo, o protocolo para realização desse método exige a execução de uma série de etapas de reação, lavagens, preparação de amostras e de tecnologias sofisticadas de marcação radioativa de um dos reagentes. Os reagentes com marcadores radioativos são razoavelmente caros e muitos laboratórios que realizam esse tipo de ensaio precisam importar os reagentes, o que torna alto o custo da pesquisa e dos exames laboratoriais.

#### 4.4.2 ELISA

O objetivo do teste ELISA é detectar a presença de anticorpos em um soro com o auxílio de uma reação enzimática. O processo inicia-se com adsorção do antígeno numa placa de poliestireno composta de múltiplos poços, ou células de reação conforme a Fig.4.5. O soro sob teste é adicionado à placa, permitindo que os anticorpos específicos liguem-se aos antígenos.

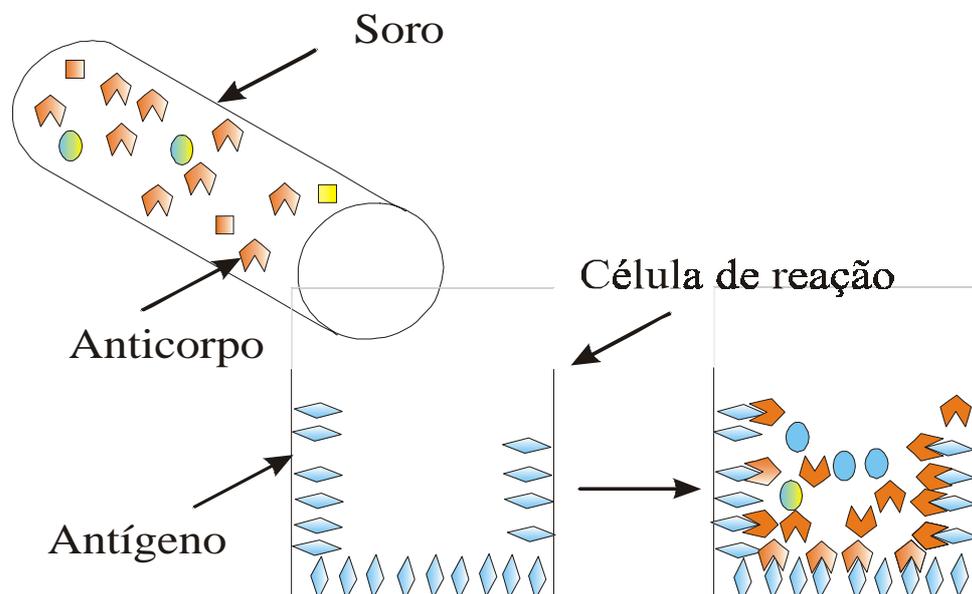


Fig.4.5 Reação antígeno-anticorpo no teste Elisa. a) Imobilização de antígenos nas paredes da célula de reação. b) Reação entre anticorpos presentes no soro e antígenos imobilizados.

Após um período de incubação, a placa é lavada para retirar os anticorpos não ligados. Para detectar os anticorpos ligados aos antígenos utiliza-se um conjugado formado por anticorpo anti-imoglobulina ligado a uma enzima reveladora. Esse conjugado adicionado ao composto antígeno-anticorpo como na Fig.4.6a, ocasiona uma segunda reação. Após um período de incubação, a placa é lavada para retirar os conjugados não ligados. Seguindo esses passos é adicionada uma solução capaz de reagir com a enzima cujo produto é uma solução cujo grau de absorção óptica no ultravioleta é proporcional a quantidade de enzima imobilizada na célula de reação.

Dessa forma, medindo-se a absorção óptica da solução no UV permite quantificar a concentração de anticorpos (específicos para o antígeno) no soro sob teste.

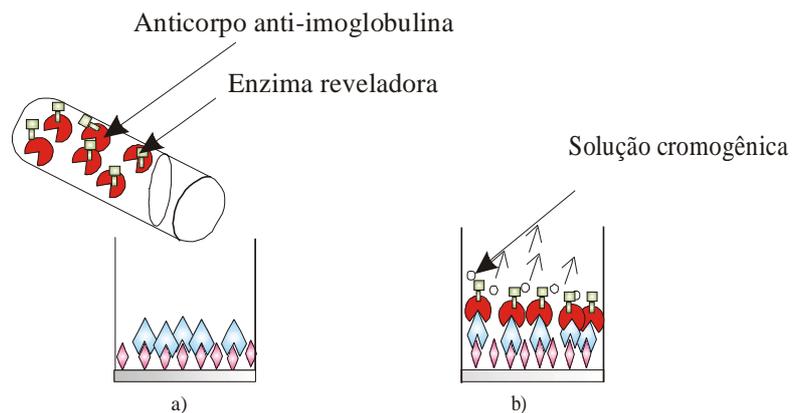


Fig.4.6 Reação enzimática para quantificação de anticorpo. a) Adição de anticorpo Anti-imoglobulina a uma solução resultante da reação antígenos-anticorpo. b) Revelação das enzimas através de uma solução cromogênica.

### 4.5 RPS Aplicada na Caracterização de Reações Antígeno-Anticorpo

A técnica de ressonância de plásmons de superfície vem atraindo a atenção de muitos pesquisadores para o desenvolvimento de sensores biológicos. Essa técnica apresenta um princípio simples de medida, um projeto de baixo custo e não necessita uso de marcadores para identificar se houve ou não uma reação entre as moléculas em

análise. Com essa técnica é possível investigar interações bioespecíficas do tipo antígeno/ anticorpo, proteína/DNA, proteína/carboidrato, etc [23-4].

A configuração básica usada na construção desses sensores está ilustrada na Fig.4.7. O sistema é composto por um prisma usado para acoplar o feixe de luz, polarizado paralelo ao plano de incidência, ao plásmon de superfície sob condições críticas já comentadas no capítulo anterior e um simples fotodetector para investigar a ressonância. O metal geralmente usado para formação do filme é o ouro por ser mais estável quimicamente quando exposto à atmosfera. A espessura desse filme é tipicamente de 50nm [20] para  $\lambda = 632,8nm$ . A técnica é extremamente sensível devido ao fato de a absorção ressonante ocorrer em uma região angular extremamente estreita, permitindo assim detectar pequenas variações do índice de refração na camada adjacente ao filme metálico.

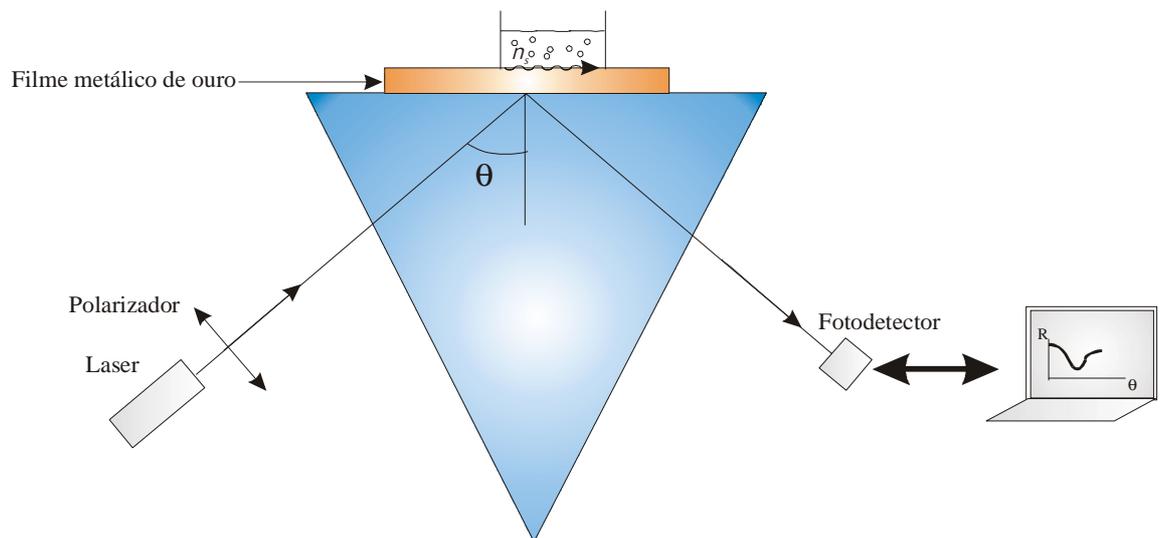


Fig.4.7 Configuração de Kretschmann para observação de RPS.

Como vimos no capítulo 3, a curva de reflectância atinge valor mínimo para o ângulo de incidência  $\theta$  dado aproximadamente por

$$\theta_{SP} = \text{sen}^{-1} \left( \frac{1}{n} \left( \frac{\epsilon' n_s^2}{\epsilon' + n_s^2} \right)^{1/2} \right), \quad (4.1)$$

onde  $n$  e  $n_s$  são os índices de refração do prisma e do meio externo respectivamente. A variável  $\epsilon'$  é a parte real da permissividade complexa do metal no comprimento de onda usado. A Fig.4.8 ilustra o princípio básico dos imunossensores baseados em RPS. Para imoglobulinas de peso molecular de 150.000, uma monocamada de 5nm é formada após algum tempo de contato da solução com a superfície do ouro [20]. A formação dessa camada protéica altera a reflectância, deslocando a ressonância para ângulos maiores.

Resultados relatados na literatura têm demonstrado o uso dessa técnica para determinar a concentração de anticorpos específicos no soro sanguíneo [24], caracterizar a cinética de reação antígeno-anticorpo, medir as constantes de adsorção e desadsorção em superfícies metálicas [20],etc.

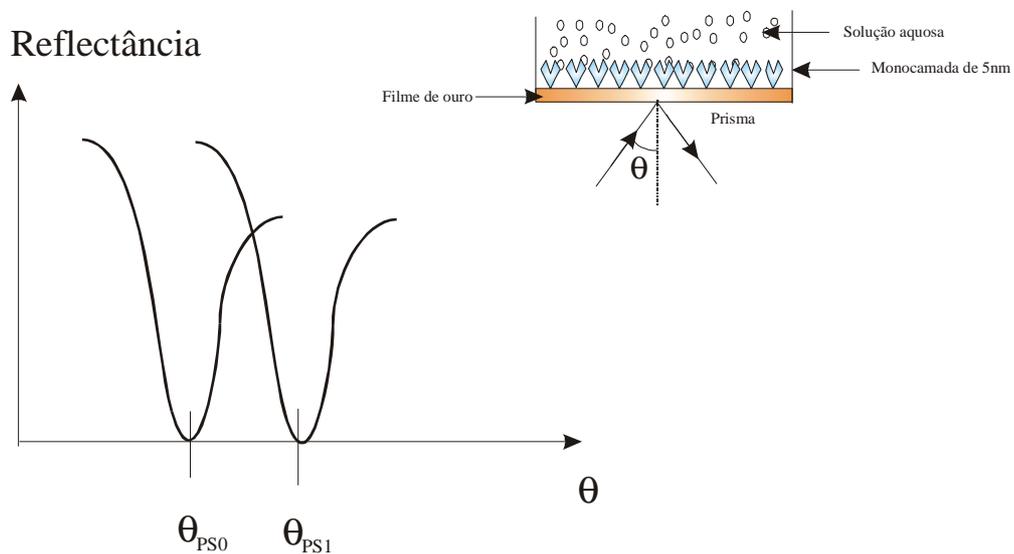


Fig.4.8 Princípio de imunossensores baseados em RPS.

No próximo capítulo mostramos o desenvolvimento de uma primeira versão de um sistema óptico baseado em RPS para observação de reações do tipo antígeno-anticorpo.

## 5. Espectrômetro de RPS em $\lambda=632,8\text{nm}$ e seu Emprego na Caracterização da Reação Antígeno/Anticorpo

Neste capítulo é descrito o desenvolvimento da primeira versão de um espectrômetro de plásmons de superfície, operando com um laser de HeNe no comprimento de onda  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ . Medidas de RPS em filmes de ouro expostos ao ambiente e a soluções aquosas são também descritas. Essas medidas são utilizadas na definição das condições de operação do sistema para caracterização de reações antígeno-anticorpo em tempo real. O protocolo de preparação dos reagentes e de operação do sistema são também tratados bem como os resultados experimentais de observação da cinética da reação de um sistema biológico modelo correspondente a reação IgG/anti-IgG.

### 5.1 Sistema Óptico

A Fig.5.1 ilustra a montagem utilizada para investigar RPS. A fonte de luz do sistema é um laser de HeNe (632,8nm) de 5mW, pelo polarizador  $P$ , cujo feixe é polarizado na direção paralela ao plano de incidência. O divisor de feixes  $BS$  divide o raio  $S$  em duas componentes  $S1$  e  $S2$ . Os dois fotodetectores  $D1$  e  $D2$  são utilizados para medir as potências ópticas dos feixes  $S2$  e  $S3$ , respectivamente.

Os sinais gerados pelos fotodetectores são monitorados por dois canais de um conversor analógico-digital DAS-16, 100kHz (Keithley Instruments, Cleveland, Ohio-EUA) alojado em um dos slots de um IBM-PC 486. Um software desenvolvido no ambiente *Quickbasic* é utilizado para processamento e gravação dos dados. Mais detalhes dos atributos desse software são dados no Capítulo 6.

Para minimizar ruído, cada medida é obtida da média de 1000 amostras da razão  $S3/S2$  entre o sinal medido e o sinal de referência. Dois prismas foram utilizados no sistema óptico. Para medidas com filmes de ouro expostos ao ambiente, foi utilizado um prisma equilátero de vidro BK7 ( $n = 1,515$  em  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ), com cada face medindo  $60\text{mm} \times 60\text{mm}$ . Já para medidas de RPS em soluções aquosas, foi utilizado um prisma equilátero de vidro SF2 com cada face medindo  $50\text{mm} \times 50\text{mm}$ . Esse último tem índice

de refração maior do que aquele do vidro BK7. Em  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ,  $n(SF2) = 1,643$ , de acordo com as especificações do fabricante (Oficina de Óptica de São Carlos - USP-São Carlos). O emprego desse vidro com maior índice de refração para medidas em soluções aquosas permite deslocar a linha de RPS para as proximidades da região angular em torno da direção normal à face de entrada do prisma. Nessas condições o sistema opera com a face superior do prisma posicionada horizontalmente, facilitando assim a inserção e aspiração de amostras líquidas. O posicionamento angular do prisma relativamente ao feixe incidente  $S1$  é feito através de um estágio de rotação montado em uma base vertical, conforme ilustrado na Fig.5.1. A forma de suporte do prisma utiliza um bloco acoplado a uma placa multicélulas, conforme detalhado a seguir.

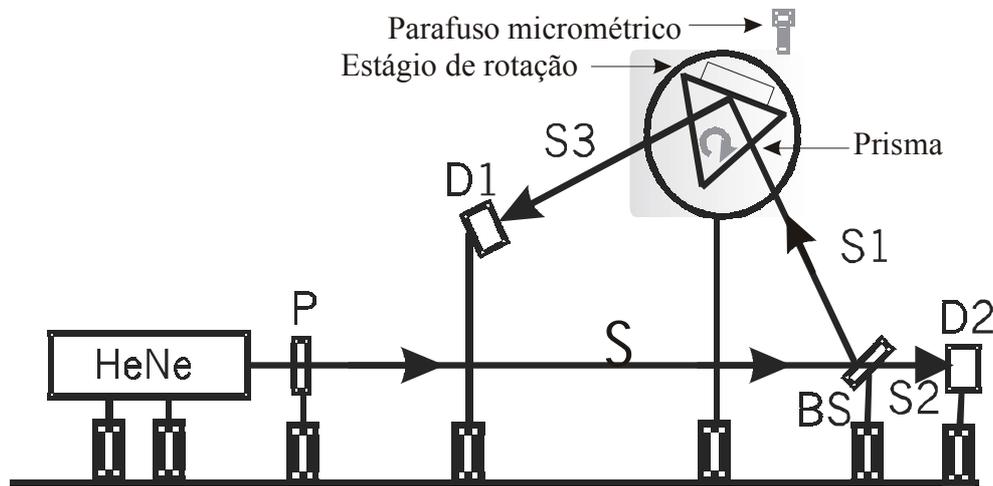


Fig.5.1 Sistema usado para investigar RPS em  $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ .

### 5.2 Sistema Integrado Prisma-Placa Multicélulas

O sistema óptico foi implementado com a face sob teste do prisma posicionada horizontalmente, de forma a permitir a obtenção de medidas de RPS em amostras líquidas. Foi confeccionado um suporte especial em acrílico para acomodação do prisma ao estágio de rotação e foi utilizada uma placa multicélulas de teflon tendo um conjunto de 25 células equidistantes entre si, de forma a permitir a varredura e teste de várias amostras em meio líquido.

A Fig.5.2 mostra uma fotografia da placa multicélulas que é confeccionada com duas fendas nas bordas. Essas fendas servem para afixar o sistema prisma/substrato metalizado/placa ao suporte acrílico de sustentação do conjunto. Para garantir a vedação das células no sistema montado, cada célula é confeccionada com uma ranhura em cada borda onde é encaixado o anel de vedação de borracha ( *o-ring* ). Uma vez vedada ao substrato metalizado, a superfície metálica forma a tampa inferior de cada célula. Na extremidade aberta, soluções aquosas podem ser adicionadas ou aspiradas, conforme detalhado adiante neste Capítulo. Cada célula é dimensionada para poder acomodar até 400  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa.

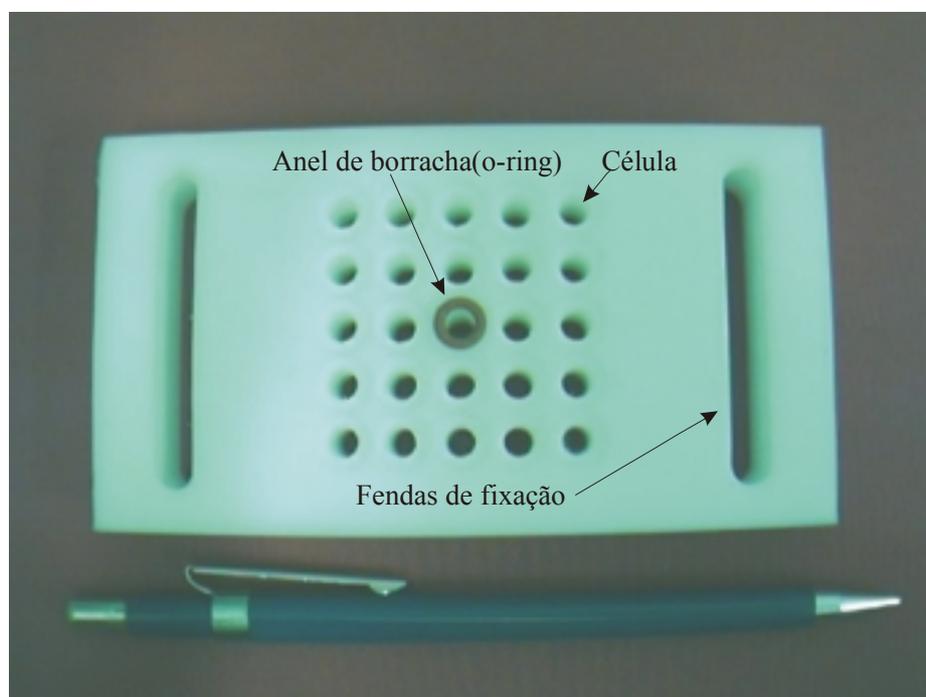


Fig.5.2 Fotografia da placa multicélulas.

A Fig.5.3 ilustra como é feita a fixação do conjunto prisma/substrato/placa. Os anéis de borracha pressionam o filme metálico que está depositado sobre a face inferior do substrato de vidro. Esse substrato faz contato óptico com a face superior do prisma através de um óleo casador de índices de refração. A Fig. 5.4 mostra uma foto detalhada do sistema integrado prisma/substrato/placa afixado em sua configuração final no estágio de rotação.

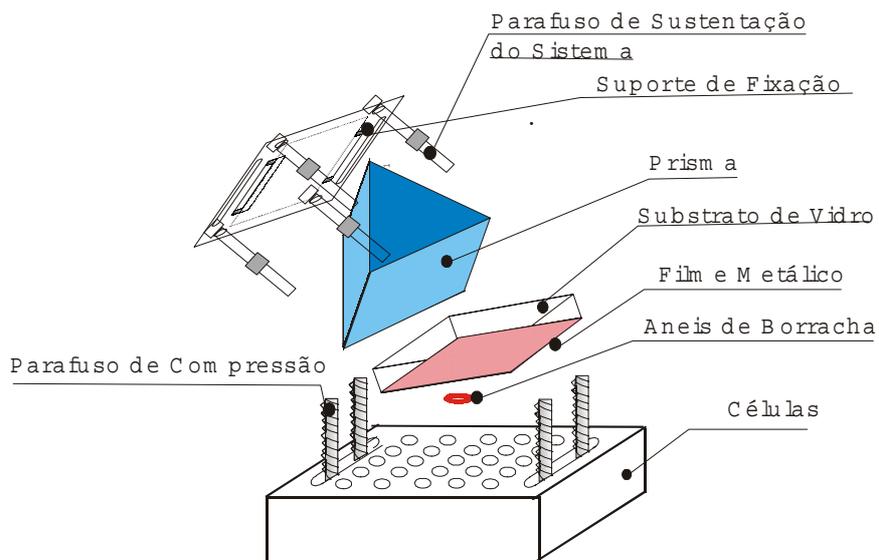


Fig.5.3 Detalhamento da forma de montagem do sistema integrado.

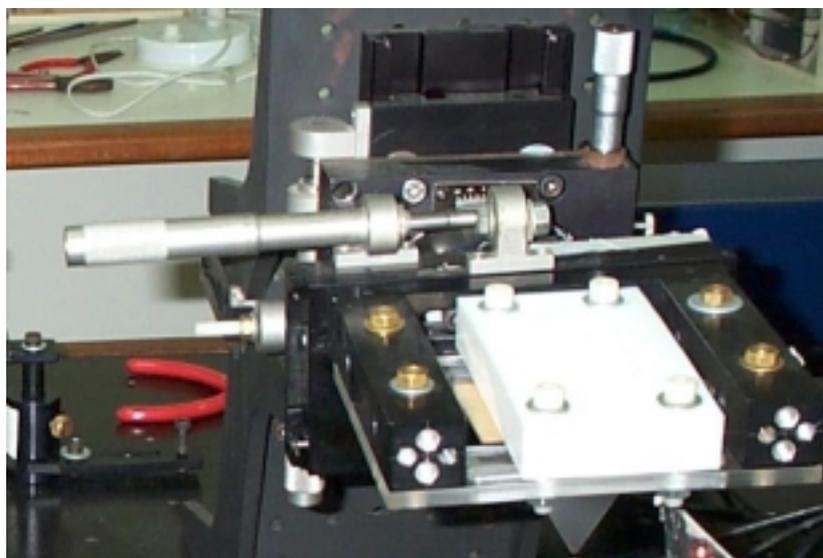


Fig.5.4 Fotografia do sistema integrado(prisma/substrato/placa multicélulas) afixado no estágio de rotação através do suporte acrílico

### 5.3 Formulação Teórica da Reflectância do Sistema Prisma-Substrato Metalizado

Na Fig.5.5 temos a representação geométrica do feixe no interior do prisma em uma montagem baseada no método experimental proposto por Kretschmann para investigar RPS [11]. Uma lâmina de vidro comum utilizada como substrato, tendo aproximadamente 1 mm de espessura e medindo 5 cm × 7,5 cm, é metalizada com um filme de ouro com pureza de 99,999% e espessura de aproximadamente 500 Å. Como descrito adiante neste Capítulo, essa espessura foi obtida com mais precisão a partir de um procedimento de ajuste dos parâmetros do filme aos dados experimentais. A lâmina está em contato óptico com o prisma através de um óleo casador de índices de refração.

No início de cada medida o divisor de feixes *BS* é fixado de forma que o feixe de luz incidente seja posicionado normal à face 1 indicada na Fig.5.5. Após esse ajuste, o ângulo de incidência é obtido pelo giro do prisma através do parafuso micrométrico. As múltiplas reflexões e transmissões, ilustradas na Fig.5.5, resultam na saída o feixe *S1''*, que representa a reflexão do feixe na interface prisma-substrato, e o feixe *S3*, que representa a reflexão do feixe *S1'* na interface substrato-filme metálico. O feixe *S3* é monitorado pelo fotodetector *D1* indicado na Fig.5.1 para medir o efeito de RPS. Algumas reflexões foram omitidas na Fig.5.5 para não sobrecarregar a figura.

A observação do efeito de RPS é realizada medindo a reflectância dada pela razão

$$R = \frac{S3/S2}{S1/S2}, \quad (5.1)$$

onde *S2* é a porção do feixe incidente indicada na Fig.5.1.

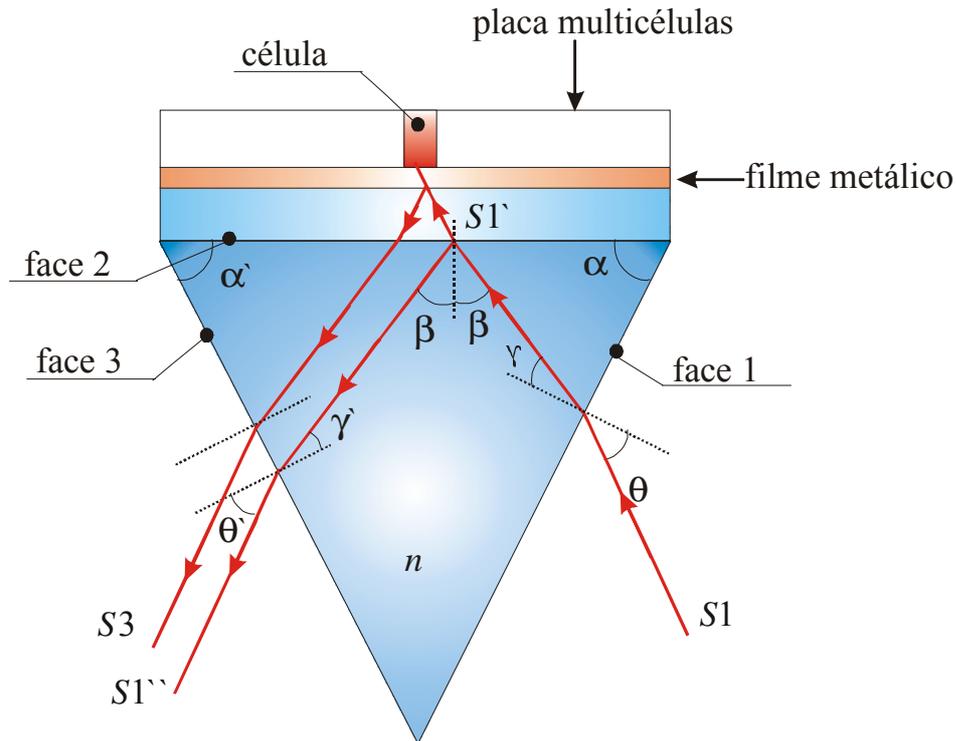


Fig.5.5 Detalhe do sistema prisma-filme-célula.

A expressão teórica da refletância em função do ângulo externo  $\theta$  pode ser posta na forma

$$R = T(\theta)T(\theta')T1(\theta)T1(\theta')(r_0)^2, \quad (5.2)$$

onde  $T(\theta)$  é a função transmitância associada à face 1 ou 3,  $T1(\theta)$  é a função transmitância associada à face 2 e  $r_0$  representa a refletividade da interface substrato-filme metálico ilustrada na Fig.5.5. Sendo o prisma equilátero,  $\alpha = \alpha'$ , o que implica  $\theta = \theta'$  e a Eq.(5.2) se reduz a

$$R = |T(\theta)T1(\theta)r_0|^2. \quad (5.3)$$

Reescrevendo a Eq.(5.3) em função das refletâncias das três interfaces temos

$$R = \left(1 - |r_{10}|^2\right)^2 \left(1 - |r_{12}|^2\right)^2 |r_0|^2. \quad (5.4)$$

onde  $r_{10}$ ,  $r_{12}$  e  $r_0$  são as reflectividades das interfaces prisma-ar, prisma-substrato e substrato-metal, respectivamente e dadas por [18 ]

$$r_{10} = \frac{\varepsilon_1 k - k'_1}{\varepsilon_1 k + k'_1}, \quad (5.5)$$

$$r_{12} = \frac{\varepsilon_1 k_2 - \varepsilon_2 k_1}{\varepsilon_1 k_2 + \varepsilon_2 k_1}, \quad (5.6)$$

$$r_0 = \frac{r_{23} + r_{34} \exp(-2jk_3d)}{1 + r_{23}r_{34} \exp(-2jk_3d)}, \quad (5.7)$$

com

$$r_{23} = \frac{\varepsilon_2 k_3 - \varepsilon_3 k_2}{\varepsilon_2 k_3 + \varepsilon_3 k_2}, \quad (5.8)$$

$$r_{34} = \frac{\varepsilon_3 k_4 - \varepsilon_4 k_3}{\varepsilon_3 k_4 + \varepsilon_4 k_3}, \quad (5.9)$$

$$k = k_0 \cos \theta, \quad (5.10)$$

$$k'_1 = \sqrt{\varepsilon_1} k_0 \cos \gamma, \quad (5.11)$$

$$k_i = k_0 \left[ \varepsilon_i - \varepsilon_1 (\sin \beta)^2 \right]^{1/2}, \quad (5.12)$$

com  $i=1, 2, 3, 4$  e

$$k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}. \quad (5.13)$$

Nas expressões acima  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$ ,  $\varepsilon_3$  e  $\varepsilon_4$  representam as permissividades relativas do prisma, do substrato, do filme metálico e do meio adjacente, respectivamente.

A função reflectância expressa na Eq.(5.4) contém o efeito de RPS no fator  $|r_0|^2$ , e pode ser expressa em função do ângulo interno  $\beta$  indicado na Fig.5.5 utilizando-se a relação

$$\beta = \alpha - \gamma,$$

$$\gamma = \text{sen}^{-1}\left(\frac{\text{sen } \theta}{n}\right).$$

### 5.4 Observação Experimental do Efeito de RPS

Com o sistema óptico descrito anteriormente foram realizadas medidas de reflectância para definir as condições de operação do sistema. Na Fig.5.6 ilustramos o ajuste de curvas teórica e experimental usando as Eqs.(5.4), (5.5) e (5.6) e os resultados experimentais com o ar em contato com o filme metálico (célula vazia). O filme usado para realizar essas medidas já havia sido empregado em uma outras experiências e foi submetido a várias lavagens que provavelmente produziram deformações na superfície do filme de ouro, contribuindo para deformar a curva experimental de RPS ilustrada na Fig.5.6. Os parâmetros obtidos com esse ajuste para essa curva experimental estão listados na Fig.5.1. Essa medida foi realizada usando um prisma de vidro BK7,  $n(632,8nm) = 1,515$  [25], e o filme metálico, depositado em um substrato de vidro comum,  $n(632,8nm) = 1,515$  [26].

É possível perceber que os valores medidos das constantes ópticas do filme de ouro diferem substancialmente daqueles obtidos em filmes de boa qualidade com permissividade  $\epsilon = -10,333 - j1,685$  [25]. Isso reforça a hipótese de ter havido algum tipo de desgaste nos processos de uso do filme. Portanto os resultados aferidos com esse filme metálico representam medidas qualitativas para essa primeira versão do espectrômetro.

Tabela.5.1 Resultados experimentais obtidos com ajuste de curva teórica/experimental

$\lambda(\text{nm})$	$n(\text{prisma})$	$\epsilon'$	$\epsilon''$	$d(\text{nm})$
632,8	1,515	-5,5	-1,9	56,6

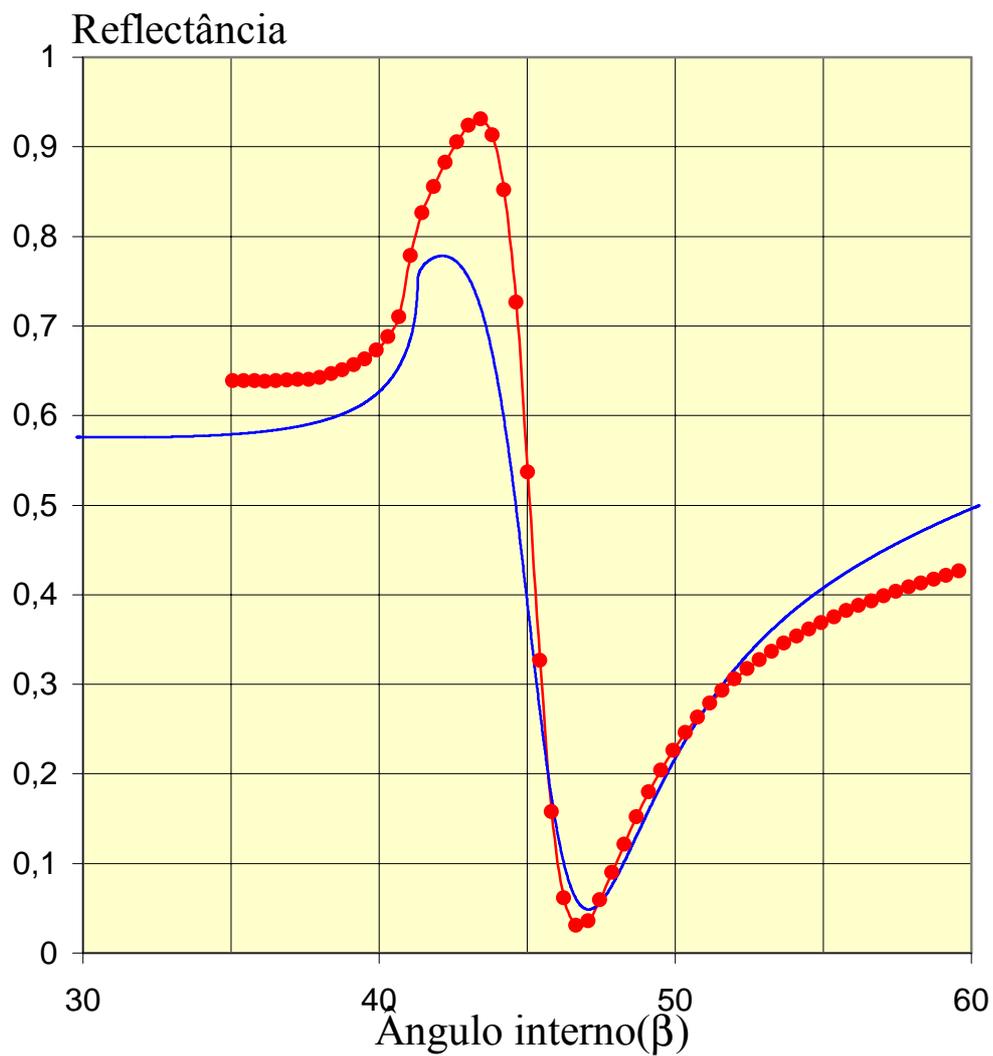


Fig.5.6 Gráfico teórico (linha contínua) e experimental (círculos ligados) da reflectância no ar  $n(ar) = 1$ ,  $\epsilon(Au) = -5,5 - j1,91$  e  $d(Au) = 56,6\text{nm}$ .

A Fig.5.7 mostra a RPS para uma solução tampão PBS composta por uma mistura de fosfato de sódio monobásico( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) com fosfato de sódio dibásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) diluída em água deionizada com  $\text{PH}=7,2$ . Essa solução é usada para manter o PH constante durante a reação antígeno-anticorpo. O índice de refração dessa solução tem o valor aproximado  $n = 1,333$  [24]. Esses pontos foram obtidos usando um prisma  $\text{SF}_2$  com  $n = 1,6304$  em  $\lambda = 632,8$  nm e com o mesmo filme usado para medir a ressonância no ar. A mudança para um prisma de maior índice de refração é justificada pela facilidade de observar o fenômeno de RPS na região angular em torno de  $\beta = 60^\circ$ . Como já comentamos anteriormente, o emprego do prisma de vidro BK7 aumentaria o ângulo de ressonância para  $\beta = \beta_{PS} \approx 75,22^\circ$ , valor esse estimado da expressão aproximada dada pela Eq.(4.1) para um filme metálico em boas condições. Na faixa de ângulos de incidência em torno desse valor a largura do feixe formada na superfície metálica tende a tornar-se da ordem do diâmetro do anel de vedação da célula de reação, fazendo com que parte da distribuição de luz do feixe refletido seja mascarada pela refletância da interface metal-anel de vedação.

O mesmo ângulo obtido da Eq.(4.1) para um prisma  $\text{SF}_2$  seria reduzido para  $\beta = \beta_{PS} \approx 63,28^\circ$ , diminuindo assim a largura do feixe na superfície metálica e minimizando o efeito espúrio do anel de vedação. Por outro lado, o aumento do índice de refração do prisma causa uma dificuldade adicional devido à diferença de índices entre prisma e substrato, esse último feito de vidro BK7. Essa diferença de índices permite que ocorra a condição de reflexão interna total entre o prisma e o substrato, impedindo que o feixe  $S1'$  da Fig.5.5 seja transmitido pelo substrato a partir de um certo ângulo. Para um prisma  $\text{SF}_2$  ( $n = 1,643$ ) e um substrato de vidro BK7( $n = 1,515$ ), o ângulo crítico da interface prisma-substrato ocorre em  $\beta = \beta_C = 67,48^\circ$ , ou seja  $3,8^\circ$  acima do ângulo de ressonância obtido teoricamente. Isso impede a medição da curva de RPS para  $\beta > \beta_C$ , uma vez que  $S1'$  torna-se nulo nessa faixa angular. Isso contudo não impede a observação da região de máxima sensibilidade da curva de RPS, localizada em  $\beta < \beta_{PS}$ , conforme ilustrado na Fig.5.7.

Portanto a partir desses resultados foi possível utilizar o sistema com prisma de vidro SF2 para observação de reações do tipo antígeno-anticorpo em tempo real, conforme detalhado na sessão seguinte.

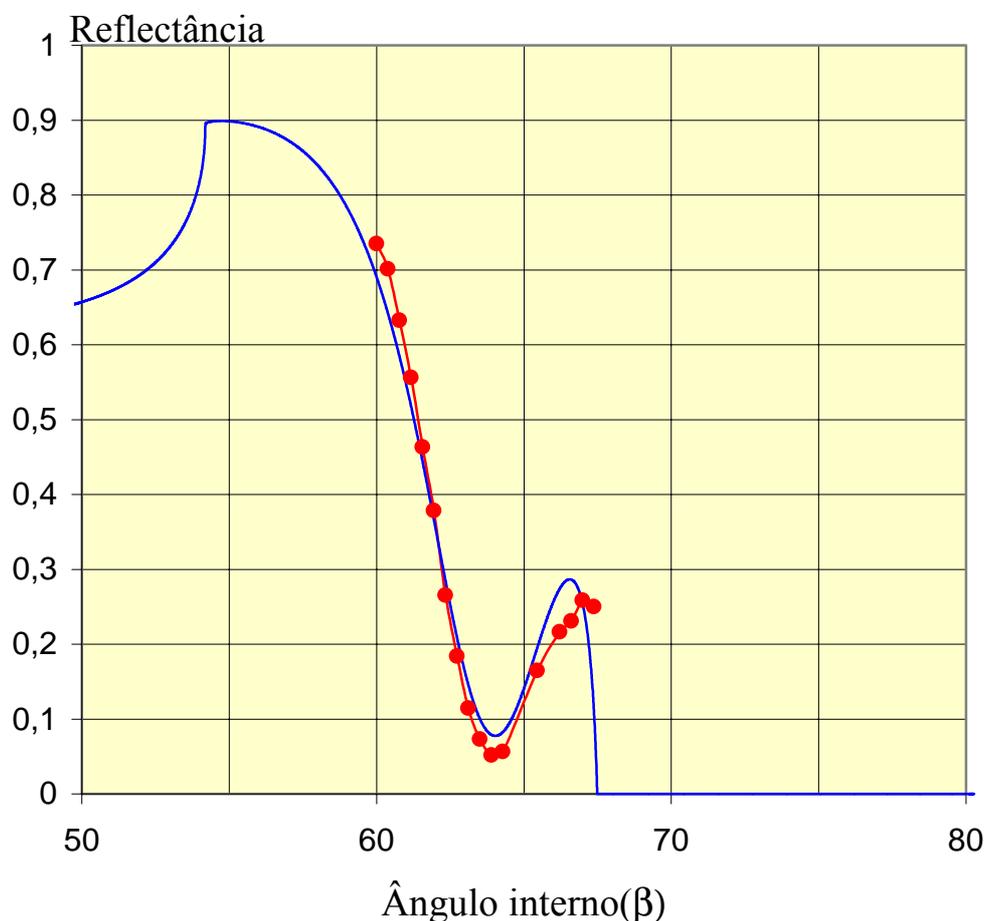


Fig.5.7 Curvas teórica (linha contínua) e experimental da reflectância para uma solução de PBS com  $n_s(632,8nm) = 1,333$ .

## 5.5 Caracterização em Tempo Real de Reações Imunológicas por RPS

De posse da curva de ressonância medida em uma solução de PBS e amostras biológicas de IgG humano e anti-IgG, foram realizadas observações em tempo real da reação imunológica entre essas macromoléculas. O procedimento experimental para realização de medidas de RPS em meios biológicos inicia com a criação de um protocolo sistemático visando determinar a seqüência de etapas que devem ser adotadas durante o experimento. Essas etapas incluem o processo de imobilização das moléculas de anti-

IgG ao filme de ouro, as concentrações das soluções biológicas de IgG, o tempo de incubação em cada fase da reação, etc.

A Tabela 5.2 apresenta o protocolo básico adotado nos experimentos, que segue basicamente alguns passos do protocolo utilizado com o método ELISA. As concentrações utilizadas durante a imobilização e na observação direta da reação imunológica foram obtidas com base em valores típicos publicados na literatura [20].

Tabela 5.2 Protocolo para observação experimental de reação IgG/ anti-IgG.

Passo 1	Ativação do filme metálico: isso é feito adicionando-se uma solução de NaOH com concentração 0,5 Molar durante 10 minutos na célula. Essa ativação cria uma superfície eletrizada que facilita a imobilização de anti-IgG através do processo de adsorção física.
Passo 2	Completados os 10 minutos, a solução de NaOH é retirada da célula, usando uma pipeta calibrada, e um processo de lavagem é repetido durante 5 vezes usando a solução PBS.
Passo 3	Após a lavagem com PBS, a célula é preenchida com 180 $\mu$ L da mesma solução (PBS)
Passo 4	Mede-se a curva de RPS e determina-se o ângulo de máxima declividade, localizado na região $\beta < \beta_{PS}$
Passo 5	Com o ângulo de incidência fixado no ponto de máxima declividade aciona-se o programa de aquisição de dados, selecionando-se o tempo de aquisição e o nome do arquivo de saída.
Passo 6	Fase I: adiciona-se a solução de anti-IgG fornecendo uma concentração final em solução de 10 $\mu$ g/mL. A curva de adsorção é instantaneamente exibida no monitor, permitindo acompanhar a evolução da reflectância devido a adsorção de anti-IgG ao filme metálico. A variação de reflectância atinge o regime permanente após a formação de uma monocamada de anti-IgG na superfície metálica. O tempo para que isso ocorra depende da concentração de anti-IgG em solução.
Passo 7	Fase II: após atingido o regime permanente inicia-se novamente um processo de lavagem da célula por cinco vezes, usando-se a solução de PBS. Após a lavagem, a célula é novamente preenchida com 180 $\mu$ L dessa solução. Todo esse processo é monitorado em tempo real.
Passo 8	Fase III: acrescenta-se à solução de PBS a solução de IgG e continua monitorando no tempo a variação da reflectância. Nessa fase, o IgG em suspensão através da interação específica com a camada de anti-IgG, forma uma segunda camada orgânica que atinge o regime permanente após um intervalo de tempo dependente da concentração de IgG em solução.
Passo 9	Fase IV: ao final de Fase III repete-se o processo de lavagem adotado na Fase II preenchendo-se finalmente a célula com 180 $\mu$ L de PBS.

Os resultados obtidos experimentalmente foram coletados através de um sistema de aquisição de dados, cujos detalhes de funcionamento são dados no Capítulo 6. A variação no tempo da reflectância durante as 4 fases do experimento, está ilustrada na Fig.5.8. Essa medida foi obtida usando soluções de IgG e anti-IgG fornecidas pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Cada fase do protocolo da Tabela 5.2 foi realizada em um intervalo de uma hora. A partir desse gráfico é possível estimar a espessura do filme protéico formado sobre o filme de ouro, como descrito na próxima secção.

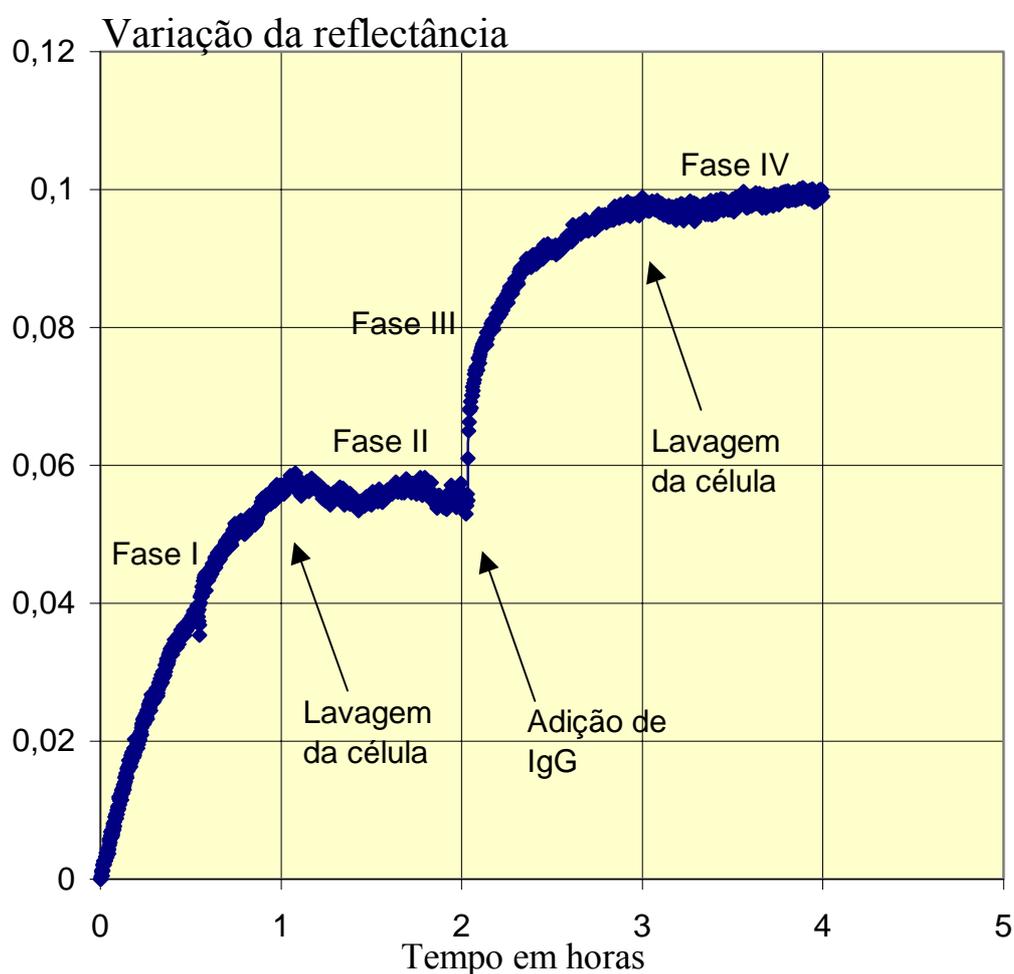


Fig.5.8 Cinética da reação IgG/anti-IgG para uma solução com concentração final(PBS+Anti-IgG) de  $10\mu\text{g/mL}$  e (PBS+IgG) de  $10\mu\text{g/mL}$ .

## 5.6 Estimativa da Espessura do Filme Orgânico

É possível estimar a espessura do filme orgânico formado sobre o metal, calculando teoricamente a variação da reflectância na posição angular da derivada máxima da curva de RPS em função da espessura  $d_o$  da camada de anti-IgG/IgG. A formulação teórica consiste em determinar a função reflectância para o sistema prisma-filme metálico-filme orgânico( $d_o$ )-PBS. A função reflectância para esse sistema de três meios, desprezando o substrato é da forma

$$R(\beta, d, d_s) = \frac{r_{12} + r_0(d_s) \exp(-2ik_3k_0d)}{1 + r_{12}r_0(d_s) \exp(-2ik_3k_0d)}, \quad (5.7)$$

com

$$r_0(d_s) = \frac{r_{23} + r_{34} \exp(-2ik_3d_s)}{1 + r_{23}r_{34} \exp(-2ik_3d_s)}. \quad (5.8)$$

onde  $r_{12}$ ,  $r_0(d_s)$ ,  $r_{23}$ ,  $r_{34}$  são as reflectâncias nas interfaces prisma-metal, metal-filme orgânico, filme orgânico-solução de PBS respectivamente.

O meio 1 é o prisma com índice de refração  $n=1,6403$ , o meio 2 é o filme metálico com espessura estimada  $d=56,6\text{nm}$ , o meio 3 é o filme orgânico de espessura  $d_o$  a ser determinada, cujo índice de refração é  $n_o(\text{filme orgânico})=1,5$  [20]. A reflectância obtida da Eq.(5.7) para esses parâmetros determinados experimentalmente com espessura inicial do filme orgânico  $d_o=0$  no ângulo de máxima derivada  $\beta_{MaxDerv}$  representa as condições iniciais do sistema prisma, filme metálico, filme orgânico e solução. Para uma camada de filme orgânico  $d_o > 0$  obtemos na posição angular  $\beta_{MaxDerv}$  o valor da reflectância que está diretamente relacionada com a camada formada sobre o filme metálico. Portanto na Fig.5.9 temos teoricamente o gráfico obtido da Eq.(5.7) em função dessa espessura  $d_o$ . Desse gráfico é possível estimar teoricamente a espessura da camada formada sobre o filme metálico. Para uma variação da reflectância de  $\Delta R \approx 0,1$  temos uma espessura de aproximadamente  $d_o \approx 5\text{nm}$ , que corresponde ao tamanho típico de IgG medido na literatura [24].

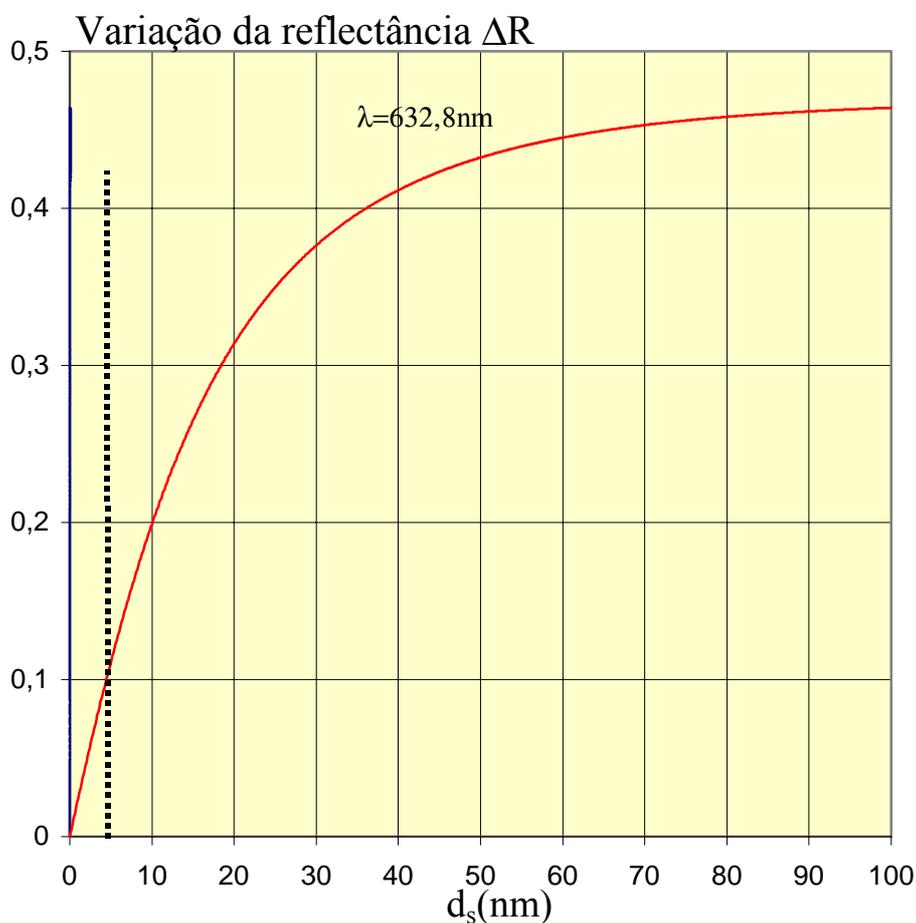


Fig.5.9 Variação relativa da reflectância em função do filme orgânico de índice de refração  $n=1,5$ [23] formada sobre o filme metálico de espessura  $d_0=56,6 \text{ nm}$  e permissividade  $\epsilon(\text{Au}) = -5,5 - j1,9$ .

Outra análise possível é determinar de quanto o ângulo de ressonância se deslocou em relação às condições iniciais de reação. Conhecendo a variação angular  $\Delta R$  e a taxa  $\Delta R / \Delta \beta$ , obtida da função reflectância no ponto de máxima derivada, é possível determinar a variação angular  $\Delta \beta$  produzida pela camada formada. A Fig.5.10 ilustra o deslocamento angular  $\Delta \beta \approx 0,5^\circ$  obtido experimentalmente para a camada de 5nm formada na superfície metálica.

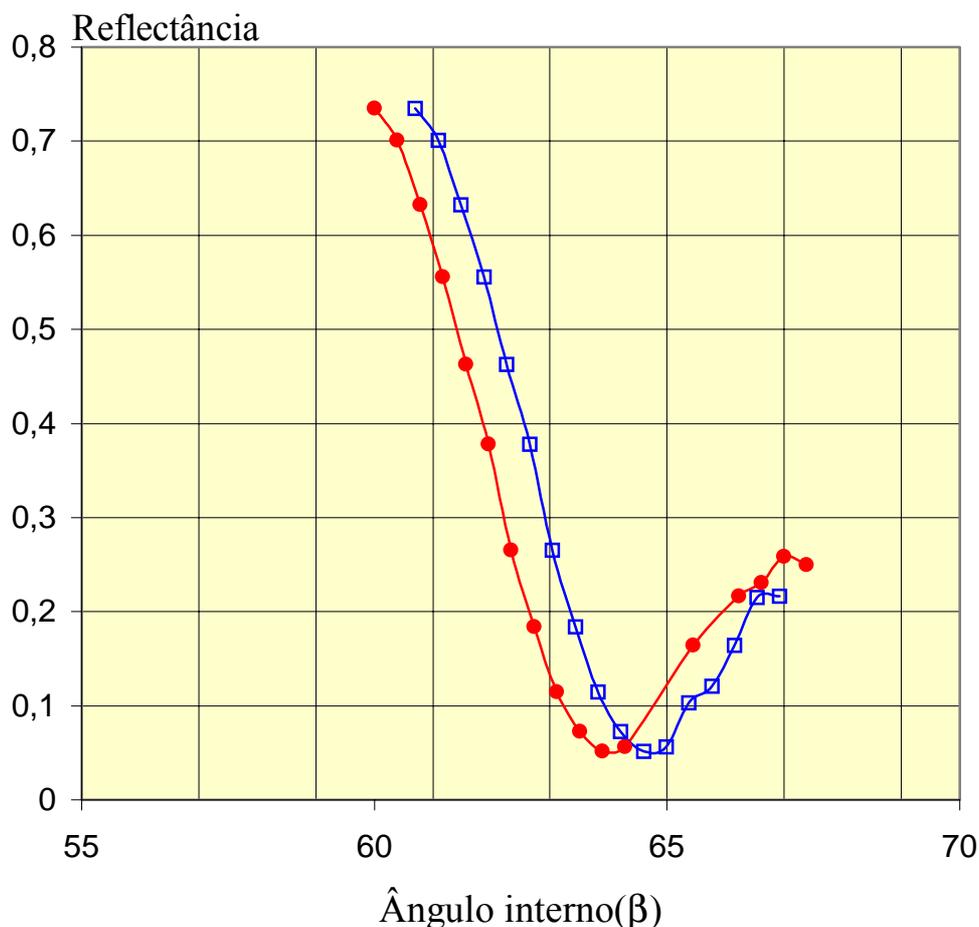


Fig.5.10 Deslocamento de  $0,5^\circ$  na curva de RPS para uma camada protéica de 5nm.

Portanto a partir da técnica de RPS é possível caracterizar reações do tipo antígeno-anticorpo pela medição da reflectância na posição angular de máxima derivada da curva de ressonância. A sensibilidade desse sistema pode ser comparada àquela obtida em imunoenaios convencionais, alguns dos quais foram apresentados no capítulo 4. Diante dessa poderosa ferramenta para o estudo de interações moleculares, apresentaremos no próximo capítulo a concepção final de um sistema óptico de maior sensibilidade dirigido a esse tipo de aplicação.

## 6. Espectrômetro de RPS em $\lambda = 975,1\text{nm}$

A maioria dos resultados de observação de RPS relatada na literatura está na faixa de comprimentos de onda próxima do vermelho no espectro eletromagnético [24]. Diversos trabalhos publicados propõem condições ótimas para investigação desse efeito nessa faixa espectral. Contudo, um trabalho teórico recente, ainda a ser publicado [17] sugere o uso de fontes de luz na região espectral próxima ao comprimento de onda  $\lambda = 1 \mu\text{m}$  para utilização do efeito de RPS em filmes finos de ouro, uma vez que nessa região a largura de linha da ressonância torna-se extremamente fina, possibilitando assim o desenvolvimento de sensores biológicos de altíssima sensibilidade. Embora haja dificuldades em se trabalhar com esse comprimento de onda, devido a sua invisibilidade, neste capítulo apresentamos a evidência experimental prevista teoricamente para o uso de fontes no infravermelho em  $\lambda \approx 1 \mu\text{m}$ . Nesse contexto propomos também uma técnica experimental onde o feixe do laser é focalizado na célula de reação, permitindo assim que a linha da ressonância seja registrada em uma única medida. Os resultados experimentais obtidos através dessa técnica, medidos no ar e na água, são comparados e as dificuldades de implementação do sistema são discutidas. Finalmente propomos uma metodologia de posicionamento do feixe incidente no centro de cada célula de reação para o desenvolvimento futuro de um sistema de varredura de toda a placa multicélulas de forma a permitir o monitoramento simultâneo de várias reações imunológicas.

### 6.1 Justificativa

No capítulo 3, apresentamos os resultados teóricos para um sistema composto por prisma, filme metálico e amostra. Com esses resultados é possível através da análise e definições de alguns parâmetros determinar as características otimizadas dos elementos envolvidos no desenvolvimento de sensores baseados em RPS [25]. Os três parâmetros importantes da curva de RPS que podem ser otimizados para se obter maior sensibilidade e facilitar a implementação de sensores RPS são a meia largura de linha  $W_{PS}$ , a posição do ângulo de ressonância  $\theta_{PS}$  e o valor mínimo na ressonância  $R_{min}$ .

Para entender os parâmetros que definem a linha de RPS utilizamos a aproximação lorentziana para a reflectância, válida na região angular próxima ao ângulo de ressonância, que permite expressar a função reflectância na forma [25]

$$R(k_x) \approx 1 - \frac{(1 - R_{min})K''^2}{(k_x - K')^2 + K''^2}, \quad (6.1)$$

onde

$$k_x = \sqrt{\epsilon_1} k_0 \sin \theta, \quad (6.2)$$

$$K' = \sqrt{\epsilon_1} k_0 \sin(\theta_{PS}), \quad (6.3)$$

com  $k_x$  representando a projeção do vetor de onda incidente no interior do prisma, no plano da interface prisma-metal, na direção do eixo  $x$ , indicada na Fig.6.1. O parâmetro  $\epsilon_1$  é a permissividade elétrica do prisma,  $\theta$  é o ângulo de incidência,  $K'$  e  $K''$  representam as partes real e imaginária da componente  $x$  do vetor de onda do  $PS$  para o sistema de duas interfaces mostrado na Fig.6.1 e  $R_{min}$  é a reflectância mínima que ocorre na condição de ressonância  $k_x = K'$  de acordo com a Eq.(6.1).

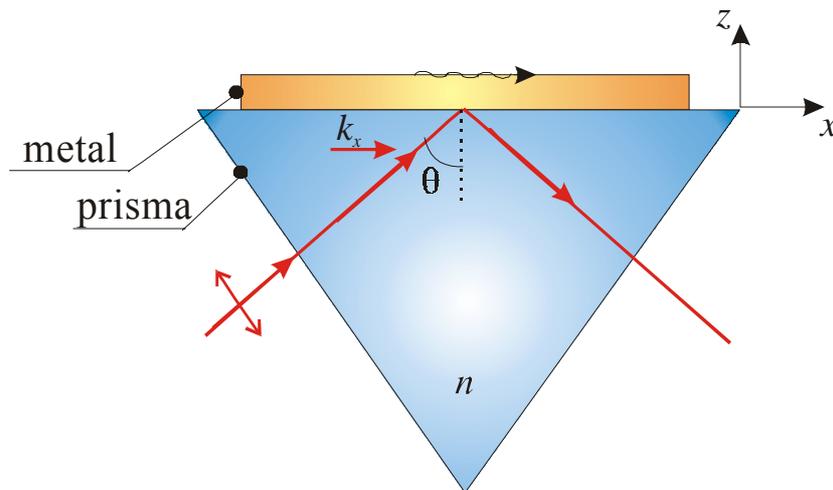


Fig.6.1 Estrutura prisma-metal-meio externo.

A função dada pela Eq.(6.1) e os parâmetros correspondentes estão representados na Fig.6.2, com a reflectância média dada pela relação

$$\bar{R} = \frac{1}{2}(1 + R_{\min}). \quad (6.4)$$

Através da Eq.(6.1) é possível observar que  $R(K' - K'') = R(K' + K'') = \bar{R}$ , ou seja,  $|K''|$  representa a meia largura da ressonância. Pode-se fazer também uma representação da reflectância em função de  $\theta$  [8], inserindo a Eq.(6.2) na Eq.(6.1). Para isso, notemos que

$$2|K''| = k_x(\theta_{PS} + W_{PS}) - k_x(\theta_{PS} - W_{PS}), \quad (6.5)$$

onde  $W_{PS}$  é a meia largura angular da curva de reflectância.

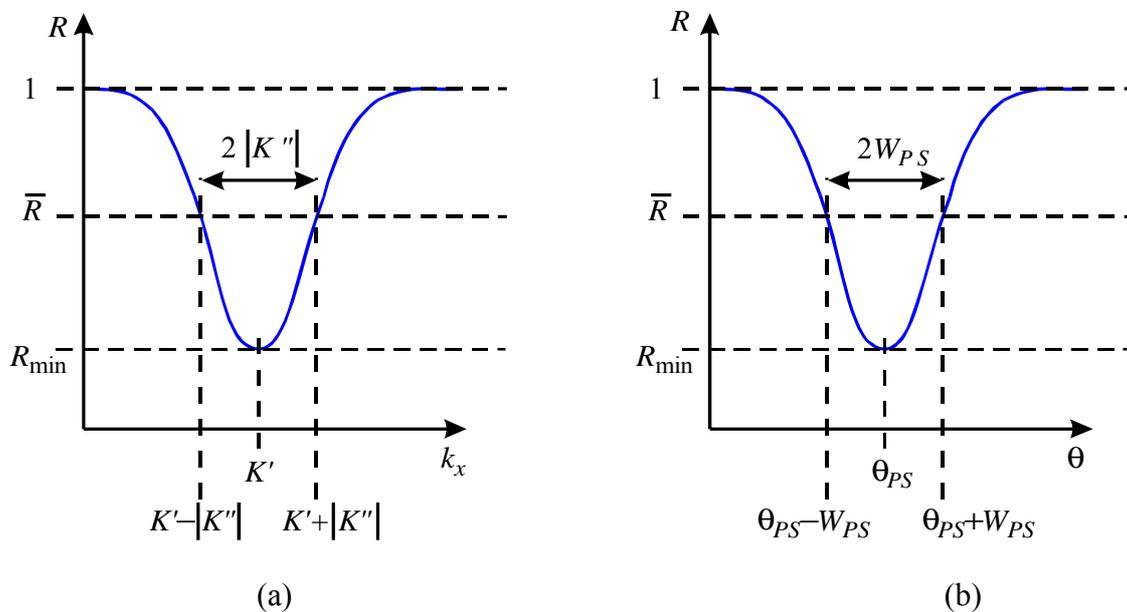


Fig.6.2 Curva de ressonância : (a) em função de  $k_x$  representada no espaço  $k_x$ ; (b) em função de  $\theta$ .

Substituindo a Eq.(6.2) na Eq.(6.5) obtemos

$$2|K''| = \sqrt{\epsilon_1} k_0 (\sin(\theta_{PS} + W_{PS}) - \sin(\theta_{PS} - W_{PS})). \quad (6.6)$$

Considerando situações em que  $2W_{PS} \ll \theta_{PS}$ , e utilizando a aproximação

$$\sin(\theta_{PS} + W_{PS}) - \sin(\theta_{PS} - W_{PS}) \approx 2W_{PS} \cos(\theta_{PS}),$$

a Eq.(6.6) pode ser escrita como

$$|K''| = \frac{2\pi\sqrt{\epsilon_1}}{\lambda} W_{PS} \cos(\theta_{PS}). \quad (6.7)$$

Usando as Eqs.(6.2), (6.3) e (6.6) na Eq.(6.1) resulta,

$$R(\theta) \approx 1 - \frac{(1 - R_{\min})W_{PS}^2}{(\theta - \theta_{PS})^2 + W_{PS}^2}. \quad (6.8)$$

O parâmetro  $W_r$  definido por

$$W_r \equiv W_{SP} / \sqrt{3}$$

é o deslocamento angular abaixo ou acima do valor  $\theta_{PS}$  onde ocorre máxima declividade da curva [7] e está diretamente relacionado à sensibilidade do efeito perante variações de índice de refração do meio adjacente à superfície metálica. Traçando a curva da meia largura reduzida  $W_r$  em função do comprimento de onda é possível identificar a região de comprimentos de onda de máxima sensibilidade, otimizando assim o efeito de RPS no desenvolvimento de sensores [7].

Na literatura encontramos várias curvas teóricas, as quais permitem determinar o metal e comprimento de onda que minimiza o parâmetro  $W_r$ , considerando o vácuo e água como meio em contato com o filme metálico conforme ilustradas nas Fig.6.3 e Fig.6.4 respectivamente [7].

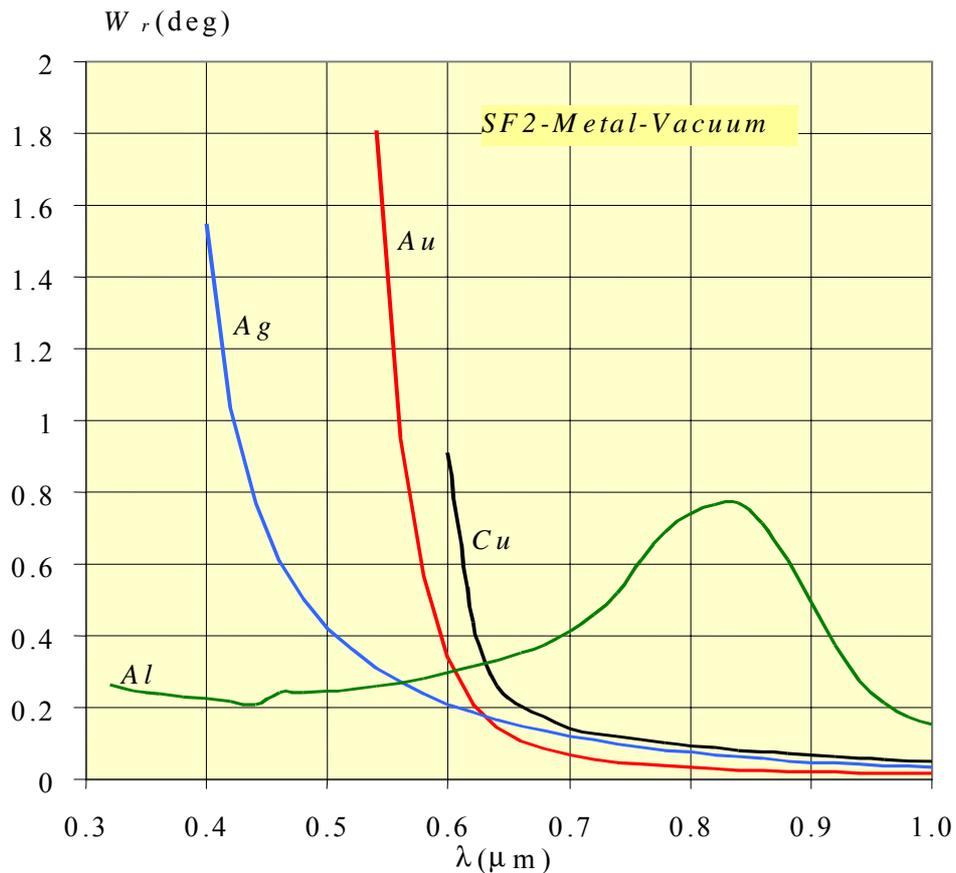


Fig.6.3 Dependência espectral obtida na ref.[7] da meia-largura reduzida da RPS para filmes de ouro, cobre, prata e alumínio na configuração metal-ar de Kretschmann em prisma SF2.

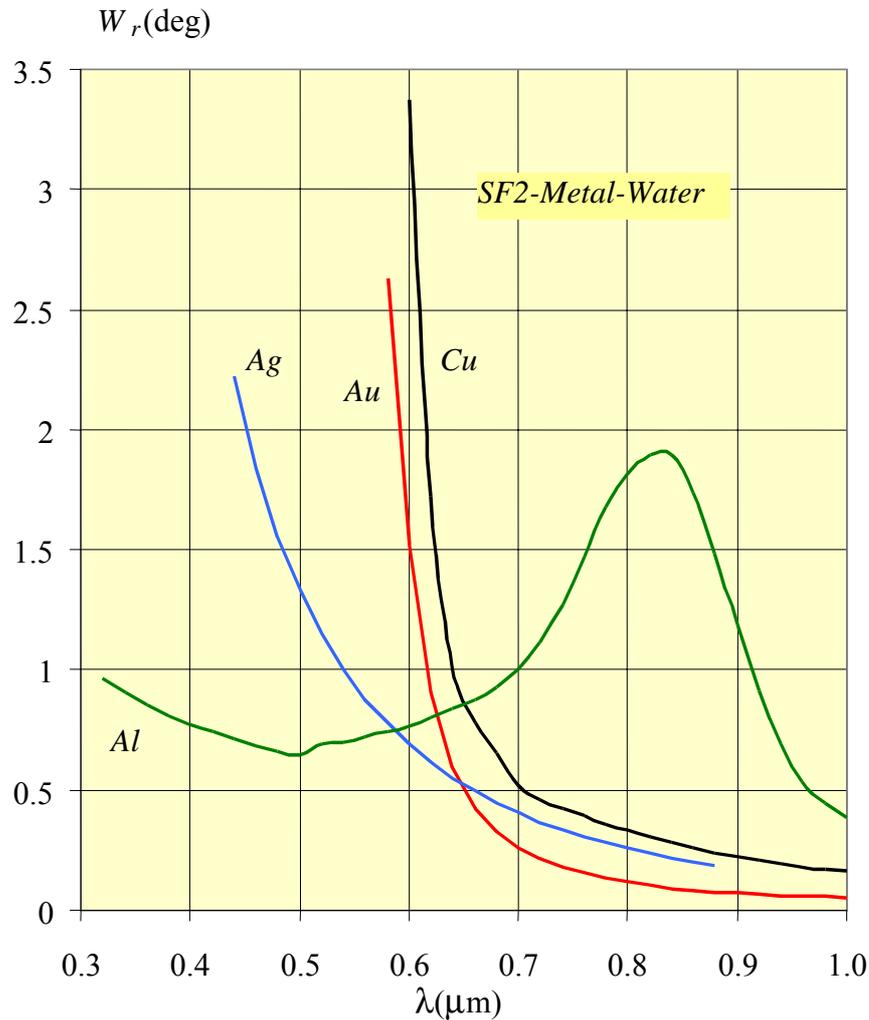


Fig.6.4 Dependência espectral obtida na ref.[7] da meia-largura reduzida da RPS para filmes de ouro, cobre, prata e alumínio na configuração metal-água de Kretschmann em prisma SF2.

Com esses resultados é possível confirmar, como já observado na ref[7] que o ouro é o melhor metal para  $\lambda \approx 1 \mu\text{m}$ , uma vez que exibe o menor valor de  $W_r$  dentre todos os metais.

Outro importante parâmetro na construção do sensor é a posição do ângulo de ressonância. Conforme observamos no capítulo 2, a incidência normal na Face 1 do prisma resulta em um ângulo interno  $\beta = 60^\circ$ . Portanto, quanto mais próximo ao ângulo de ressonância estiver de  $60^\circ$  mais facilmente é possível medir a curva de RPS, evitando

uma incidência rasante na face externa do prisma, além de permitir que a placa multicélulas opere essencialmente na configuração horizontal, facilitando assim o manuseio de amostras líquidas nas células de reação. Comparando o valor de  $\theta_{PS}$  em função do comprimento de onda da luz incidente para prismas de SF<sub>2</sub> (Fig.6.5) e BK7 (Fig.6.6) podemos observar que o prisma de SF<sub>2</sub> responde melhor a esses requisitos, uma vez que o mínimo de ressonância está localizado 3,5° abaixo do ângulo de 60° para  $\lambda \approx 1 \mu\text{m}$ .

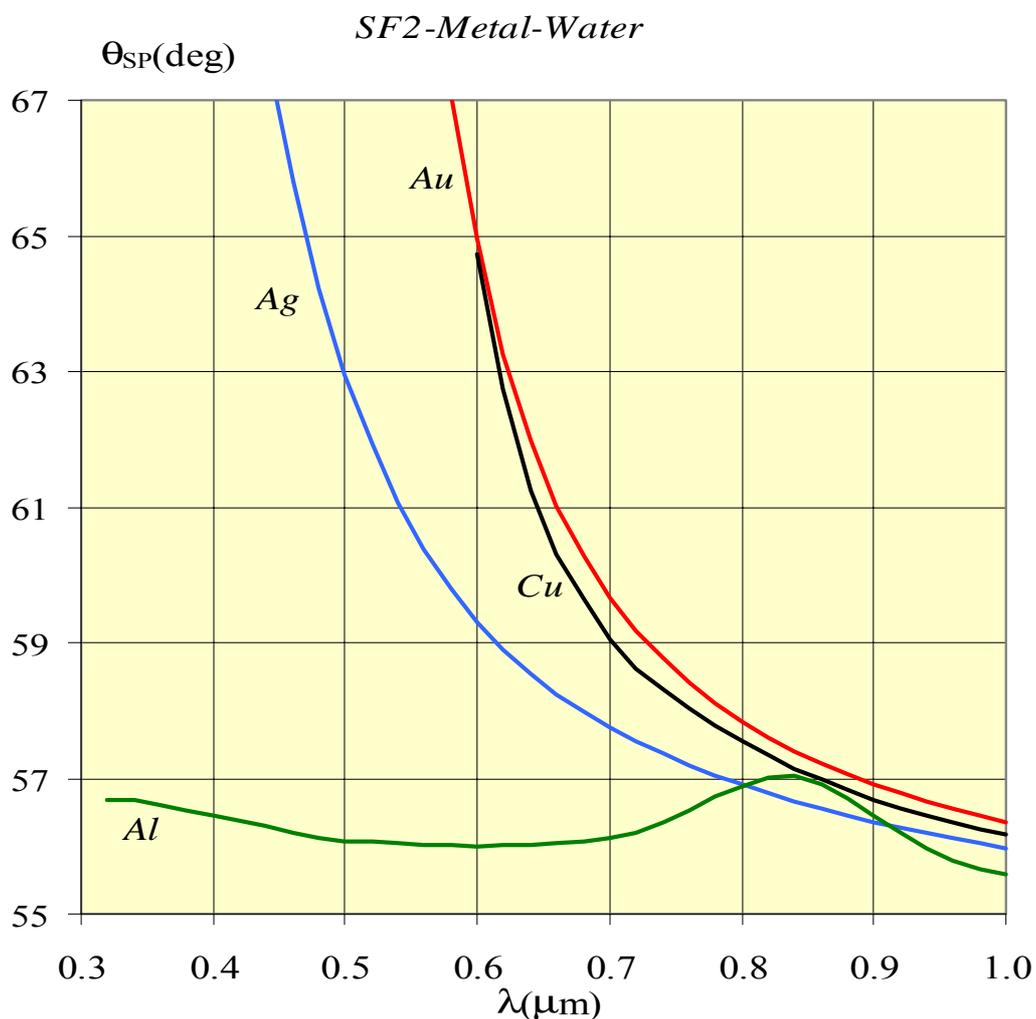


Fig.6.5 Dependência espectral de  $\theta_{PS}$  obtida na ref.[7] em filmes de ouro, prata, cobre e alumínio na configuração SF<sub>2</sub>-metal-água.

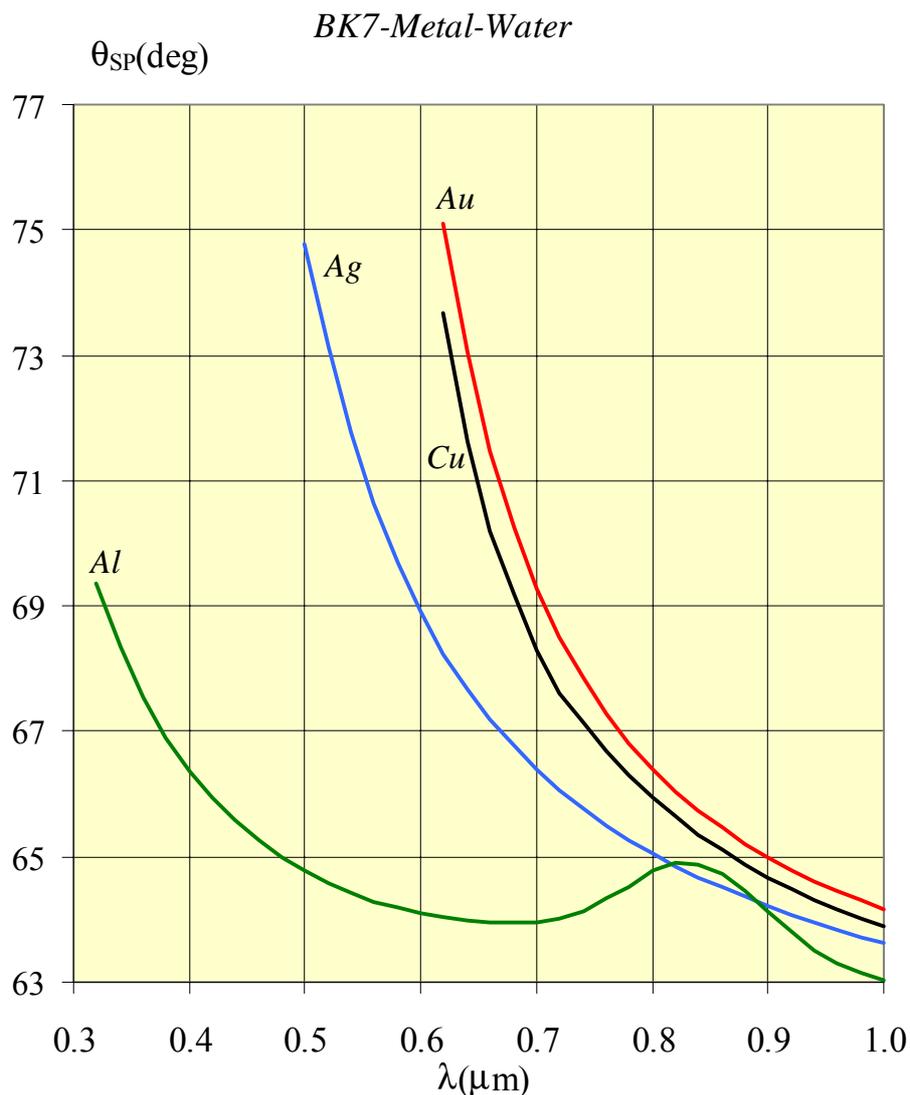


Fig.6.6 Dependência espectral de  $\theta_{PS}$  obtida na ref.[7] em filmes de ouro, prata, cobre e alumínio na configuração BK7-metal-água

## 6.2 Sistema Óptico com Feixe Colimado

### 6.2.1 Descrição do Sistema Óptico

Os sistemas ópticos que implementamos até então envolviam medidas realizadas pela varredura mecânica do ângulo de incidência para medição da dependência angular da reflectância. Apresentaremos agora a proposta de um sistema híbrido com o qual podemos operar tanto com o feixe colimado quanto focalizado em um ponto da célula de reação. Com essa montagem mais compacta e robusta usando o comprimento de onda no

Infravermelho os ângulos de ressonância  $\theta_{PS}$  tanto no ar quanto em meios líquidos ocorrem na região angular  $\beta < 60^\circ$  conforme previsto teoricamente. Vale a pena mencionar que a utilização do laser infravermelho de dimensão inferior a do laser de HeNe facilitou a realização da montagem. As dificuldades de visualização do feixe infravermelho foram contornadas através do uso de um cartão infravermelho e de um visor infravermelho (*IR-viewer*)

A Fig.6.7 apresenta a configuração implementada para o sistema óptico. Um laser de comprimento de onda 975,1nm com potência de 73mW e controlado por uma fonte de corrente (Agilent) é fixado em um suporte ajustável, com translado na horizontal e vertical, possibilitando o ajuste da direção do feixe. Um laser apontador no vermelho ( $\lambda = 630-680\text{nm}$ ), montado sobre o laser infravermelho, é usado para facilitar o alinhamento do feixe infravermelho. O diâmetro do feixe infravermelho é controlado através de uma íris (I). O polarizador *P* define a direção de polarização paralela ao plano de incidência. O feixe *S* é então dividido em duas componentes *S1* e *S2* através do divisor de feixe *BS*. O feixe *S1* incide sobre o prisma eqüilátero de vidro SF2 com arestas de 50mm, e valores nominais para o ângulo interno e índice de refração  $\alpha \approx 60^\circ$  e  $n = 1,6304$  em  $\lambda = 975,1 \text{ nm}$ , respectivamente. O prisma está fixado a um estágio de rotação que pode girar nos sentidos horário e anti-horário através de um parafuso micrométrico. A montagem do prisma no estágio de rotação é semelhante à montagem da Fig.4.6.

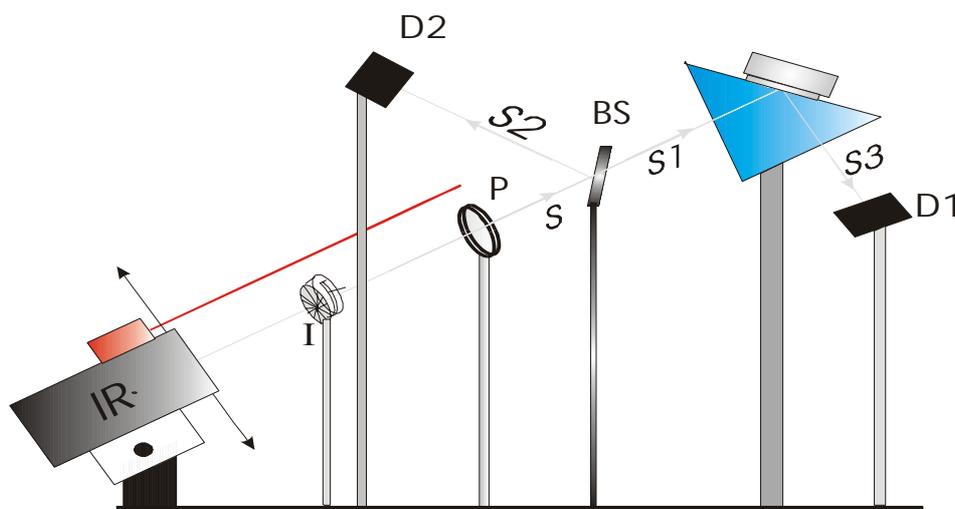


Fig.6.7 Montagem experimental mecânica para laser Infravermelho.

Dois fotodetectores de silício,  $D1$  e  $D2$  são usados para medir a intensidade da linha de  $RPS$  que é obtida da razão entre o feixe  $S3$  refletido pelo prisma e o feixe de referência  $S2$ . Os sinais gerados pelos fotodetectores  $D1$  e  $D2$  são coletadas em dois canais do sistema de aquisição de dados já descrito anteriormente. O software desenvolvido no ambiente *Quickbasic* é utilizado para processamento e gravação dos dados. Como implementado anteriormente, cada medida de reflectância é obtida da média de 1000 amostras da razão entre o sinal  $S3$  e a referência  $S2$ . Para obter a curva de  $RPS$ , que corresponde à razão  $S3/S1$ , antes de cada seqüência de medidas mede-se a razão  $S1/S2$  que é invariável, independentemente de flutuações no nível de potência do laser. A partir dessa medida, a reflectância da face superior do prisma é dada por

$$R = \frac{S3/S2}{S1/S2} = \frac{S3}{S1}. \quad (6.9)$$

### 6.2.2 Dificuldades de Realização de Medidas no Modo de Varredura Angular

A dificuldade inicial para realizar as medidas no infravermelho é o posicionamento do feixe de forma a iluminar a posição central da célula de reação contendo a amostra em análise. Uma forma prática, inicialmente adotada, foi a construção de uma macrocélula, conforme ilustrado na Fig.6.8. Com a ajuda do apontador no vermelho, o feixe infravermelho foi guiado até a macrocélula. Embora o índice de refração do prisma seja diferente para os dois feixes, visível e invisível, a distância entre os pontos de luz formados na amostra é desprezível em relação a área superficial delimitada pela macrocélula. Inicialmente o feixe vermelho é posicionado de forma a ficar alinhado à direção do feixe infravermelho. Após o ajuste, o feixe vermelho é orientado a atravessar a íris, posição de referência, o polarizador e o divisor de feixes, incidindo normal à face 1 do prisma. Através da face oposta à face de incidência do prisma é possível visualizar o ponto de luz do feixe vermelho, formado na face superior do prisma. Se o ponto de luz não estiver na posição desejada, ou seja, na amostra, é possível ser ajustado através dos transladores. Com o sistema alinhado com o feixe vermelho, o suporte de sustentação do laser é transladado de forma que o feixe infravermelho percorra o mesmo caminho do feixe vermelho.

Para visualizar o feixe infravermelho, foram usados um cartão e um visor sensível ao infravermelho. Com esses elementos é possível posicionar os fotodetectores para medir os sinais  $S_1$  e  $S_2$  e observar a posição do ponto de luz formado na amostra. Outro dispositivo que também contribuiu para visualização do feixe foi uma *webcam*, convencional, dessas utilizadas atualmente nos computadores. O uso da macrocélula da Fig.6.8 veio além de facilitar o posicionamento do ponto de luz formado na amostra em análise, também permitir maior liberdade de rotação do prisma, garantido que o feixe sempre atingisse a amostra.

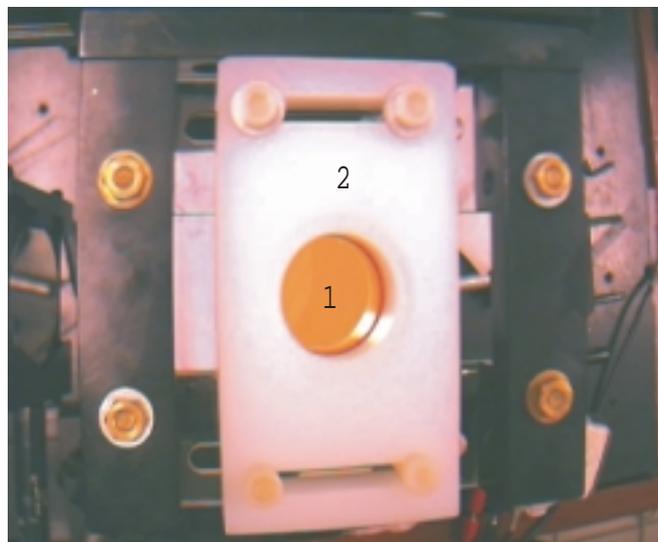


Fig.6.8 Macrocélula usada para medir RPS em água no infravermelho em  $\lambda=975,1\text{nm}$ .

### 6.2.3 Resultados Experimentais no Ar e na Água

Após realizar o procedimento apresentado, foram feitas medidas experimentais no ar e na água para observar a curva de RPS em  $\lambda=975,1\text{nm}$ . A estrutura do filme utilizada nos experimentos foi fabricada em substrato BK7 de 3 mm de espessura, contendo uma bicamada de Cr(3 nm) / Au (57 nm). A fina camada de Cr foi utilizada para facilitar aderência do filme de ouro ao substrato. Os substratos foram fabricados no setor de microfabricação do laboratório Ginzton da Universidade de Stanford (Stanford, Califórnia - EUA).

A Tabela 6.1 fornece os valores teóricos e experimentais obtidos para espessura e permissividade do filme de ouro. Na Fig.6.9 estão representadas a curva experimental e a teórica, essa última tendo sido obtida através de um procedimento de ajuste de três parâmetros do filme de ouro: a espessura e as partes real e imaginária da permissividade complexa. O método utilizado é baseado na técnica das correções diferenciais [25] semelhante ao método usado no capítulo 2 para determinar o índice de refração e ângulo interno do prisma das medidas de reflectância.

Os cálculos foram realizados com um programa *Mathcad* desenvolvido no âmbito da dissertação de mestrado de Maciel Neto[8] e que utiliza a expressão geral de reflectância de uma estrutura de dois filmes. O programa foi adaptado para o cálculo do sistema SF2-Cr-Au-Ar, admitindo-se conhecidas a espessura (3 nm) e a permissividade complexa do filme de Cr ( $\epsilon=1,698-j38,3874$  em  $\lambda = 975,1$  nm) [17]. O resultado experimental mostrado na Tabela 6.1 foi obtido através desse ajuste e o resultado teórico para a permissividade complexa do ouro foi extraído da literatura [17]. O valor assumido teoricamente para a espessura foi aquele especificado no ato da fabricação da estrutura multicamadas.

Tabela 6.1 Resultados teóricos e experimentais obtidos no ar em  $\lambda = 975,1$  nm.

Resultados	$d_{Au}(nm)$	$\epsilon_{Au}'$	$\epsilon_{Au}''$
Teórico	57	-37,263	-1,103
Experimental	55,7	-38,298	-2,407



Fig.6.9 RPS na configuração de prisma de acoplamento de Kretschmann para a estrutura multicamada SF2-BK7-Cr(3nm)-Au(57nm)-ar em  $\lambda = 975,1\text{nm}$ . Os pontos representam a medida experimental e a linha contínua, a curva teórica obtida para os parâmetros do filme de ouro indicados na Tabela 6.1.

Um exame da Fig.6.9 ilustra um ótimo ajuste entre a curva teórica e os pontos experimentais. Nessas medidas os valores da reflectância foram obtidos a intervalos regulares do ângulo externo de cerca de  $0,013^\circ$ .

Na Fig.6.10 ilustramos o gráfico comparativo entre as curvas de RPS para o feixe de laser infravermelho ( $\lambda = 975,1\text{nm}$ ) e para o apontador vermelho, esse último com uma incerteza no comprimento de onda na faixa  $\lambda = 630\text{-}680\text{nm}$ , obtidas no mesmo substrato BK7-Cr-Au. Esse gráfico em  $\lambda = 975,1\text{nm}$  ilustra de forma mais evidente o quão mais estreita é a linha de ressonância relativamente àquela no comprimento de onda vermelho. Na curva mais detalhada da Fig.6.9, note-se que a meia largura de linha é aproximadamente  $0,05^\circ$  em  $\lambda = 975,1\text{nm}$ , o que ilustra o grande potencial de aumento

em sensibilidade do efeito de RPS para o desenvolvimento de sensores nesse comprimento de onda.

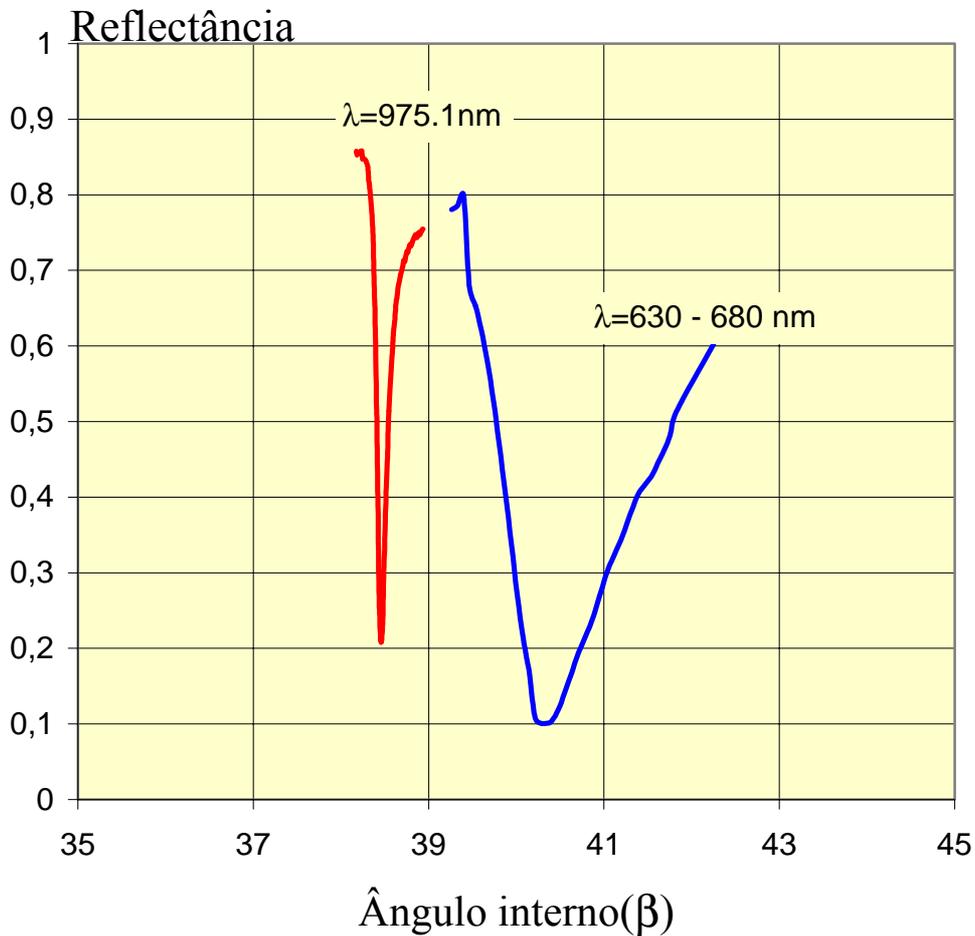


Fig.6.10 Gráfico comparativo entre a medida experimental de RPS para a estrutura SF2-BK7-Cr-Au-ar em  $\lambda = 975,1 \text{ nm}$  e no vermelho ( $\lambda = 630-680 \text{ nm}$ ).

O gráfico da Fig.6.11 ilustra a curva experimental de RPS em  $\lambda = 975,1 \text{ nm}$  para filme de ouro em contato com água pura. Alguns parâmetros relevantes dessa curva experimental estão apresentados na Tabela 6.2 ressaltando os resultados teórico e experimental para o ângulo de ressonância  $\theta_{PS}$  e para a meia largura reduzida  $W_r$ . O resultado teórico foi obtido da ref[7] e os gráficos correspondentes estão mostrados nas Figs.6.4 e 6.5. Como pode se observar da Tabela 6.2, o valor experimental do ângulo de ressonância é extremamente próximo daquele previsto teoricamente. Há no entanto uma diferença de um fator de quase 2 entre as meias larguras reduzidas, presumivelmente devido a camada de Cr da estrutura medida experimentalmente, que não foi considerada na ref[7]. Há também de se considerar que os cálculos obtidos na ref[7] consideraram

uma espessura ótima do filme de ouro de aproximadamente 64 nm, consideravelmente diferente daquela utilizada no nosso experimento. Isso pode provocar a discrepância observada no parâmetro  $W_r$ , sem ter muita influência no valor do ângulo de ressonância. A concordância dos valores teórico e experimental desse parâmetro confirmam, de certa forma, essa hipótese.

Tabela 6.2 Resultados teórico e experimental obtidos em  $\lambda=975,1\text{nm}$  para a configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura.

Resultados	$W_r$ (graus)	$\theta_{PS}$ ( graus )
Teórico	0,059	56,472
Experimental	0,09	56,5

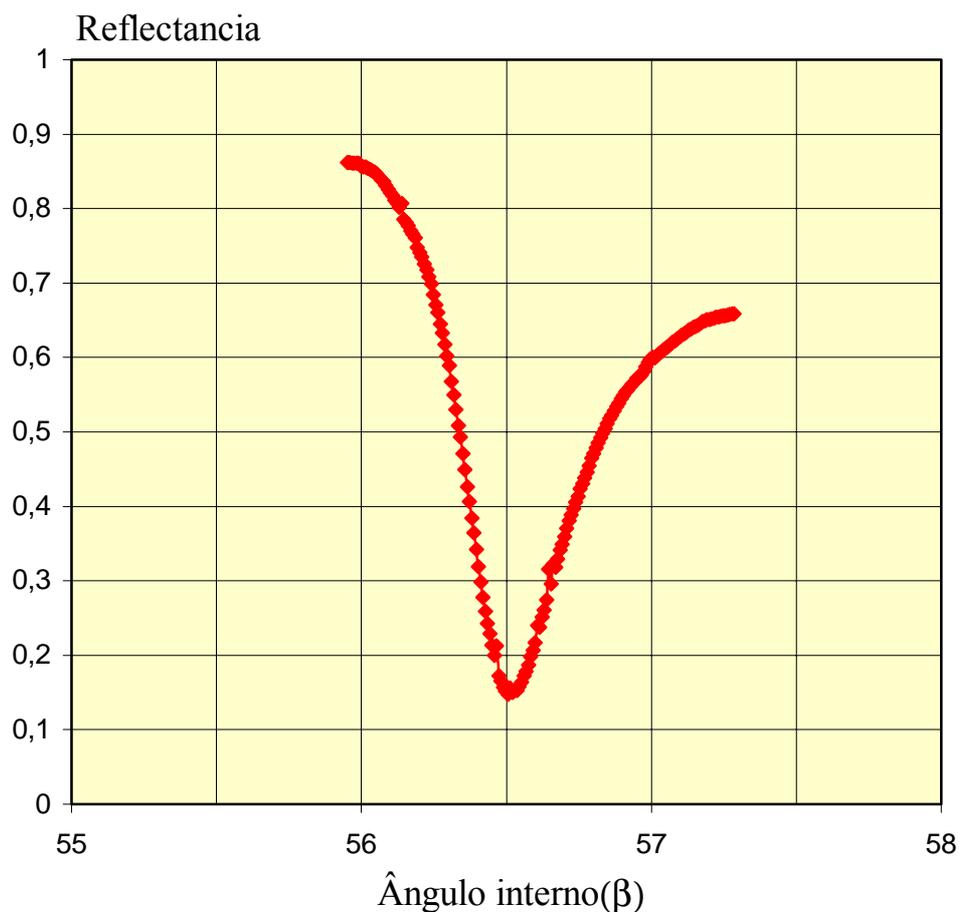


Fig.6.11 Curva experimental de RPS na configuração de Kretschmann para a estrutura SF2-BK7-Cr-Au-água pura em  $\lambda=975,1\text{nm}$ .

A variação teórica da reflectância com a espessura de uma camada orgânica com índice de refração  $n = 1,5$ , hipoteticamente formada sobre o filme de ouro, imerso em solução ( $n = 1,333$ ) com o ângulo de incidência interno fixado no ponto de máxima declividade da curva de ressonância está mostrada na Fig.6.12, para os comprimentos de onda  $\lambda = 975,1$  nm e 632,8 nm. Como pode ser aí observado, para uma camada de espessura  $d = 1$  nm formada sobre o filme metálico a variação de reflectância em  $\lambda = 975,1$  nm é quase 10 vezes superior àquele obtida em  $\lambda = 632,8$  nm, conforme previsto na ref[17]. Note-se que de acordo com os dados experimentais de cinética de reação obtidos no Capítulo 5, foi estimada uma espessura de 5 nm para uma variação de reflectância  $\Delta R=0,1$ . No gráfico da Fig.6.12, o sistema infravermelho produziria esse mesmo sinal para uma variação de espessura de filme orgânico de apenas 0,5 nm.

Assim, a previsão da ref[7] em conjunção com os dados experimentais obtidos neste trabalho, reforça o grande benefício de implementação do espectrômetro de RPS para operação em  $\lambda = 975,1$  nm para o desenvolvimento de biossensores de altíssima sensibilidade.

Na próxima sessão apresentamos uma montagem experimental com feixe focalizado e resultados experimentais qualitativos obtidos com objetivo de propor uma metodologia para observação de reações imunológicas com base no efeito de RPS.

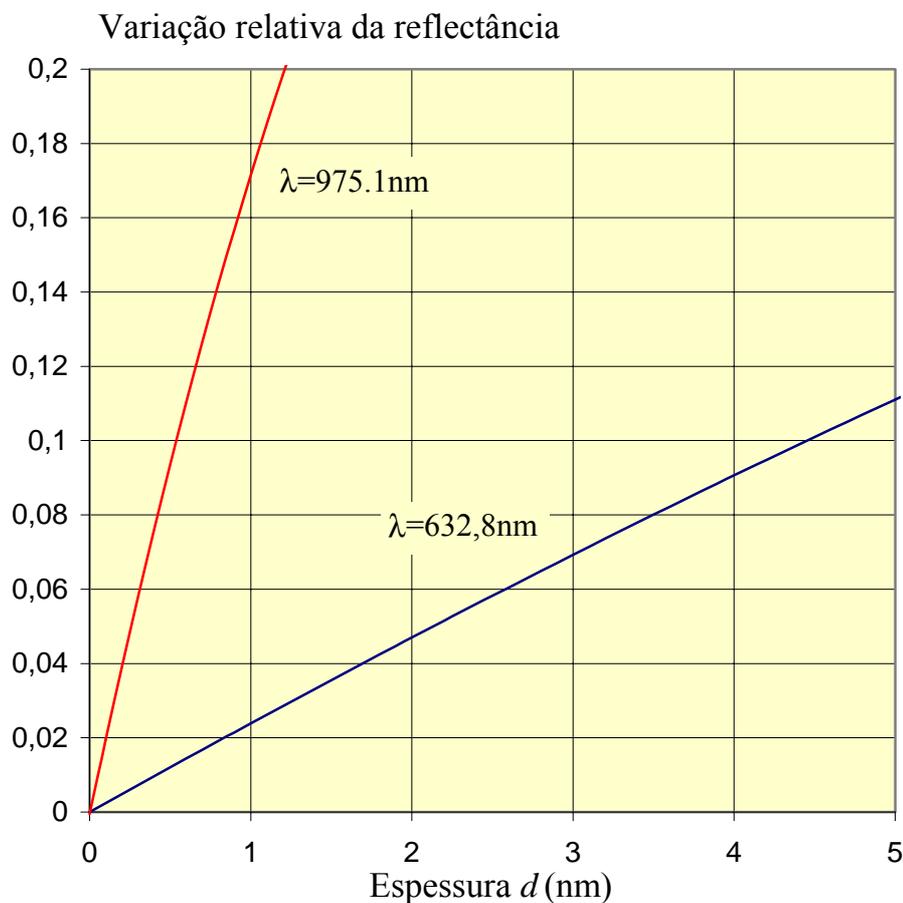


Fig.6.12 Curva teórica da variação relativa da reflectância em função da espessura de uma camada orgânica hipotética de espessura  $d$  ( $n=1,5$ ) formada sobre o filme de ouro.

### 6.3 Sistema Óptico com Feixe Focalizado

Como observado nos resultados obtidos com a montagem anterior da Fig.6.7, a linha completa da curva de RPS em meio aquoso se localiza em uma região angular extremamente estreita, da ordem de  $0,5^\circ$ . Isso permite observar a curva de RPS completa em uma única medida fazendo o ângulo interno de incidência  $\beta$  variar de aproximadamente 1 grau em torno do ângulo de ressonância. Usando a mesma montagem da Fig.6.6, retirando apenas o divisor de feixe (BS) e a íris (I) e inserindo uma lente convergente de 20cm de foco é possível focalizar e visualizar a curva de RPS completa. Os resultados foram coletados, usando tanto um sensor de imagem com um

conjunto de 512 fotodiodos, quanto uma *webcam*. Essa última mostrou ser uma alternativa de baixo custo para visualização de imagens no infravermelho. Nessa sessão iremos apresentar a montagem experimental usada para realizar as medidas, as dificuldades encontradas e os resultados obtidos.

### 6.3.1 Descrição da Montagem

A montagem da Fig.6.13 é semelhante àquela apresentada na Fig.6.7, com a adição da lente convergente(3) e um sensor de imagem(7) composto por um conjunto de 512 fotodiodos (Hamamatsu Corporation, Bridgewater, NJ, EUA). Cada fotodiodo possui uma área sensível de  $50\mu\text{m} \times 2,5\text{mm}$ , resultando em um comprimento total de 2,56 cm. O sensor é afixado a um eixo móvel, permitindo a realização de movimento horizontal, vertical e rotacional. O sensor é conectado ao IBM PC 486 através da placa de aquisição de dados DAS-16. O sistema de aquisição que registra as informações do sensor de imagem é também controlado por um software desenvolvido em *Quickbasic* para DOS. A interface gráfica, é acionada pelo *mouse* de forma semelhante ao sistema operacional *Windows*. O programa permite tanto visualizar em tempo real cada pixel do sensor, como monitorá-lo, acompanhando a variação da reflectância no pixel selecionado. Para observação de variações de reflectância decorrentes de reações biológicas com um dos componentes da reação imobilizado na superfície do filme de ouro, seleciona-se o pixel localizado na posição de máxima declividade da curva de RPS de forma a permitir o acompanhamento da reação em tempo real através da tela do computador.

A Fig.6.14 representa a distribuição luminosa do laser infravermelho usado no experimento, medida usando o sensor de imagem. A intensidade dessa distribuição é expressa em função do número de pixels do sensor totalizado em 512 pontos. O feixe de saída do laser é colimado e tem uma cintura de 1 cm entre os pontos  $1/e^2$  da curva da distribuição de luz medida e plotada na Fig.6.14.

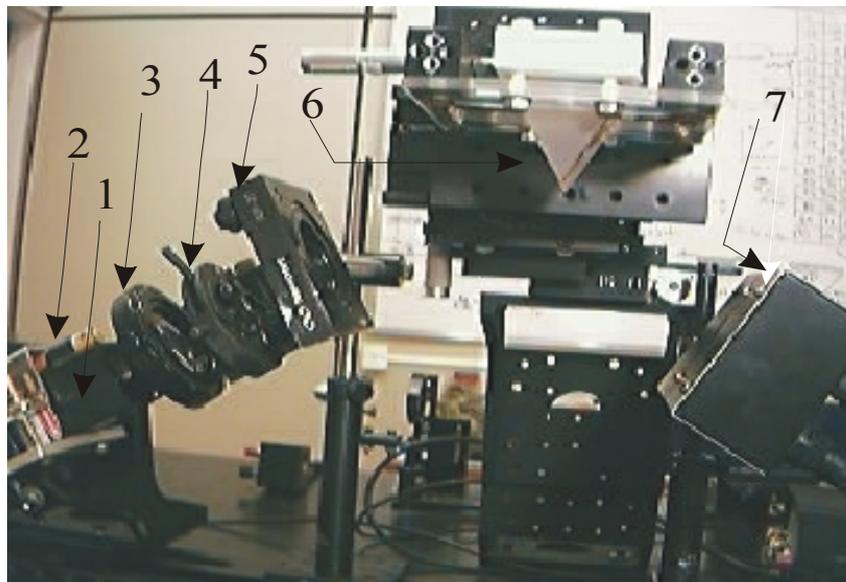


Fig.6.13 Espectrômetro de RPS em  $\lambda = 975.1\text{nm}$ , no modo focalizado.

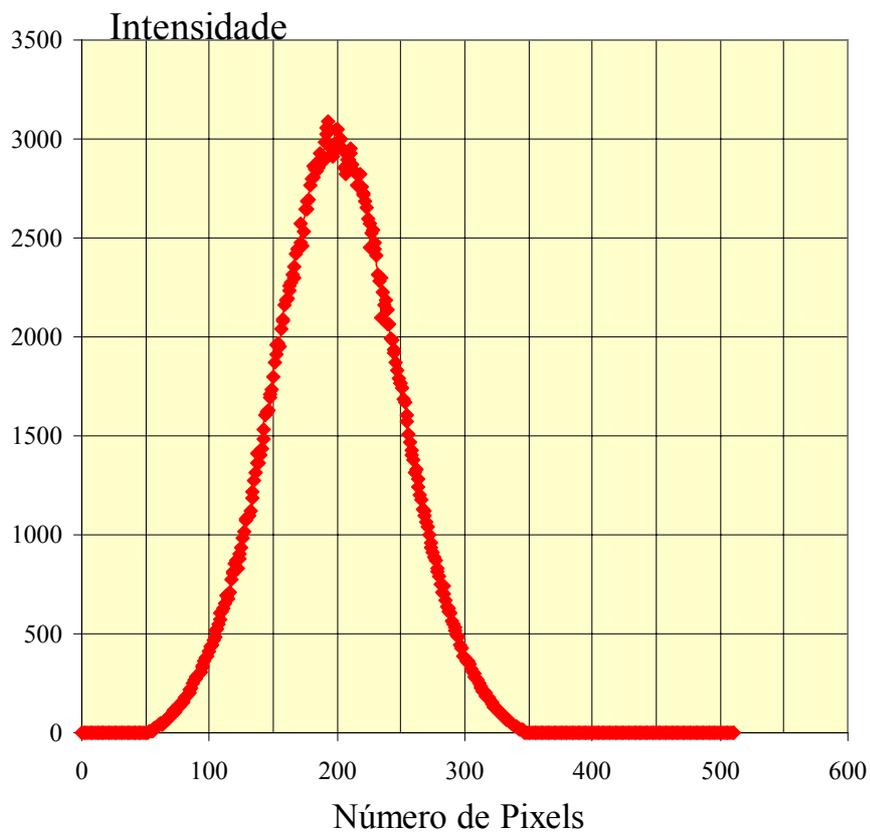


Fig.6.14 Distribuição de luz irradiada pelo laser infravermelho. Essa distribuição corresponde a uma cintura do feixe de 1 cm.

Nas Figs.6.15 e 6.16 ilustramos as interfaces gráficas para aquisição dos dados em medidas com feixe focalizado. A interface gráfica mostrada na Fig.6.15 permite observar a distribuição da intensidade do feixe refletido do prisma. A variação dessa intensidade ao longo da distribuição é exibida diretamente na tela do computador, conforme ilustrado na Fig.6.15. A seleção de um dado pixel da distribuição é diretamente indicada na porção direita da tela à medida que o ponteiro do mouse é movido ao longo da distribuição. Com um click do mouse o pixel de interesse é selecionado.

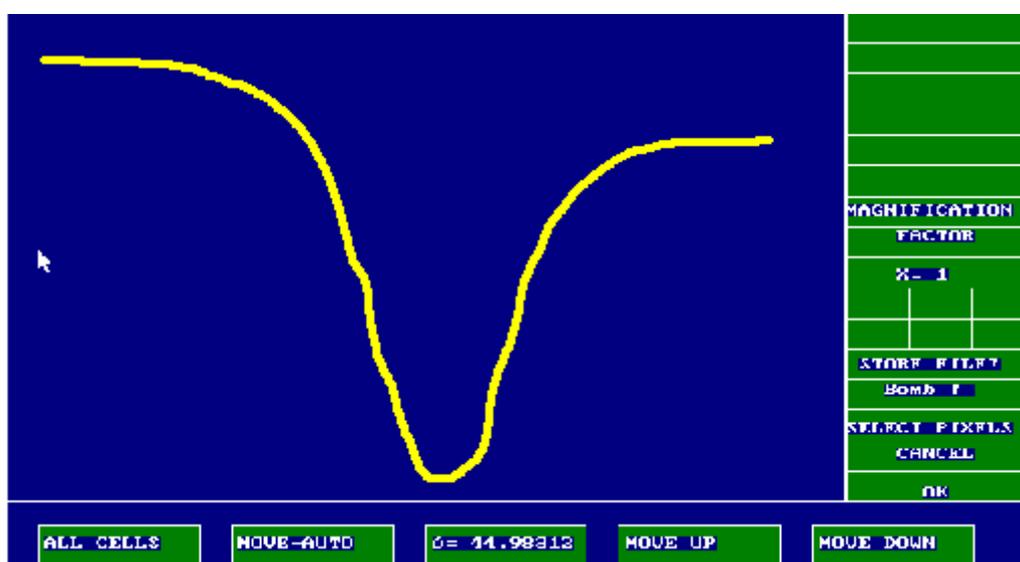


Fig.6.15 Interface gráfica para medir a distribuição de luz refletida do prisma do espectrômetro.

Após a seleção do pixel de monitoramento é ativada a tela de exibição de eventos em tempo real, indicada na Fig.6.16. Nessa interface é possível selecionar, entre outras coisas, o tempo de aquisição, arquivos de saída, fatores de escala para exibição dos registros, etc. Uma vez que esses parâmetros de registro estejam selecionados, amostras podem ser inseridas na célula de reação e o processo de monitoramento e registro de dados pode ser iniciado pelo usuário com o acionamento do botão *start* localizado na porção superior direita da tela da Fig.6.16. Nessa tela é também possível gravar as curvas de ressonância antes e depois de uma determinada etapa de reação, para medição

precisa do deslocamento angular produzido pela adsorção de proteínas na superfície metálica.

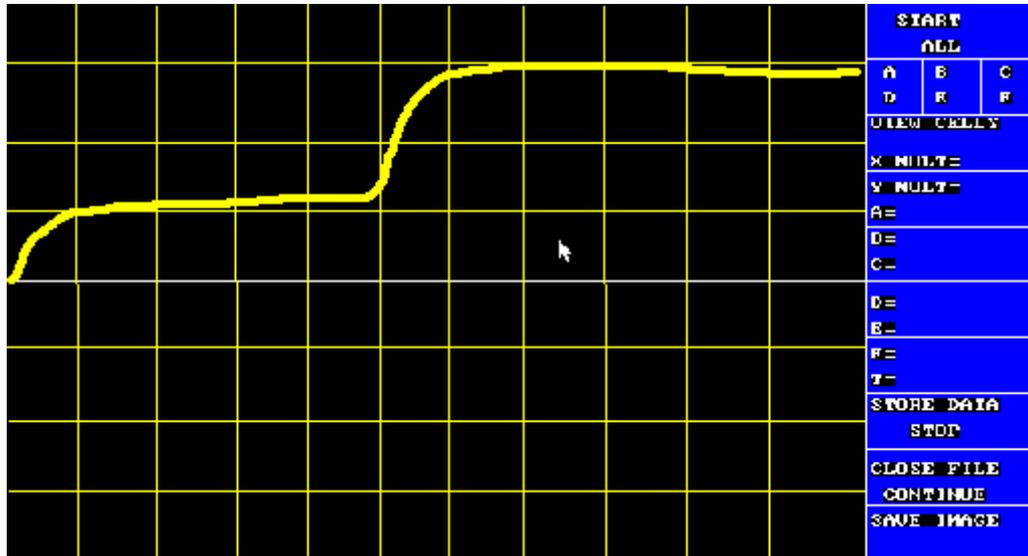


Fig.6.16 Interface gráfica para monitorar o pixel da curva de RPS.

O feixe é focalizado na superfície metálica através de uma lente convergente de distancia focal  $f = 20$  cm posicionada paralela à face do prisma. Inicialmente o feixe é alinhado com o eixo óptico normal à face externa do prisma e posteriormente posicionado na extremidade superior como ilustrado na Fig.6.17.

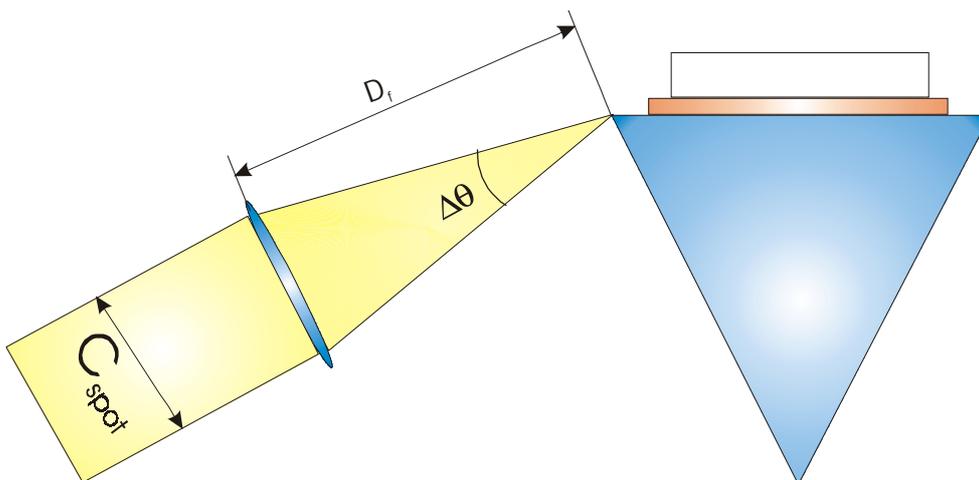


Fig.6.17 Posicionamento do foco do feixe na extremidade superior do prisma.

Completada essa fase, o prisma é deslocado para a esquerda através de um parafuso micrométrico até atingir a posição central da célula localizada no centro dessa

face conforme a Fig.6.18. Na secção 6.4 iremos discutir a metodologia de posicionamento do feixe infravermelho na posição central da placa multicélulas.

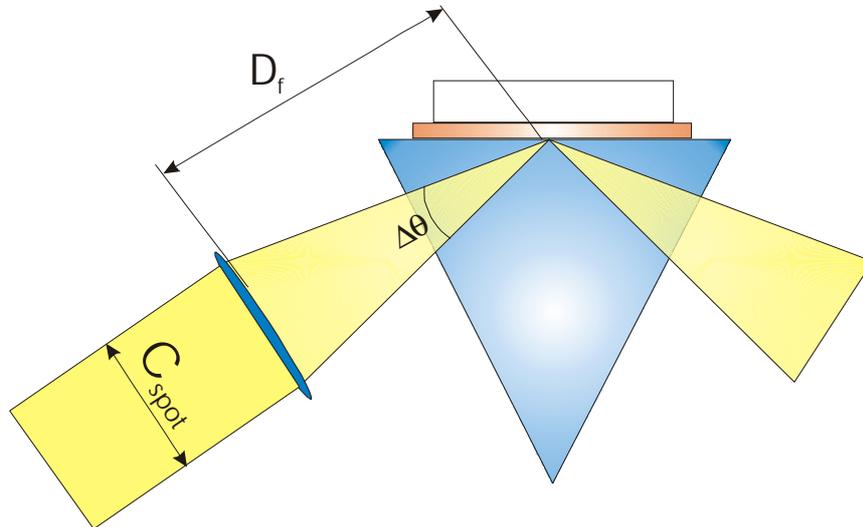


Fig.6.18 Focalização do feixe infravermelho na superfície do prisma

Com auxílio do cartão sensível ao infravermelho é possível visualizar o feixe na face oposta. Para localizar a ressonância o prisma é rotacionado no sentido horário  $\beta < 0$  até a posição de ressonância que pode ser detectada tanto com o cartão, com o sensor de imagem, com *webcam* ou com a *IR-Viewer*.

### 6.3.2 Dificuldades em Realizar as Medidas na Montagem Focalizada

Além das dificuldades de visualização e focalização do feixe, a potência luminosa do laser infravermelho, operando acima da região de threshold foi suficiente para saturar o sensor de imagem, impedido a medição do sinal. Para resolver esse problema utilizamos dois polarizadores para reduzir a potência do laser. Contudo esse elemento no sistema causou também espalhamento da luz e contribuiu para diminuir a qualidade da distribuição de luz do feixe. A montagem com feixe focalizado exige também uma boa qualidade dos polarizadores para garantir uma boa qualidade da imagem associada à função reflectância. O polarizador no infravermelho disponível, contudo apresenta ranhuras e irregularidades em sua superfície que distorcem a

imagem, diminuindo o grau de polarização. Para efeito comparativo utilizamos um polarizador na região do visível de melhor qualidade para observar a RPS.

### **6.3.3 Resultados Experimentais no Ar**

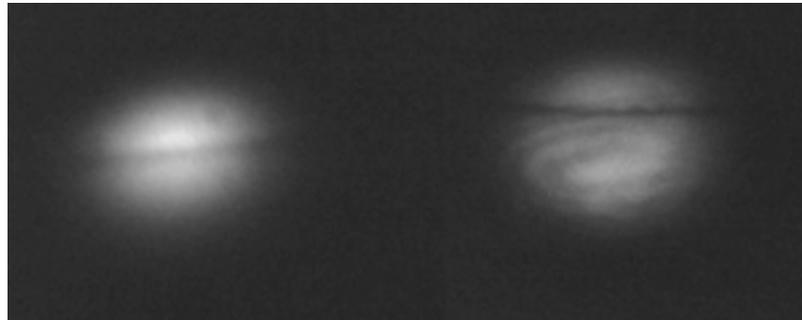
Os resultados experimentais investigados no ar foram coletados com uma *webcam* e com o sensor de imagem, usando diferentes polarizadores. A observação da RPS via *webcam* permite registrar a ressonância para uma possível extração de parâmetros através do tratamento de imagens. Por outro lado o sensor de imagem permite medir a distribuição da intensidade luminosa do feixe, possibilitando também a extração de parâmetros ópticos.

#### **6.3.3.1 Resultados Coletados com Webcam**

A *webcam* é um equipamento prático e sensível a radiação no infravermelho próximo. É utilizada em computadores para realizar comunicação interativa de imagens pela *internet*. Portanto, durante o processo experimental, uma *webcam* Genius foi usada para registrar o fenômeno de RPS com diferentes polarizadores permitindo observar a importância do uso de um bom polarizador para investigar RPS em sistemas com feixe focalizado.

A Fig.6.19a é uma foto da distribuição de luz refletida do feixe infravermelho na região de RPS para ouro exposto ao ar ambiente, usando um polarizador de boa qualidade na região do visível. Pode-se observar que a ressonância vista como uma linha escura horizontal da distribuição de luz, não está bem definida, apresentando bastante luminosidade na linha de ressonância. Por outro lado na Fig.6.19b apresentamos uma imagem obtida com polarizador específico para o infravermelho, mas que no entanto exibiu alguns aranhões em sua superfície. Nessa foto percebe-se uma boa definição da linha de ressonância, mas uma qualidade da distribuição luminosa pobre nas margens superior e inferior da ressonância. A presença desses problemas causa dificuldades na observação do sinal através do sensor de imagem, conforme veremos na próxima seção.

Quanto mais ruído espacial tivermos no sinal detectado, mais difícil se torna a análise e a caracterização da ressonância.



(a)

(b)

Fig.6.19 Foto da RPS no ar na montagem da Fig.6.11 com polarizador especificado para operação no visível (a) e no infravermelho(b).

Outro importante aspecto que pode ser observado usando a *webcam* é o deslocamento da ressonância com a variação do ângulo de incidência  $\beta$ . Na Fig.6.20 apresentamos o deslocamento da imagem através da linha de ressonância, obtido girando o prisma através do parafuso micrométrico.

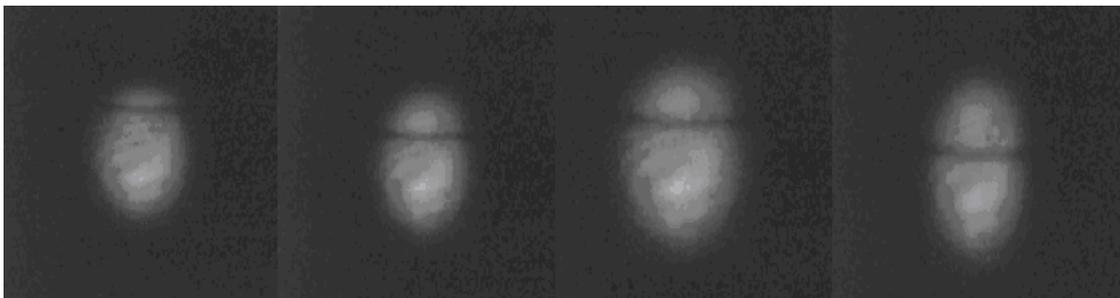


Fig.6.20. Deslocamento angular da imagem refletida através da linha de ressonância para a estrutura SF2-BK7-Metal-Ar em  $\lambda=975,1$  nm.

### 6.3.3.2 Resultados Coletados com Sensor de Imagem

Conforme mencionado na seção anterior, o sensor de imagem capta a distribuição da intensidade luminosa do feixe e permite extrair diversos parâmetros ópticos. Conhecendo a variação angular do feixe incidente  $\Delta\beta$  é possível mapear a distribuição da

intensidade em função da posição espacial do feixe nos 512 fotodiodos do sensor. Na Fig.6.21 temos uma medida experimental da distribuição luminosa do laser infravermelho na posição de ressonância no ar. Esse resultado foi obtido usando um polarizador no visível, obtendo-se uma melhor representação da ressonância.

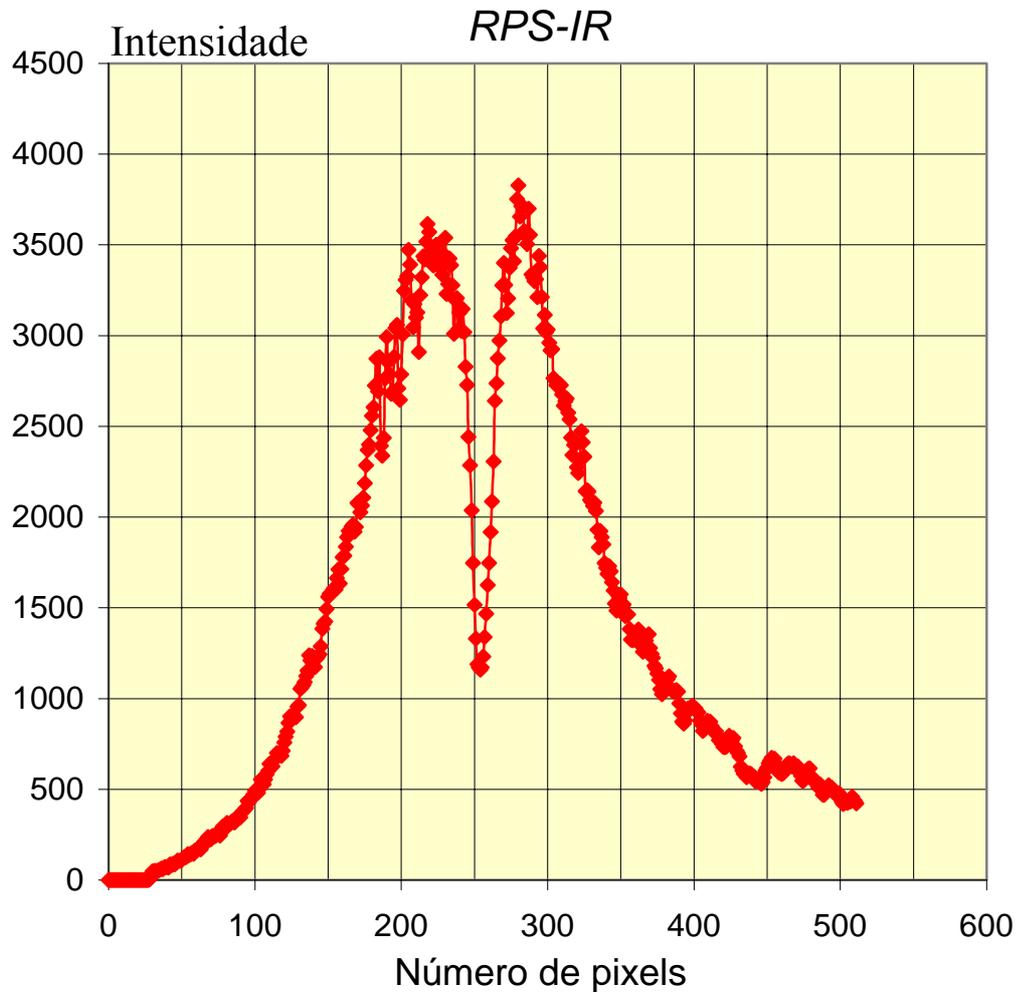


Fig.6.21 Curva de RPS para ouro exposto ao ar ambiente, obtida com sensor de imagem.

#### 6.3.4 Resultados Experimentais do Efeito de RPS na Configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura

O processo de medidas realizadas com o filme metálico em contato com água pura se assemelha às medidas realizadas no ar. A diferença é o preenchimento da macrocélula da Fig.6.8 com água e a posição do ângulo de ressonância que é mais

próxima de  $60^\circ$ . Analogamente aos experimentos conduzidos com o filme metálico exposto ao ar ambiente, a curva de RPS foi observada usando a *webcam* e o sensor de imagem. Na Fig.6.22a e 6.22b temos respectivamente as imagens de RPS visualizadas com a *webcam* com os polarizadores especificados para as faixas do visível e do infravermelho, respectivamente.

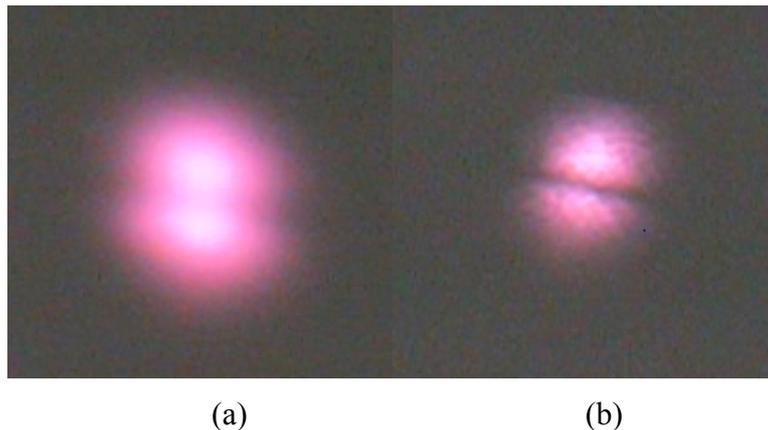


Fig.6.22. Foto de linha de RPS na configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura com polarizador especificado para operação no visível(a) e no infravermelho(b).

Com esses resultados podemos concluir a importância da faixa espectral de operação do polarizador bem como a sua qualidade. Na Fig.6.23 temos o deslocamento da ressonância ao longo da imagem do feixe. Esse resultado foi observado usando polarizador especificado para o visível.



6.23. Deslocamento angular da imagem refletida do prisma através da linha de RPS na configuração SF2-BK7-Cr-Au-átua pura.

Na Fig.6.24 temos o resultado da curva de RPS na configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura, obtida com o sensor de imagem. O programa de aquisição de dados permite monitorar no tempo qualquer ponto da curva medida pelo sensor de imagem e traçar a variação da reflectância em função do tempo e exibir as informações graficamente na tela do computador. Esse programa portanto é uma poderosa ferramenta para realizar esse tipo de análise.

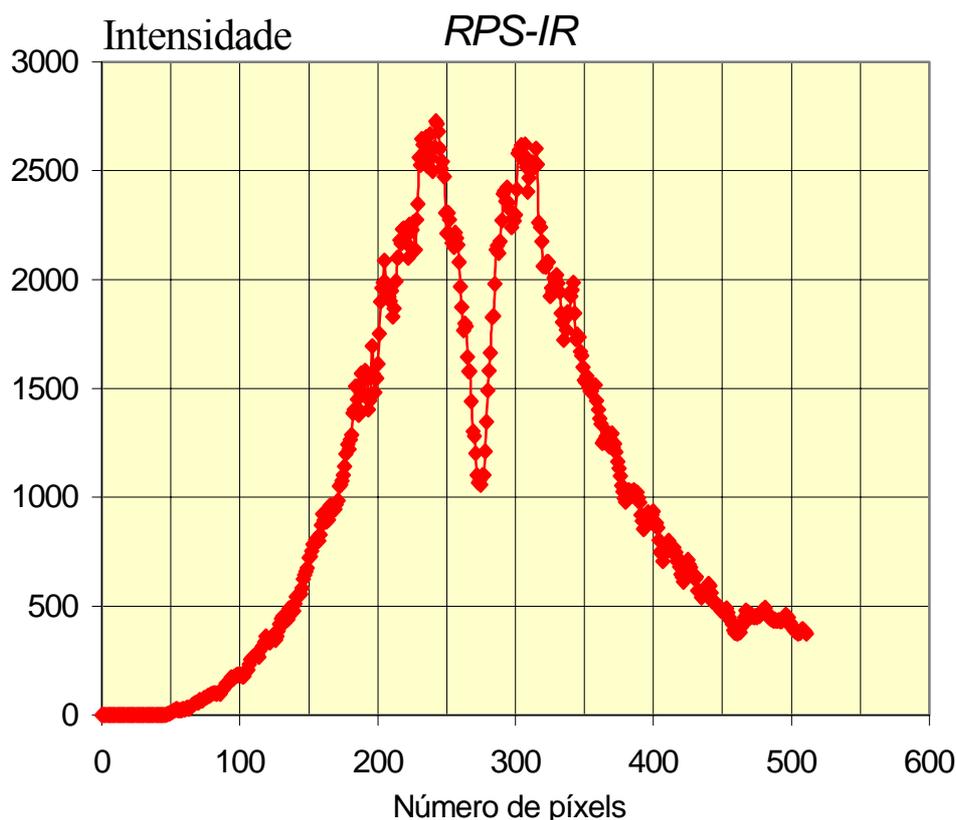


Fig.6.24 Curva de RPS obtida com sensor de imagem na configuração SF2-BK7-Cr-Au-água pura.

Nesta dissertação não foram realizadas medidas de cinética de reação antígeno-anticorpo no infravermelho, devido a falta de polarizadores de boa qualidade. Contudo a partir da implementação do sistema óptico infravermelho e do sistema de aquisição propomos uma metodologia de posicionamento para emprego do sistema para esse tipo de aplicação, conforme discutido a seguir.

### 6.4. Metodologia de Posicionamento para Observação da Cinética de RPS com Feixe Focalizado

Devido à dificuldade de observação visual direta do feixe infravermelho na superfície metálica de cada célula de reação é necessário desenvolver-se um procedimento de calibração das coordenadas de todas as células da placa multicélulas para que, dado um ângulo de incidência arbitrário, seja possível utilizar as escalas dos micrômetros de translação do sistema de suporte do prisma de acoplamento, para a perfeita localização do centro da célula sob teste. Esse procedimento é desenvolvido a seguir.

#### 6.4.1 Metodologia de Posicionamento

A metodologia de posicionamento requer inicialmente que sejam determinadas para um dado ângulo de incidência, as leituras dos parafusos micrométricos que transladam o prisma ao longo do plano do substrato de tal forma que o feixe infravermelho atinja o centro da célula central da placa multicélulas. Uma vez determinadas essas coordenadas, com o conhecimento da distância entre células, e da espessura do substrato, todos os centros das superfícies metalizadas externas das células podem ser localizados através do sistema de translação do prisma. A metodologia de localização da célula central para um dado ângulo de incidência pode ser sumarizada de acordo com o seguinte procedimento:

Etapa 1: Inicialmente o prisma é posicionado com o baricentro coincidente com o centro do estágio de rotação. O estágio de rotação é ajustado de forma que a face superior do prisma fique alinhada no plano horizontal

Etapa 2: A abertura da íris do sistema óptico é reduzida de forma a se produzir um feixe colimado.

Etapa 3: O feixe infravermelho é alinhado de forma a produzir incidência normal na face AB do prisma, conforme ilustrado na Fig.6.25.

Etapa 4: O prisma é transladado na direção horizontal até que o feixe atinja o vértice A mostrado na Fig.6.25.

Etapa 5: Para o caso presente de um prisma equilátero de lado  $L$ , a face superior do prisma será iluminada pelo feixe colimado se o sistema sofrer uma translação para a esquerda de  $L/2$ . Nesse ponto o feixe incide na direção normal à face  $AB$  e atinge o centro da face superior.

Etapa 6: Quando o estágio de rotação sofre um giro de  $\theta$  graus no sentido horário da Fig.6.25 é necessário determinar-se de que forma o prisma tem de ser transladado para que o feixe volte a atingir a célula central. Isso requer inicialmente a determinação da coordenada do ponto central do prisma. A formulação teórica para determinação do grau de translação do prisma é feita no Apêndice e descrita a seguir.

#### 6.4.2 Posicionamento do Feixe na Célula Central

A modelagem de um sistema de ajustes que permita o feixe de luz retornar à sua posição inicial (na célula central) após a rotação do prisma e a varredura de todas as células adjacentes é extremamente importante, pois nesse tipo de sensor utilizamos luz na região do infravermelho, cujo ponto focal na superfície externa metálica não pode ser visualizado diretamente.

Analisando a geometria da Fig.6.25 observamos que existe apenas uma distância  $d$  ao longo da superfície do prisma, na qual um feixe incidente fazendo um ângulo  $\theta$  com a normal, atinja a posição central superior do prisma, indicada pelo ponto  $D$  da Fig.6.25, distante do vértice  $A$  de  $L/2$ . Para incidência normal à face, i.e.,  $\theta = 0^\circ$ , e para o nosso sistema que utiliza um prisma equilátero com  $\alpha = 60^\circ$ , o feixe atinge a face  $AB$  a uma distância  $L/4$  do vértice  $A$ , conforme ilustrado na Fig.6.25. Após uma rotação de  $\theta \neq 0^\circ$  do prisma, a posição do feixe em relação ao vértice  $A$  deve ser ajustada de forma a garantir que o feixe atinja novamente o ponto  $D$ . O valor de  $d$  depende do ângulo de incidência  $\theta$ , considerado positivo para rotações do prisma no sentido horário, e negativo caso contrário.

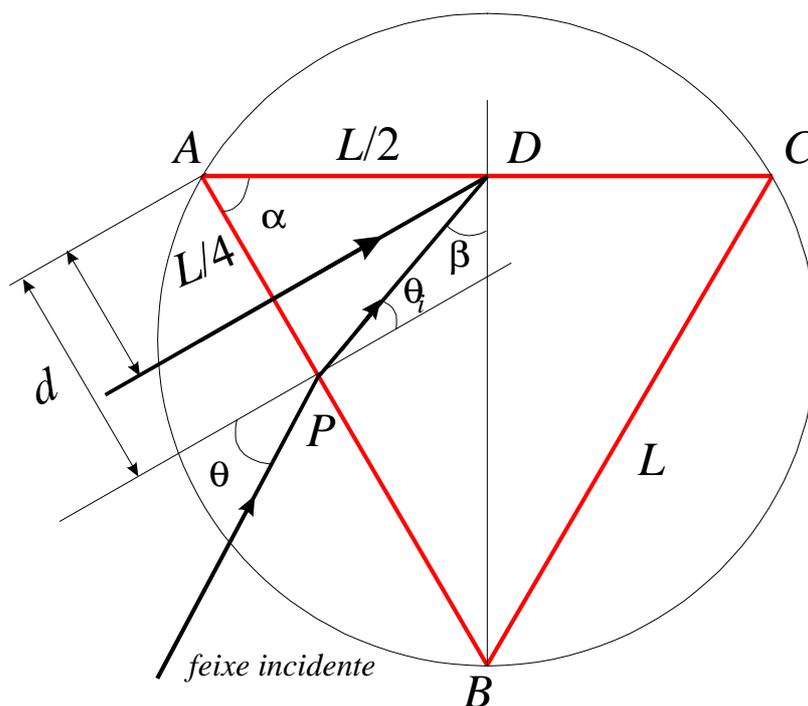


Fig.6.25 Posicionamento do feixe na região central da face superior do prisma (Ponto D).

Considerando o  $\triangle APD$  da Fig. 6.25, temos a seguinte relação

$$\frac{L}{2 \cos \theta_i} = \frac{d}{\cos \beta}$$

ou equivalentemente

$$d = \frac{\cos \beta}{\cos \theta_i} \frac{L}{2} \quad (6.10)$$

Para determinarmos explicitamente a dependência com o ângulo  $\theta$  do parâmetro  $d$ , consideramos a lei de Snell na face  $AB$ ,

$$\text{sen } \theta_i = \frac{\text{sen } \theta}{n}, \quad (6.11)$$

onde  $n$  é o índice de refração do prisma. Dessa relação tem-se

$$\cos \theta_i = \frac{1}{n} \sqrt{n^2 - \sin^2 \theta} . \quad (6.12)$$

Com base no triângulo *APD* da Fig.6.25 tem-se também

$$90 - \beta + 90 - \theta_i + \alpha = 180 ,$$

donde

$$\beta = \alpha - \theta_i ,$$

e portanto,

$$\cos \beta = \cos \alpha \cos \theta_i + \sin \theta_i \sin \alpha ,$$

e da lei de Snell, juntamente com a Eq.(6.11) tem-se

$$\cos \beta = \frac{1}{n} \left( \cos \alpha \sqrt{n^2 - \sin^2 \theta} + \sin \alpha \sin \theta \right) . \quad (6.13)$$

Inserindo as Eqs.(6.12) e (6.13) obtemos

$$d = \frac{L}{2} \left[ \cos \alpha + \frac{\sin \alpha \sin \theta}{\sqrt{n^2 - (\sin \theta)^2}} \right] , \quad (6.14)$$

ou equivalentemente, considerando o nosso caso específico em que  $\alpha=60$  a Eq.(6.14) pode ser posta na forma

$$d = \frac{L}{4} \left[ 1 + \frac{\sqrt{3} \sin \theta}{\sqrt{n^2 - (\sin \theta)^2}} \right] . \quad (6.15)$$

Embora sabendo a distância  $d$  que se deve posicionar o feixe após a rotação  $\theta$ , o problema ainda não está resolvido. Quando o prisma sofre uma rotação, o feixe, que antes estava posicionado à uma distância  $L/4$  do vértice, desloca-se para um ponto  $P'$ , como está ilustrado na Fig.6.26.

Portanto é necessário determinar a nova distância  $d'$  entre o ponto  $P'$  e o vértice  $A'$ , para uma vez conhecido  $d$  da Eq.6.15, determinar o quanto o prisma deve ser deslocado ao longo da direção  $x'$ , indicada na Fig.6.26, para que o feixe atinja novamente o ponto  $D'$ . O deslocamento do prisma implica em posicionar o feixe a uma distância  $d$  do vértice  $A'$  mantendo constante o ângulo  $\theta$ . O cálculo da distância  $d'$  é realizado analiticamente no Apêndice, através da equação das retas envolvidas no problema. Na Fig.6.26 estão apresentados alguns parâmetros relevantes à solução do problema. Esses parâmetros são:

- o ângulo  $\gamma = \alpha/2 = 30^\circ$  formado entre a mediatriz e um dado lado do prisma
- a distância  $b$  do baricentro do prisma a qualquer dos vértices, diretamente relacionada a dimensão  $L$  de cada lado por

$$b = \frac{L}{\cos \gamma} \quad (6.16)$$

- o ângulo  $\theta$  de rotação do prisma. Esse parâmetro é positivo para rotações no sentido horário, a partir da direção normal à face  $AB$ , e negativo, caso contrário
- o ponto  $P$ , que corresponde à interseção do feixe incidente com o prisma  $ABC$
- o ponto  $P'$ , que corresponde à interseção do feixe incidente com o prisma  $A'B'C'$
- o sistema de coordenadas  $xy$ , com origem  $O$  no baricentro de ambos os triângulos
- a direção  $x'$  ao longo da face  $A'C'$  do triângulo  $A'B'C'$ . Translações no sentido de crescimento de  $x'$  são consideradas positivas.

Conforme mostrado no Apêndice, a distância  $d'$  indicada na Fig.6.26 pode ser posta na forma:



$$\Delta d' = \frac{b}{4 \cos \theta} \left[ H(\theta) - \cos \theta \left( 2 \cos \gamma + \frac{3 \operatorname{sen} \theta}{\sqrt{n^2 - (\operatorname{sen} \theta)^2}} \right) \right] \quad (6.21)$$

Uma vez obtido o parâmetro  $\Delta d'$ , a translação que deve ser realizada na direção  $x'$  pode ser calculada. A Fig.6.27 ilustra como essa translação pode ser obtida. No exemplo aí mostrado, a distância  $d'$  é menor do que a distância  $d$  necessária para se atingir o ponto central do prisma. O triângulo tracejado representa a posição original do prisma e aquele desenhado em linha contínua, a posição após uma translação no sentido de diminuição da coordenada  $x'$ . Com essa translação o feixe refratado atinge novamente o ponto central  $D$  do prisma. Note-se que  $\Delta x'$  e  $\Delta d'$  têm o mesmo sinal. Considerando o triângulo  $PQP'$  indicado na Fig.6.27, tem-se a relação trigonométrica

$$\frac{\Delta x'}{\cos \theta} = \frac{\Delta d'}{\operatorname{sen}(\theta + \gamma)},$$

e utilizando-se a Eq.(6.21), obtém-se

$$\Delta x' = \frac{b}{4 \operatorname{sen}(\theta + \gamma)} \left[ H(\theta) - \cos \theta \left( 2 \cos \gamma + \frac{3 \operatorname{sen} \theta}{\sqrt{n^2 - (\operatorname{sen} \theta)^2}} \right) \right]. \quad (6.22)$$

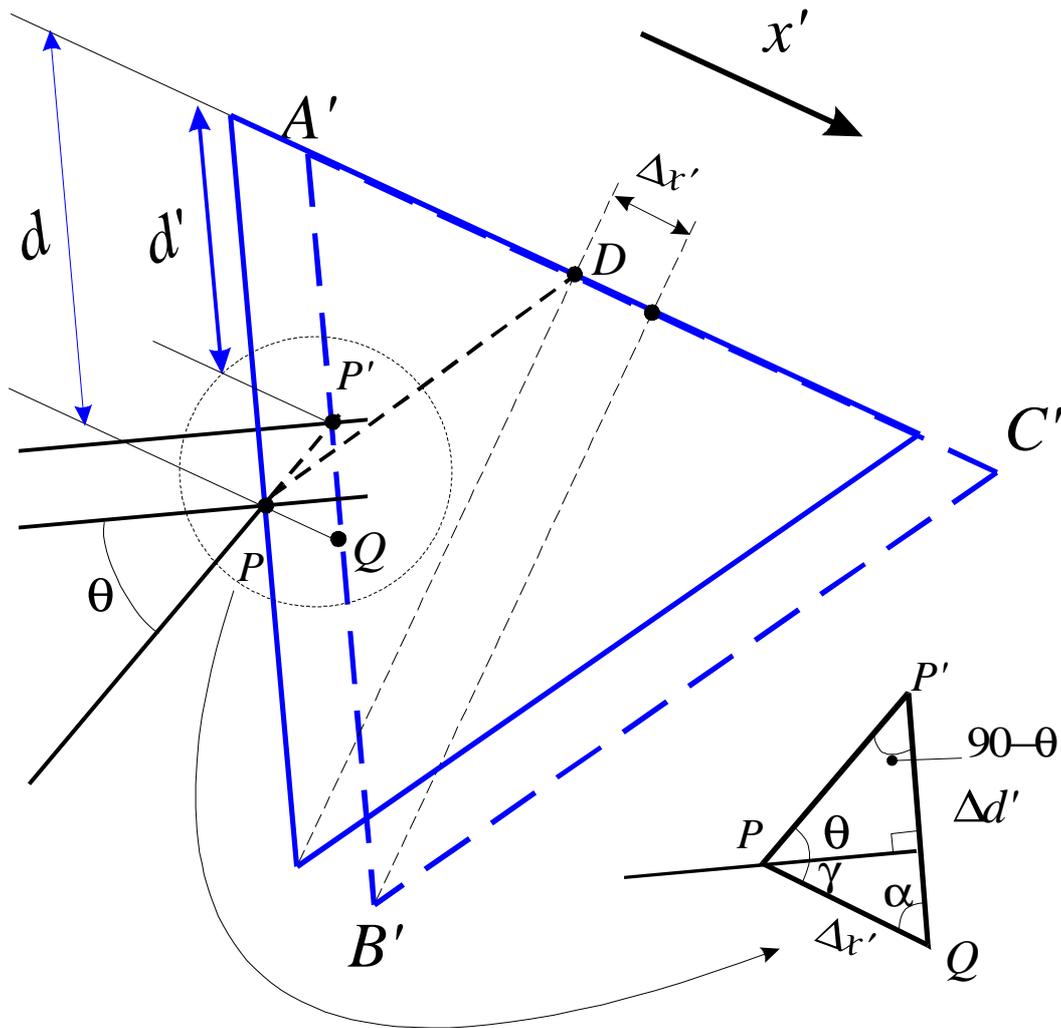


Fig.6.27 Deslocamento do prisma para reposicionamento do feixe.

A Fig. 6.27 mostra a dependência da correção  $\Delta x'$  com o ângulo externo  $\theta$ . Utilizando os parâmetros do prisma do sistema óptico, mostrados na Tabela 6.3, pode-se fazer uma aproximação polinomial de quarta ordem para o parâmetro  $\Delta x'$  na faixa angular  $-10^\circ < \theta < 10^\circ$ . O polinômio obtido fornece um erro relativo máximo de 2% para esse parâmetro e é dado por

$$\Delta x'(\theta) = -6,36 \times 10^{-3} \theta^4 + 0,194 \theta^3 - 8,812 \theta^2 + 39,645 \theta, \quad (6.23)$$

com  $\theta$  expresso em graus e  $\Delta x'$  em  $\mu\text{m}$ .

Tabela 6.3 Valores de alguns parâmetros do sistema óptico.

Parâmetro	Valor
$L(\text{mm})$	50
$\gamma(\text{graus})$	30
$n_{\text{SF2}}(\lambda=975,1 \text{ nm})$	1,6304
$n_{\text{BK7}}(\lambda=975,1 \text{ nm})$	1,50786
$D_{\text{BK7}}(\text{mm})$	3

É possível perceber na Fig.6.28 que os pontos obtidos através da Eq.(6.22) praticamente coincide com os pontos do polinômio da Eq.(6.23).

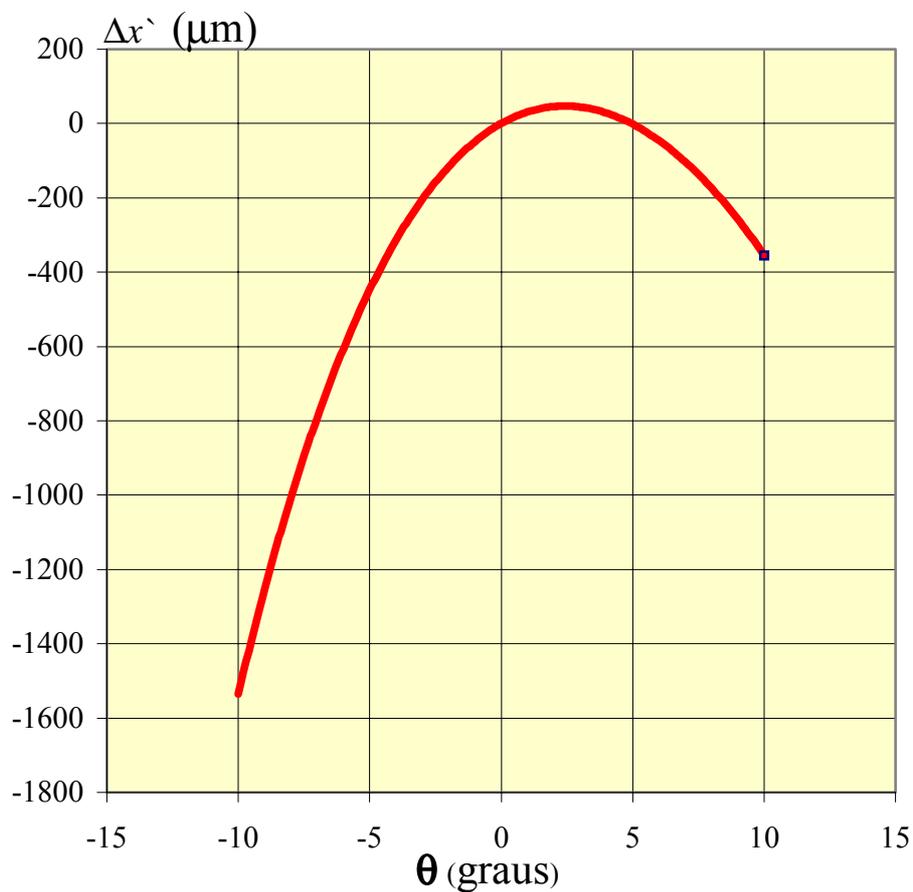


Fig.6.28 Gráfico da curva  $\Delta x'$  da Eq.(6.22) e da curva polinomial  $\Delta x'(\theta)$  da Eq.(6.23).

Acrescentando ao sistema o substrato de vidro *BK7*, cujos parâmetros estão indicados na Tabela 6.3 e representando o índice de refração e espessura pelos parâmetros  $n_s$  e  $D_s$ , respectivamente o feixe que antes estava posicionado no centro do prisma sofre um deslocamento positivo  $\Delta x''$ , não atingindo assim a célula central. Esse é o sistema real para posicionamento do feixe na célula central como ilustrado na Fig.6.29.

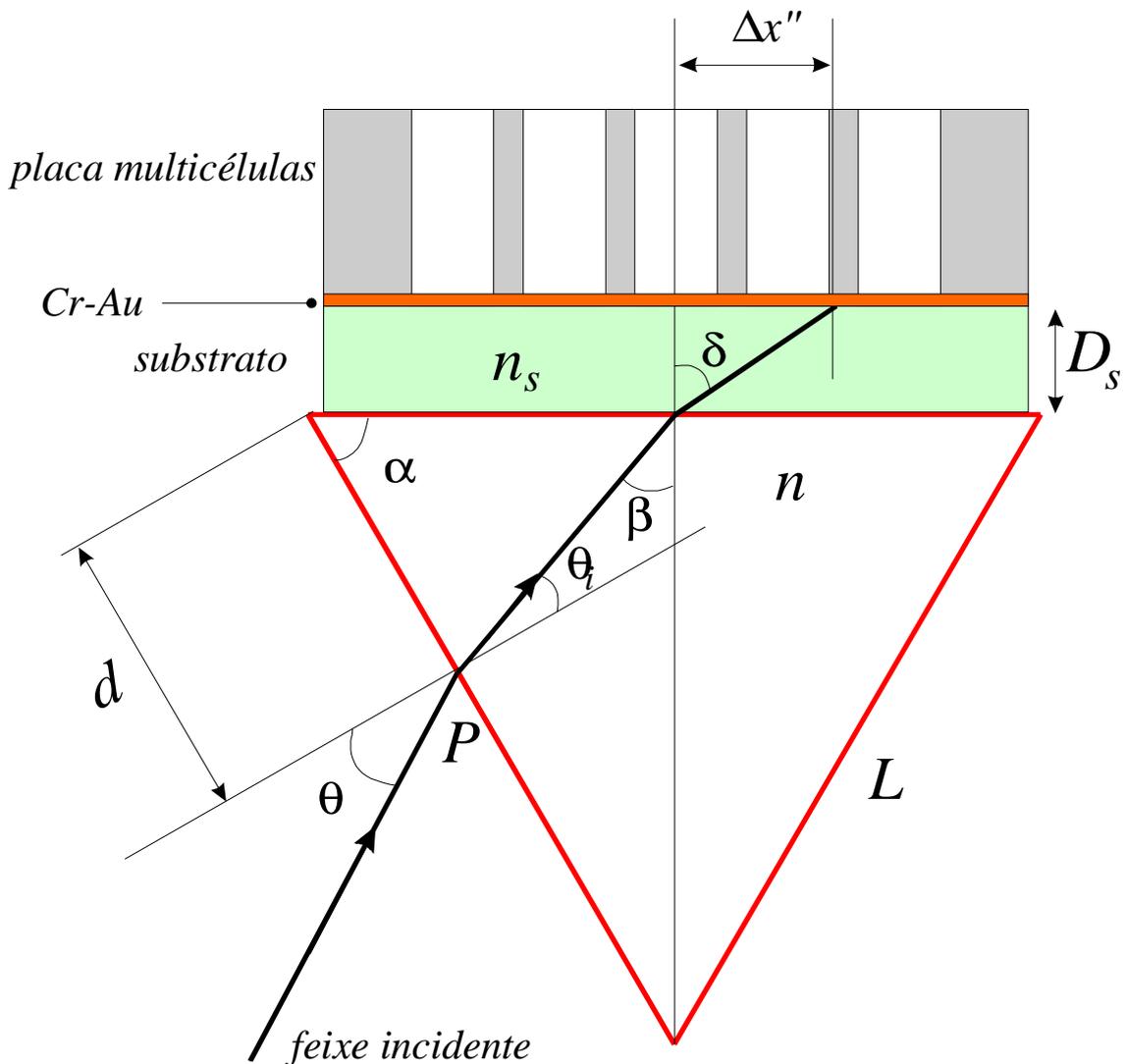


Fig.6.29 Configuração para determinação da correção da posição do prisma devido a espessura do substrato.

O deslocamento no interior do prisma que o feixe deve sofrer para retornar a célula central é dado por

$$\Delta x'' = D_s \frac{\text{sen } \delta}{\cos \delta}.$$

Utilizando a lei de Snell na interface prisma-substrato, essa última expressão pode ser posta na forma

$$\Delta x'' = D_s \frac{n \text{sen } \beta}{\sqrt{n_s^2 - n^2 (\text{sen } \beta)^2}} \quad (6.23)$$

O termo  $\text{sen } \beta$  que aparece na Eq.(6.23) pode ser obtido diretamente da Eq.(6.13) e tem a forma

$$\text{sen } \beta = \frac{1}{2n} \left\{ \sqrt{3 \left[ n^2 - (\text{sen } \theta)^2 \right]} - \text{sen } \theta \right\}. \quad (6.24)$$

A Fig. 6.30 mostra a dependência da correção  $\Delta x''$  com o ângulo externo  $\theta$ . Utilizando os parâmetros do prisma e do substrato utilizados no sistema óptico, mostrados na Tabela 6.3, pode-se fazer uma aproximação polinomial de quarta ordem para o parâmetro  $\Delta x''$  na faixa angular  $-10^\circ < \theta < 10^\circ$ . O polinômio obtido fornece um erro relativo máximo de 2% para esse parâmetro e é dado por

$$\Delta x''(\theta) = 0,266\theta^4 - 3,662\theta^3 + 19,075\theta^2 - 352,65\theta + 8006, \quad (6.25)$$

com  $\theta$  expresso em graus e  $\Delta x''$  em  $\mu\text{m}$ .

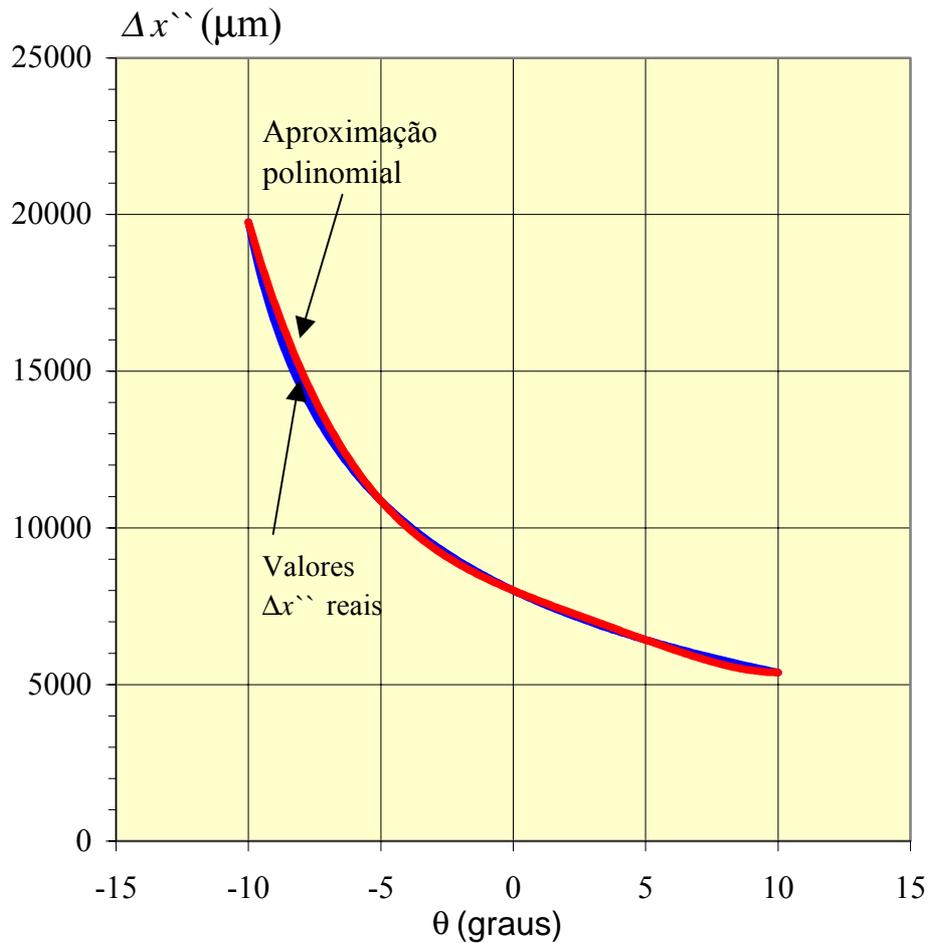


Fig.6.30 Gráfico da curva  $\Delta x''$  da Eq.(6.23) e da curva polinomial  $\Delta x''(\theta)$  da Eq.(6.25).

Portanto, sob condições iniciais de um prisma posicionado horizontalmente e um feixe de luz incidindo normal à face externa do prisma, atingindo a face superior na posição central (ponto  $D$ ) é possível girá-lo de um ângulo  $\theta$  e posicionar o feixe novamente na mesma posição central. Para isso faz-se inicialmente a correção  $\Delta x'(\theta)$  a partir da Eq.(6.23) e em seguida a correção  $\Delta x''(\theta)$  devido à espessura finita do substrato, a partir da Eq.(6.25). Equivalentemente ambas as correções podem ser adicionadas em uma única etapa para reposicionamento do prisma.

Fixado o feixe na célula central, o deslocamento do feixe para as células adjacentes é feito diretamente com os micrômetros de translação nas direções  $u$  e  $v$  ilustradas na Fig.6.31.

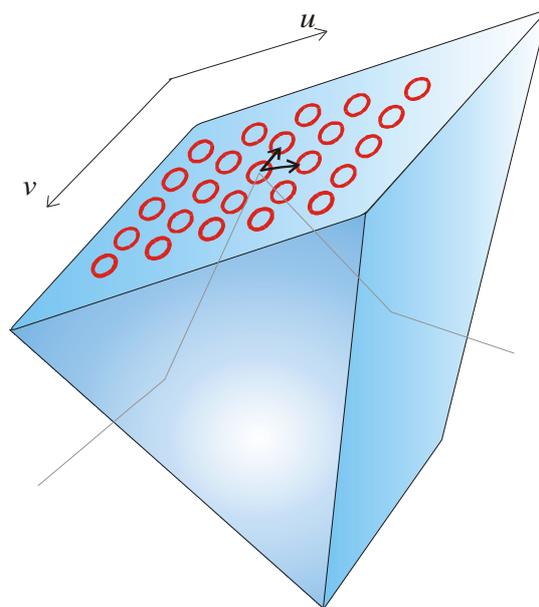


Fig.6.31 Geometria para varredura do feixe nas células de reação.

O espaçamento entre as células é constante, permitindo assim um mapeamento linear  $(u, v)$  da posição do feixe nas amostras. Na Fig.6.32 temos o mapa dos deslocamentos dos transladores para posicionar o feixe em cada célula a partir da posição central. Na Fig.6.33 é mostrada uma foto dos transladores para realizar a varredura nas células.

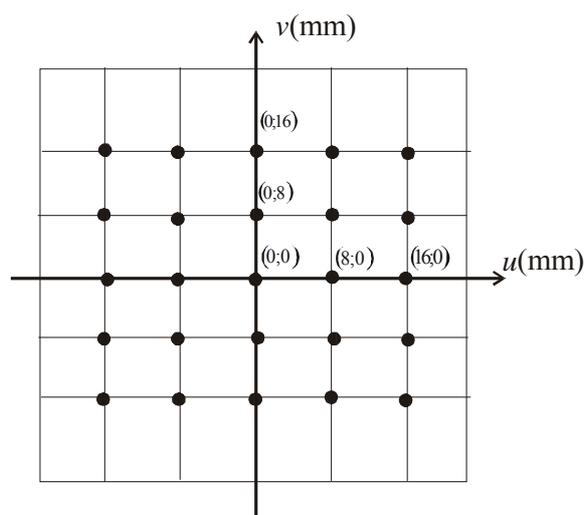


Fig.6.32 Mapa de posicionamento do feixe nas células.

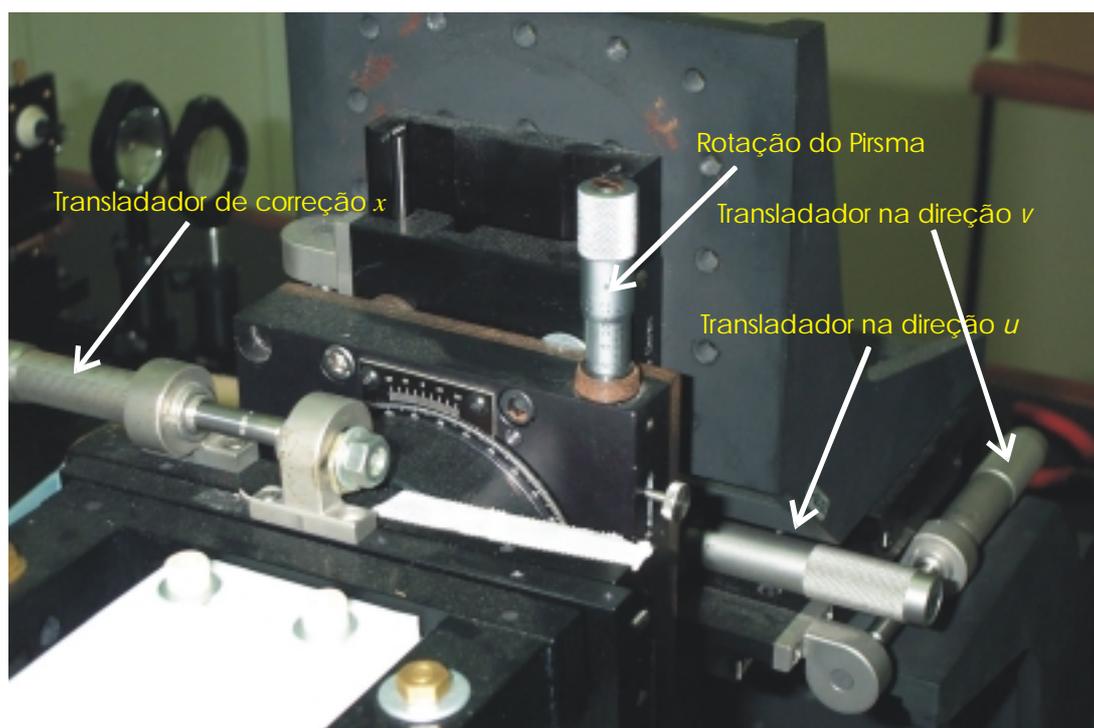


Fig. 6.33 Foto dos transladores para posicionamento do prisma.

#### 6.4.3 Metodologia para Observação da Cinética de Reações no Sistema Focalizado

Com o sistema ajustado e a ressonância localizada é possível observar a cinética de uma reação antígeno-anticorpo com auxílio do sensor de imagem e o sistema de aquisição de imagens. Como já mencionado anteriormente, a interface gráfica do programa mostra a curva de ressonância na tela do computador e permite ao usuário selecionar com o mouse os pontos da curva que serão monitorados durante a reação. O programa permite o monitoramento de dois sinais de reflectância simultaneamente. Cada sinal é a média de dois valores de reflectância, cujas coordenadas são selecionadas com o acionamento do mouse diretamente sobre a curva mostrada na tela do computador, conforme ilustrado na Fig.6.34.

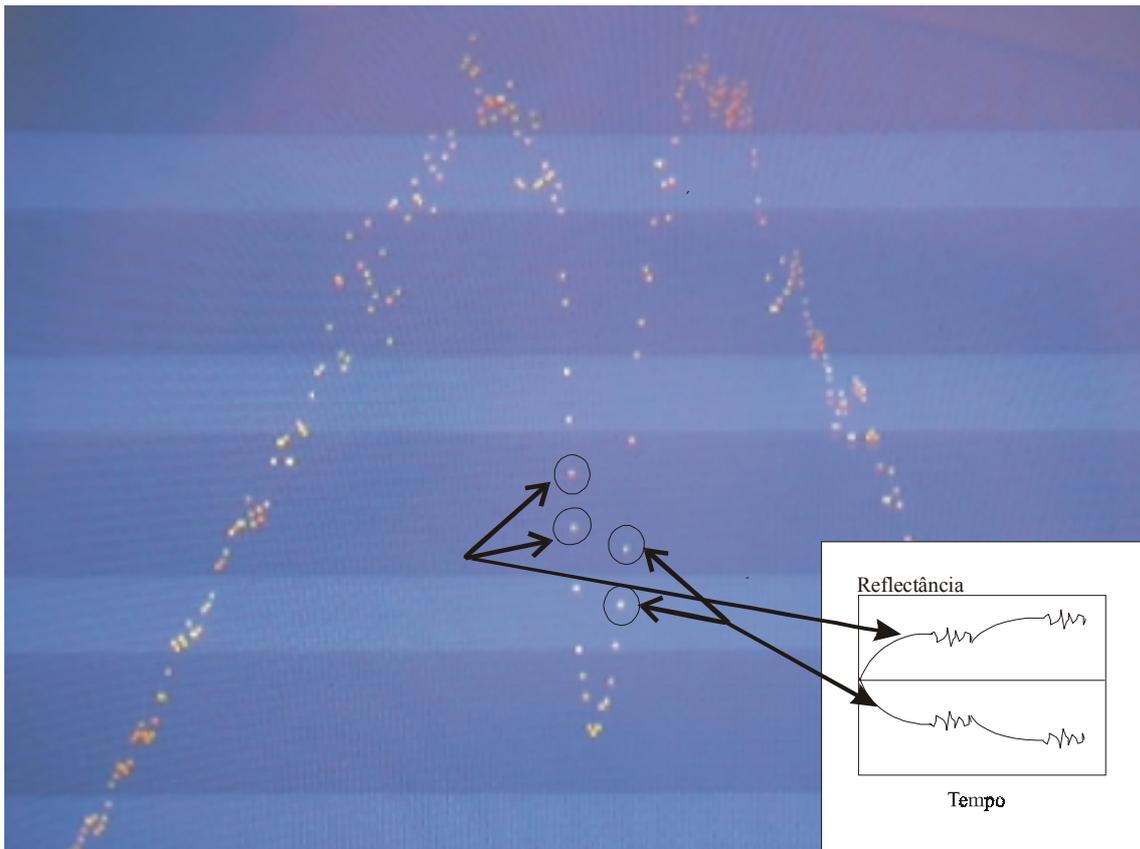


Fig.6.34 Porção da tela da interface gráfica onde é exibida a curva de RPS. As setas indicam pontos da curva selecionados para monitoramento.

A curva de ressonância mostrada na Fig.6.34 corresponde à curva experimental ilustrada na Fig.6.24, diretamente exibida na tela gráfica mostrada na Fig.6.15. Ao selecionar os quatro pontos aí indicados visualiza-se a variação da reflectância para cada lado da curva como ilustrado no canto inferior direito da Fig.6.34.

## 7. Conclusões e Perspectivas

A técnica de RPS tem sido empregada como uma forma alternativa para realização de imunoenaios[20,23,24], sem emprego de marcadores fluorescentes ou radioativos como é o caso dos testes ELISA e RIA. Isso permite observação direta, em tempo real, de reações biológicas e quantificação da cinética da reação, além de possibilitar a determinação das concentrações das macromoléculas envolvidos ou até mesmo a dimensão típica dessas macromoléculas, conforme investigado neste trabalho.

Um equipamento de análise em tempo real baseado no fenômeno de RPS foi desenvolvido pela multinacional *Pharmacia* em meados da década de 90, após serem investidos cerca de US\$ 1 bilhão em pesquisa e desenvolvimento e implantação de uma empresa subsidiária especialmente dedicada à comercialização do sistema final, batizado com a sigla BIACORE, e que é atualmente vendido por cerca de US\$ 100.000,00 [26]. Nesta dissertação de mestrado desenvolvemos algumas montagens e medidas experimentais com o objetivo de obter um ganho substancial de sensibilidade do efeito de RPS, com benefícios diretos para o desenvolvimento de novas gerações de equipamentos de análise de reações biológicas.

Desenvolvemos um reflectômetro utilizando um laser de HeNe e fizemos uma caracterização preliminar da precisão do sistema através da determinação de dois parâmetros de um prisma de vidro. Durante esse desenvolvimento propusemos dois métodos alternativos de obtenção de parâmetros. Ficou demonstrado que o emprego do método das correções diferenciais permite obter precisão de medição de índice de refração comparável àquela dos métodos tradicionais sem a necessidade de utilização de alta resolução angular, como é o caso, por exemplo, do método do desvio mínimo.

Em seguida implementamos uma montagem e um procedimento experimental para observação de RPS em  $\lambda = 632,8$  nm. Nessa fase do trabalho construímos um sistema integrado prisma/substrato/placa multicélulas para uso do efeito de RPS na observação direta de reações biológicas do tipo antígeno/anticorpo. Apesar de não podermos dispor, durante essa fase da pesquisa, de filmes metálicos de alta qualidade,

foi possível realizar estudos preliminares de técnicas de medição e de obtenção de parâmetros do filme. Além disso foi possível realizar as primeiras observações em tempo real de todas as etapas da reação direta entre IgG e anti-IgG, bem como confirmar o tamanho típico dessas macromoléculas através da medição da espessura do filme orgânico formado na superfície metálica ao final da última etapa de reação.

Na fase final de desenvolvimento do trabalho investigamos a possibilidade de ganho de sensibilidade através do emprego do efeito de RPS na região espectral em torno de  $\lambda = 1 \mu\text{m}$ . Durante essa etapa da pesquisa, novos filmes finos de ouro foram obtidos e um espectrômetro foi implementado para operação com diodo laser em  $\lambda = 975,1 \text{ nm}$ .

Obtivemos provavelmente as primeiras medidas registradas na literatura do efeito de RPS nesse comprimento de onda, para ouro exposto ao ambiente e em contato com água pura e verificamos que um ganho potencial de sensibilidade de cerca de uma ordem de grandeza é possível ao se variar o comprimento de onda de  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$  para  $\lambda = 975,1 \text{ nm}$ , conforme previsto teoricamente [7]. Com o emprego de uma *webcam* convencional e no modo focalizado de iluminação da superfície metálica, foi também possível realizar observações visuais diretas do efeito de RPS, que se manifestou como uma linha escura estreita, formada na distribuição de luz do feixe refletido da superfície.

Como parte final do trabalho, e dada a impossibilidade de visualização do ponto focal infravermelho ao longo da face metalizada do substrato, utilizada como elemento transdutor de reações imunológicas de superfície, propusemos um método analítico de posicionamento preciso do prisma de acoplamento que possibilita a localização de todas os pontos da placa multicélulas para um ângulo arbitrário de incidência do feixe de luz. Com a montagem focalizada em conjunção com o emprego de um sensor linear de imagens acoplado a um sistema de aquisição de dados, é possível monitorar pontos específicos da curva de RPS e utilizar o espectrômetro no desenvolvimento de imunossensores de alta sensibilidade.

Para futuros trabalhos sugerimos a verificação experimental da metodologia de posicionamento e o emprego de polarizadores de alta qualidade para operação no infravermelho. Isso irá evitar distorções e ruído espacial na distribuição de luz refletida da superfície sob teste. É possível também minimizar efeitos de interferência na distribuição de imagem, com o emprego de fontes de luz um pouco menos coerentes em  $\lambda \approx 1 \mu\text{m}$ , como novos LEDs disponíveis no mercado e que estão sendo confeccionados na configuração *pigtail*, no próprio Grupo de Fotônica da UFPE. O uso da configuração *pigtail* além de permitir uma distribuição de luz mais uniforme na saída da fibra, permitiria um nível de potência adequado à operação do sensor de imagem, sem a necessidade de emprego de atenuadores ao longo da linha óptica do espectrômetro. Além disso, nessa configuração o sistema seria muito mais compacto e flexível.

Finalmente, seria importante em próximo desenvolvimento dessa linha de pesquisa, implementar um sistema de fluxo laminar de reagentes na placa multicélulas e incorporar um modo automático de varredura do prisma, controlado por computador, de forma a permitir o monitoramento simultâneo de várias reações. Seria importante utilizar o espectrômetro para realização de medidas preliminares de cinética da reação IgG/anti-IgG e comparar os resultados com aqueles obtidos em  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ . Com isso será possível confirmar experimentalmente o ganho potencial de sensibilidade do sistema em  $\lambda = 975,1 \text{ nm}$  de forma a permitir o estudo de novas aplicações do efeito de RPS na análise de reações biológicas.

## Referências Bibliográficas

- [1] E. Fontana, "Surface plasma wave applications," PhD Thesis, Stanford University (1989).
- [2] W. P. Chen and J. M. Chen, "Use of surface plasma waves for determination of the thickness and optical constants of thin metallic films," *Journal of the Optical Society of America*, Vol. 71, No. 2, pp. 189-191 (1981).
- [3] A. J. Braundmeier and H. E. Tomascheke, "Observation of the simultaneous emission of roughness-coupled and optical-coupled surface plasmon radiation from silver," *Optics Communications*, Vol.18, No.3, pp.394-394 (1976).
- [4] A. S. Szabo, L. Stolz and R. Granzow, "Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA)," *Curr. Opin. Struct. Biol*, 5, pp. 699-705, 1995.
- [5] A. Otto, "Spectroscopy of surface polaritons by attenuated total reflection," *Optical Properties of Solids, New Developments*, B. O. Seraphin. Ed, North-Holland, Amsterdam (1975), Ch. 13.
- [6] E. Kretschmann, "Die Bestimmung optischer konstanten von Metallen durch Anregung von oberflächenplasmaschwingungen", *Zeitschrift Für Physik*, Vol 241, pp. 313-324(1971)
- [7] E. Fontana and José Otavio Marciel Neto, "Thickness optimization of metal films for the development of surface plasmon based sensors", a ser publicado.
- [8] J. F. H. Nicholls, B. Henderson, B. H. T. Chai, "Accurate determination of the indices of refraction of nonlinear optical crystals", *Applied Optics*, Vol. 36, No. 33, pp. 8587 – 8594 (1997)
- [9] B P Chandra, S C Bhaiya, "A simple, accurate alternative to the minimum deviation method of determining the refractive index of liquids", *Am. J. Phys.*, Vol. 51, No. 2, pp.160-161 (1983).

[10] S. M. Mian, A. Y. Hamad and J. P. Wicksted, "Refractive index measurement using a CCD," *Applied Optics*, Vol. 35, No. 34, pp. 6825-6826, (1996).

[11] Rajeev Gupta et al., "Absolute refractive indices and thermal coefficients of fused silica and calcium fluoride near 193 nm", *Applied Optics*, Vol. 37, No. 25, pp. 5964-5968 (1997).

[12] Hiroyuki Hattori et al., "Using minimum deviation of a secondary rainbow and its application to water analysis in a high-precision, refractive-index comparator for liquids," *Applied Optics*, Vol. 36, No. 22, pp. 5552-5556 (1997).

[13] Eugene Hecht, *Optics*, 2<sup>nd</sup>. Ed., (Addison-Wesley Pub.Co.Inc., USA, 1987), pp. 94-107.

[14] T. Turbadar, "Complete absorption of light by thin metal films," *Proc. Phys. Soc. London*. 73,40(1959).

[15] J. D. Jackson, "Classical Electrodynamics," 2nd edition, Jonh Wiley & Sons, New York (1975).

[16] E. Fontana, "Fundamentos de óptica e propagação da luz", notas de curso, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica- UFPE, Recife-Brasil(1999).

[17] *Handbook of Chemistry and Physics*, 67<sup>th</sup> .Edition , CRC Press, pp. E377-392(1986-1987).

[18] M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*, 6<sup>th</sup> ed. (Pergamon, Oxford, UK, 1980), pp. 177-179.

[19] Janeway Jr, Charles A, "Imunologia: O sistema imunológico na saúde e na doença," Trad. Manuel May Pereira e Walkiria Settineri, 2 edição, Porto alegre: Artes médicas, 1997.

- [20] E. Fontana, R. H. Pantell and S. Strober, "Surface plasmon immunoassay," *Appl. Optics*, 29 (31), pp.4694-4704, 1990.
- [21] Abbas, AK; Litchman, A. H;Pober, J.S, "Cellular and Molecular Immunology," Philadelphia, W. B. Saunders, 1994. 2nd ed.
- [22] Ferreira, A Walter, Ávila, Sandra L. M. "Diagnóstico Laboratorial," Editora: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ,1996.
- [23] R. J. Fisher and M. Fivash, "Surface plasmon resonance based methods for measuring the kinetics and binding affinities of biomolecular interactions," *Curr. Opin. Biotech.* 5, pp. 389-395, 1994.
- [24] R. F. Dutra, J. O. Maciel Neto and Eduardo Fontana, "Surface plasmon resonance imaging applied to immunosensing," in *Biomedical Diagnostic, Guidance, and Surgical –Assist Systems III*, Tuan Vo-Dinh, Warren S.Grundfest, David A. Benaaron, Editors, *Proceedings of SPIE Vol.4254*, page numbers128-135(2001).
- [25] José Otávio Maciel Neto," Ressonância de Plásmons de Superfície: relação de dispersão, otimização de parâmetros e observação experimental," (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica , UFPE, 2000), pp. 79-81.
- [26] Informações mais detalhadas em <http://www.biacore.com>.

## Apêndice: Cálculo de $d'$

O cálculo da correção necessária ao reposicionamento do prisma descrita no Capítulo 6 é feito com base na Fig.6.23, reproduzida na Fig.A1 abaixo. O problema consiste em determinar a interseção da reta  $PD$  com a reta  $A'B'$ , que corresponde ao ponto  $P'$ . Para isso é necessário executar as seguintes etapas:

- Determinação da equação da reta  $PD$ . Isso pode ser obtido sabendo-se a equação da reta  $AB$  e notando que  $PD$  é perpendicular a  $AB$ .
- Determinação das coordenadas dos pontos  $A'$  e  $B'$ , obtidos de  $A$  e  $B$  após uma rotação de  $\theta$  graus no sentido horário.
- Determinação da coordenada do ponto  $P'$ , e a partir daí da distância  $d'$  entre os pontos  $A'$  e  $P'$ .

Uma vez obtida a distância  $d'$  a correção  $d'-d$  pode ser obtida, com  $d$  dado pela Eq.(6.15).

Na Fig. A1, as coordenadas dos pontos  $A$ ,  $B$ ,  $A'$  e  $B'$  são dadas por:

$$A = (-L/2, b/2) \quad (A1)$$

$$B = (0, -b) \quad (A2)$$

$$A' = b(-\cos(\theta + \gamma), \sin(\theta + \gamma)) \quad (A3)$$

$$B' = b(-\sin \theta, \cos \theta) \quad (A4)$$

A partir desses pontos as retas envolvidas podem ser obtidas diretamente. As equações das retas são::

Reta  $AB$ :

$$y_{AB} = -2 \cos \gamma x - b \quad (A5)$$

Reta  $A'B'$ :

$$y_{A'B'} = \frac{\cos \theta + \text{sen}(\theta + \gamma)}{\text{sen} \theta - \cos(\theta + \gamma)} x + b \frac{\cos \gamma}{\text{sen} \theta - \cos(\theta + \gamma)} \quad (\text{A6})$$

Da Eq.(A5), obtém-se a equação da reta  $PD$ , que sendo perpendicular a reta  $AB$ , tem declividade  $m_{PD} = 1/(2\cos\gamma)$ . Uma vez que essa reta passa pelo ponto  $D = ( 0, b/2 )$ , sua equação pode ser obtida diretamente. Essa equação é dada por:

Reta  $PD$ :

$$y_{PD} = \frac{1}{2\cos\gamma} x + \frac{b}{2}. \quad (\text{A7})$$

A solução simultânea das Eqs.(A6) e (A7) fornece as coordenadas do ponto  $P'$  definidas por

$$P' = (x_{P'}, y_{P'}) \quad (\text{A8})$$

com,

$$x_{P'} = \frac{b \cos \gamma}{2 \cos \theta} [\text{sen}(\theta - \gamma) - 1], \quad (\text{A9})$$

$$y_{P'} = \frac{b}{2} \left[ 1 + \frac{\text{sen}(\theta - \gamma) - 1}{2 \cos \theta} \right] \quad (\text{A10})$$

Utilizando as Eqs.(A3), (A9) e (A10) permite a determinação das diferenças entre coordenadas dos pontos  $P'$  e  $A'$ . Assim, após uma série de manipulações algébricas, obtém-se:

$$x_{P'} - x_{A'} \equiv d'_x = 2 \left( \frac{b}{4 \cos \theta} \right) [\cos(2\theta + \gamma) + \cos \gamma \text{sen}(\theta - \gamma)] \quad (\text{A11})$$

$$y_{P'} - y_{A'} \equiv d'_y = -\left(\frac{b}{4\cos\theta}\right)[1 + \text{sen}(3\theta + \gamma)] \quad (\text{A.12})$$

Assim, a distância  $d'$  indicada na Fig.A1 pode ser obtida diretamente das Eqs. (A.11) e (A.12), ou seja,

$$d' = \sqrt{d'^2_x + d'^2_y}, \quad (\text{A.13})$$

e pode ser posta na forma

$$d'(\theta) = \frac{b}{4\cos\theta} H(\theta), \quad (\text{A.14})$$

com

$$H(\theta) \equiv \sqrt{[F(\theta)]^2 + [G(\theta)]^2}, \quad (\text{A.15})$$

onde as funções  $F(\theta)$  e  $G(\theta)$  são obtidas diretamente das Eqs.(A.11) e (A.12) e dadas por

$$F(\theta) = 2[\cos(2\theta + \gamma) + \cos\gamma\text{sen}(\theta - \gamma)], \quad (\text{A.16})$$

$$G(\theta) = -[1 + \text{sen}(3\theta + \gamma)]. \quad (\text{A.17})$$

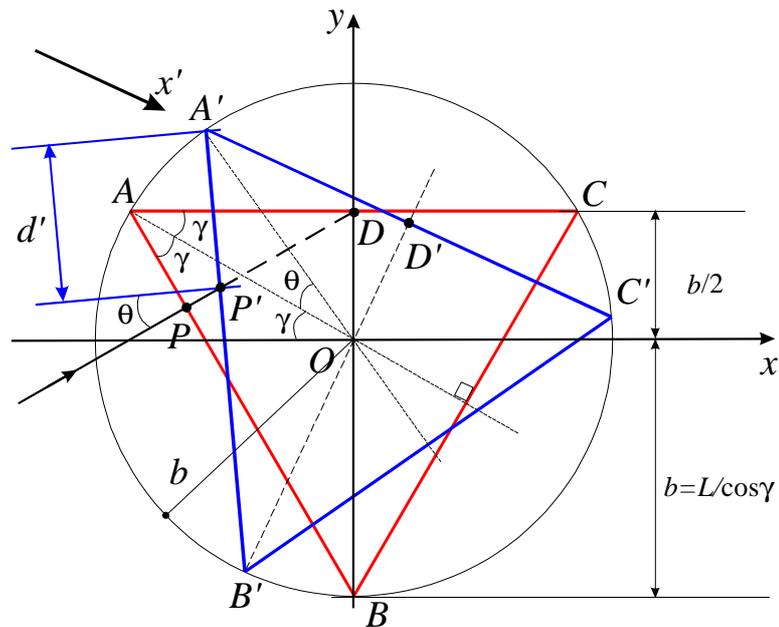


Fig.A1. Geometria para determinação do reposicionamento após rotação do prisma.