

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

**REFLECTÔMETRO ÓPTICO COM SISTEMA**  
**INTEGRADO DE INFUSÃO PARA MONITORAÇÃO**  
**DE REAÇÕES BIOMOLECULARES**

por

**ALBERTO OSORIO DOMÍNGUEZ**

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.**

Recife, Dezembro de 2014.

© Alberto Osorio Domínguez, 2014

Espaço reservado para a biblioteca do CTG





**Universidade Federal de Pernambuco**

***Pós-Graduação em Engenharia Elétrica***

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE  
DISSERTAÇÃO DO MESTRADO ACADÊMICO DE

**ALBERTO OSORIO DOMÍNGUEZ**

TÍTULO

“XX  
XX  
XX”

A comissão examinadora composta pelos professores: EDUARDO FONTANA, DES/UFPE, XXX, DES/UFPE e XXX sob a presidência do prof. XXXXXXXXXXXXXXX, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, consideram o candidato **ALBERTO OSORIO DOMÍNGUEZ** \_\_\_\_\_

Recife, xx de \_\_\_\_\_ de 2014

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

\_\_\_\_\_  
**EDUARDO FONTANA**  
Orientador e Membro Titular Interno

\_\_\_\_\_  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
Membro Titular Interno

\_\_\_\_\_  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
Membro Titular Externo



Resumo da dissertação apresentada à UFPE, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em engenharia elétrica.

# **REFLECTÔMETRO ÓPTICO COM SISTEMA INTEGRADO DE INFUSÃO PARA MONITORAÇÃO DE REAÇÕES BIOMOLECULARES**

**Alberto Osorio Domínguez**

Dezembro / 2014

Orientador: Eduardo Fontana, PhD.

Co-orientador: Gustavo Oliveira Cavalcanti, PhD.

Área de concentração: Fotônica.

Palavras-chave: RPS, SPR, reflectômetro, biossensor, ressonância de plásmon de superfície, ouro.

Número de páginas: 99.

**RESUMO:** Visando possíveis aplicações no desenvolvimento e monitoração de múltiplas reações biomoleculares, a partir do efeito da ressonância de plásmon de superfície (RPS), foi alinhado e integrado um reflectômetro automatizado, operando no rango do infravermelho ( $\lambda=975,1$  nm), com um módulo de infusão multicanal de líquidos com capacidade de inseri-los com vazões na ordem de  $\mu\text{l}/\text{min.}$ , dentro de uma célula de infusão com uma capacidade aproximada de  $33\mu\text{l}$ . A estrutura óptica do reflectômetro é composta por um prisma de vidro SF2 ( $n=1,623$ ), um substrato de vidro BK7 ( $n=1.515$ ), um filme de ouro com espessura de 54 nm e pureza de 99.999%. Com os parâmetros do ângulo de ressonância, meia largura da curva e a faixa dinâmica, todos extraídos das curvas RPS, foi possível determinar um fator de qualidade de 139, valor aproximadamente 1/3 daquele previsto teoricamente (440). Com o sistema integrado operando na configuração de ângulo variável, foi possível realizar uma caracterização óptica de uma serie de soluções salinas com concentrações inferiores a 100 mg/ml, verificando que para concentrações menores que 0,02 mg/ml a curva se afasta da linearidade, mostrando-se coerente com a resolução

angular do reflectômetro que alcança 0,005 graus (80 $\mu$ rad). Na configuração de ângulo fixo ( $\theta=57,6$  graus) foi possível ter uma resposta de sinal de reflectância linear, para uma faixa de concentrações inferiores a 20 mg/ml, permitindo determinar uma sensibilidade de  $5.3 \times 10^{-4}$ , valor que se considera apropriado e suficiente para o desenvolvimento de sensores biomoleculares. Finalmente, foi encontrada a relação linear  $\Delta R/\Delta T=0,0028 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ , a qual permite estudar possíveis reações que envolvam variações de temperatura da amostra em estudo.

Abstract of the dissertation presented to UFPE as a partial fulfillment of the requirements for the master degree in electrical engineering.

## **OPTICAL REFLECTOMETER WITH INTEGRATED INFUSION SYSTEM FOR MONITORING OF BIOMOLECULAR REACTIONS**

**Alberto Osorio Domínguez**

December / 2014

Supervisor(s): Eduardo Fontana, PhD; Gustavo Oliveira Cavalcanti, PhD.

Area of concentration: Photonics.

Keywords: RPS, SPR, reflectometer, biosensor, surface plásmón resonance, gold.

Number of pages: 99.

**ABSTRACT:** Aiming possible applications for the development and monitoring of multiple biomolecular reactions, using the effect of surface plásmón resonance (SPR). Was aligned and integrated into an automated reflectometer operating in the infrared range ( $\lambda = 975.1$  nm), with a multichannel infusion fluids module capable of placing at flow rates on the order of  $\mu\text{l}/\text{min}$ , inside of an Infusion cell with a capacity of approximately  $33\mu\text{l}$ . The optical reflectometer structure consists of a glass prism SF2 ( $n = 1.623$ ), a glass substrate BK7 ( $n = 1.515$ ), a gold film with a thickness of 54 nm and a purity of 99.999%. With the parameters of the resonance angle, half-width of the curve and the dynamic range, all taken from the RPS curves, it was possible to determine a quality factor of 139, value approximately 1/3 that theoretically predicted (440). With the integrated operating system on the variable angle setting, it was possible to perform an optical characterization of a series of salt solutions at concentrations below 100 mg / ml, noting that for concentrations less than 0.02 mg / ml the curve deviates from linearity, being consistent with the angular resolution of the reflectometer that reaches 0,005 degrees ( $80\mu\text{rad}$ ). In the fixed-angle setting ( $\theta = 57.6$  degrees), it was possible to have a reflectance of linear signal response, for a range of concentrations below 20 mg / ml, allowing to determine sensitivity of

$5.3 \times 10^{-4}$ , value that is deemed appropriate and sufficient for the development of biomolecular sensors. Finally found a linear relationship  $\Delta R / \Delta T = 0.0028 \text{ } ^\circ \text{C}^{-1}$ , which allows to study possible reactions involving temperature variations the sample under study.



## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Ressonância de Plásmon de Superfície e sua Aplicação .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Plásmon de Superfície .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Função Permissividade Elétrica de um Gás de Elétronas .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. Condições Para a Existência dos Plásmons de Superfície.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4. Técnicas de Observação da Ressonância de Plásmon de Superfície.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Parâmetros Característicos da Linha de Absorção RPS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.6. Efeito RPS no Desenvolvimento de Sensores Biomoleculares .....</b>	<b>21</b>
<b>2.6.1. Variação do Índice de Refração do Meio Dielétrico nas Proximidades da Interface.....</b>	<b>22</b>
<b>2.7. Diferentes Formas de Detecção em Sensores RPS.....</b>	<b>26</b>
<b>2.7.1. Sensor RPS Baseado na determinação da Variação do Ângulo <math>\theta_{PS}</math> .....</b>	<b>27</b>
<b>2.7.2. Sensor RPS Baseado na determinação da Variação da Reflectância.....</b>	<b>28</b>
<b>2.8. Sensibilidade do Sensor RPS.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Reflectômetro Automatizado.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.1. Acondicionamento do Laser .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.2. Movimentação do Prisma .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.3. Detecção, Controle e Processamento.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Alinhamento e Calibração Óptica do Reflectômetro.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.1. Giro em sua Incentro .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2. Pontos de Referencia Translacional e Rotacional .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.3. Calibração dos Fotodetectores .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3. Sistema de Infusão.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.1. Módulo de Infusão .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3.2. Aquecimento da Peça Motorizada.....</b>	<b>42</b>
<b>3.3.3. Célula de Infusão .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.4. Incidência do Feixe Laser na Célula de Fluxo .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4. Filme Metálico como Superfície Sensora .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5. Amostras Salinas.....</b>	<b>51</b>

<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1. Caracterização do Reflectômetro e Módulo de Infusão .....</b>	<b>52</b>
4.1.1. Avaliação do Tempo de Aquisição no Reflectômetro .....	52
4.1.2. Sensograma do Feixe S1 .....	53
4.1.3. Filme de PVC como “Casador” de Índices de Refração .....	54
4.1.4. Interferência Externa ao Reflectômetro .....	54
4.1.5. Vasões Inseridas por o Módulo de Infusão .....	56
4.1.6. Influência da temperatura da peça motorizada no Índice de Refração .....	57
<b>4.2. Integração Reflectômetro Automatizado-Módulo de Infusão.....</b>	<b>59</b>
4.2.1. Área de contato e Área iluminada .....	59
4.2.2. Curvas de Calibração.....	61
<b>4.3. Medidas Realizadas com o Sistema Integrado.....</b>	<b>63</b>
4.3.1. Determinação do Índice de Refração a partir do Ângulo Crítico.....	63
4.3.2. Análises das Curvas RPS e Sensogramas Realizados com o Sistema Integrado .....	64
4.3.3. Resposta do Sensor RPS ante Fluxos Dinâmicos .....	69
<b>4.4. Efeito da Temperatura na Reflectância.....</b>	<b>73</b>
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>78</b>
<b>Anexo I: Formulação para determinar o Índice de refração a partir das cus curvas RPS .....</b>	<b>80</b>
<b>Anexo II: Aproximação de Cauchy que permite determinar o incide de refração em Função da Temperatura.....</b>	<b>82</b>
<b>Referências.....</b>	<b>84</b>

## Lista de Figuras

Fig.2.1 Dependência espectral da permissividade complexa do ouro [a]. Consultar referencia [a] para detalhar as permissividades de outros metais.....	7
Fig.2.2 Geometria planar utilizada para determinar a condição de existência das oscilações confinadas na interface. ....	8
Fig.2.3 Configuração clássica de Kretschmann (a) e (b) para excitação de plásmon de superfície. ....	14
Fig.2.4 Função refletância, que representa o efeito RPS.....	16
Fig.2.5 Curva de ressonância que mostra os parâmetros de $\theta_{PS}$ , $W_{PS}$ , $R_{\min}$ , $\bar{R}$ , $K'$ e $ K'' $ . .....	18
Fig.2.6 (a) dependência espectral da meia largura reduzida da RPS para cobre, prata, alumínio e ouro na configuração Metal-Vácuo de Kretschmann com prisma SF2 (b) dependência espectral da meia largura reduzida da RPS para cobre, prata, alumínio e ouro na configuração Metal-Água de Kretschmann com prisma SF2.....	20
Fig.2.8 (a) cambio de índice de refração volumétrico e (b) superficial do meio externo....	22
Fig.2.9 Variação do vetor de ondas do PS de uma única interface metal-dielétrico ante um cambio de índice de refração volumétrico do meio dielétrico para três valores diferentes de $n_d$ (1, 1.2 e 1.4) [REP_219].....	25
Fig.2.10 Classificação dos sensores biomoleculares RPS, baseados na configuração óptica de Kretschmann. ....	26
Fig.2.11 Forma de detectar câmbios no índice de refração, a partir da medição do $\Delta\theta_{PS}$ .	27
Fig.2.12 Forma de detectar câmbios no índice de refração, a partir da medição do $\Delta R$ ....	28
Fig.3.1 Diagrama esquemático e setorizado do reflectômetro. $D_1$ e $D_2$ fotodetectores de sinal e referência respectivamente, $I$ – Íris, $P$ – Polarizador, $S$ – Splitter, $MP(\theta)$ – Motor de passo do estágio de rotação, $MP(x)$ – motor de passo de translação $x$ , $MP(y)$ – Motor de passo para translação $y$ , $MP(w)$ – Motor de passo para correção do fotodetector $D_1$ . ....	31

Para obter a polarização de ondas P, o reflectômetro precisa de uma fonte de luz laser polarizada e colimada, por conseguinte é necessário acondicionar a sinal. As partes utilizadas para ao acondicionamento de laser são: uma fonte de emissão laser de estado solido não polarizada, marca Melles Griop, com comprimento de onda no intervalo do

infravermelho de 975,1 nm, e potência de 73 mW, um íris ( <i>I</i> ), um polarizador ( <i>P</i> ) e um semi-espelho ( <i>S</i> ). (Fig.3.2) .....	32
Fig.3.2 Fotografia partes utilizadas no acondicionamento do laser. (1) Laser Infravermelho $\lambda=971,5$ nm; (2) Íris ( <i>I</i> ); (3) Polarizador no plano de incidência ( <i>P</i> ) e (4) Semi-espelho ( <i>S</i> ). .....	32
Fig.3.3 Mecanismo da movimentação do prisma. (1) <i>MP</i> ( $\theta$ ) – Motor de Rotação; (2) <i>MP</i> ( <i>x</i> ) – Motor de Translação em x e (3) <i>MP</i> ( <i>y</i> ) – Motor de Translação em y. ....	33
Fig.3.4 (a) Fotodetector de referência <i>D</i> <sub>2</sub> e (b) fotodetector de sinal <i>D</i> <sub>1</sub> . ....	34
Fig.3.5 Configuração do prisma para definição do ponto de referencia.....	35
Fig.3.6 Procedimento para alinhar o prisma para que gire no incentro ( <i>I</i> ). ....	37
Fig.3.7 Procedimento para alinhar o prisma para que gire em torno do incentro. ....	38
Fig.3.8 Alinhamento translacional e rotacional do prisma. Ojo colocar L/4 na Fig. ....	39
Fig.3.9 Calibração dos fotodetectores para a determinação da razão <i>D</i> <sub>1</sub> / <i>D</i> <sub>2</sub> . ....	40
Fig.3.10 Foto ilustrativa do sistema de infusão. 1. notebook com interface gráfica criada em Qt Creator, 2. módulo de potencia controlado por um microprocessador Arduino Mega e 3. peças motorizadas com suporte para as seringas (Extraída de [Loidmann]). ....	42
Fig.3.11 Forma experimental de medir a temperatura em função de tempo; (a) para a peça motorizada e (b) para a amostra (H <sub>2</sub> O destilada) conteúda na seringa.....	43
Fig.3.12 (a) Diagrama esquemático da posição da célula de infusão; (b) fotografia da célula de infusão sobre o prisma do reflectômetro e (c) partes da célula de infusão. ....	44
Fig.3.13 Diagrama esquemático do sistema hidráulico já integrado ao reflectômetro.....	45
Fig.3.14 Calibração dos fotodetectores ou determinação da razão <i>D</i> <sub>1</sub> / <i>D</i> <sub>2</sub> . ....	47
Fig.3.15 Método de localização o ponto certo, para o qual o laser atinge a área interna da célula de infusão. ....	48
Fig.3.16 Fotografias que ilustram uma das formas de lograr que o laser atinja a área encerrada por a borracha (célula de infusão). ....	49
Fig.3.17 Configuração de Kretschmann para observação do efeito de RPS em interface metal-líquido.....	50
Fig.4.1 Tempo de registro de dados em função do tempo real.....	52
Fig.4.2 Refletância em função do tempo do feixe S1.....	53
Fig.4.3 Espectro de reflectância total (vermelho) e intento de RPS (azul), registrados para uma estrutura SF2-BK7-Cr-Au-ar. Falta curva RPS y numerarlas .....	54

Fig.4.9 Interferência gerada pela incidência indireta de luz na CCD. Falta flechas indicando la interferência + indicar o delta de reflectância.....	55
Fig. 4.4 Volume em função do tempo para um liquido inserido com uma seringa de 20 ml, marca Descarpak, na função de vasão 1ml/min. ....	57
Fig.4.5 Incremento da temperatura em função do tempo de uma peça motorizada e de uma amostra inserida com uma vasão de 5 $\mu$ l/min. OJO CAMBIAR NOMBRE DE PIEZA MOTORIAZADA POR SOPORTE, jeringa com agua, numerarlas.....	58
Fig. 4.6 Aproximação para $\lambda=975,1$ nm o índice de refração da agua como função da temperatura. ....	59
Fig.4.7 Reflectância em função da posição que mostra a área limitada por a borracha, para uma célula de infusão sem liquido. ....	60
Fig.4.8 Reflectância em função da posição, para uma varredura feita por a metade da célula de infusão sem liquido. ....	61
Fig.4.10 Curva de calibração que mostra o comportamento linear do sensor ante a presencia de concentrações salinas diluídas progressivamente por dois. ....	62
Fig.4.11 Curva de calibração para concentrações embaixo de 0,4mg/ml. ....	63
Fig.4.12 Reflectância do prisma como função da concentração de NaCl. ....	64
Fig.4.13 Curvas RPS para diferentes concentrações salinas. ....	65
Fig.4.14 Dependência temporal do sinal de reflectância. ....	66
Fig.4.15 Variação do ângulo de ressonância $\Delta\theta_{ps}$ em função das variações no índice de refração $\Delta n$ , para diferentes concentrações salinas. ....	67
Fig.4.16 Índice de refração em função da concentração de NaCl. ....	68
Fig.4.17 Reflectância em função do índice de refração das concentrações salinas.....	69
Fig. 4.18 (a) Curvas RPS para diferentes concetrações; (b) Reflectância em função do tempo para ângulo fixo. ....	70
Fig.4.19 Refletância do prisma como função da concentração de NaCl. ....	71
Fig.4.20 Curvas RPS para diferentes concentrações em fluxo estático e dinâmico. ....	72
Fig.4.21 Reflectância em função da temperatura para uma amostra com $20 < T < 30$ °C e para uma configuração SF2-BK7-Au-(água destilada a 24 °C). ....	73
Fig.4.22 reflectância em função do tempo para uma amostra de PBS. ....	74
Fig.4.23 Reflectância em função do tempo. ....	76
Fig.4.24 Evolução do sinal de refletância para um período de 7 dias. ....	76
Fig.3.17 Caracterizaçã dos espectros RPS para a determinação do indice de refração.....	80

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Vasão máxima e mínima para os diferentes padrões seringa. ....	56
Tabla 2. <i>Características del volumen de medida.</i> ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Tabla 3. Características dos Espectros RPS para estruturas e prisma diferentes. ....	<b>Erro!</b>

**Indicador não definido.**



## **1. Introdução**

O efeito de *Ressonância de Plásmon de Superfície* (RPS), foi observado inicialmente por Wood em 1902 ao analisar a luz policromática reflexada por um espelho que tinha uma rede de difração em sua superfície. A luz reflexada apresentava um padrão de faixas que Wood não foi capaz de interpretar [1].

Os plásmons são pacotes de energia que flutuam sobre a superfície de um metal que, por sua vez, está depositado sobre um isolante (vidro, plástico, etc.). Tal incidência traz a condição perfeita para se gerar as ondas de superfície. A interpretação física do efeito foi iniciada por Rayleigh, e posteriormente refinada em 1941 por Fano, foi este último quem introduziu o conceito de *poláriton superficial*: quase-partícula resultante da oscilação coletiva dos elétrons como resultado da interação da luz. [2-64] [3-65].

A primeira descrição teórica da ressonância de plásmon superficial foi proporcionada por Ritchie em 1957, depois de 11 anos em 1968, Ritchie relaciono o plásmon superficial com as ondas superficiais de Sommerfeld e o fenômeno observado por Wood [5-67]. Nesse mesmo ano Otto e Kretschmann-Raether apresentaram dois métodos simples de excitação de plásmon superficial (PS) em filmes de metais nobres, estabelecendo desta maneira as bases da plasmônica tal como é conhecida hoje em dia. Abrindo assim um extenso campo de ação para o desenvolvimento de sensores utilizados amplamente nas áreas da química e a biologia [7-69].

O efeito RPS pode ser observado em diferentes tipos de configurações, como por exemplo, em configurações de fibra óptica, em grades de difração, na configuração de Otto e na configuração básica de Kretschmann, esta última configuração utilizada no reflectômetro usado neste trabalho, onde um filme metálico sobre um substrato de vidro entra em contato óptico com um prisma de acoplamento para observação do efeito. A ressonância de plásmon de superfície poder ser utilizada na caracterização óptica de superfícies, ou também no estudo de reações entre diferentes agentes biomoleculares que podem chegar a ser feitas em tempo real, sem o uso de marcadores fluorescentes ou radioisotópicos [126,12,13 Gustavo] [132 artigo] – [6 artigo].



O Biacore, primeiro equipamento comercial a explorar essa técnica, foi lançado no começo da década de 90 pela Pharmacia [147 artigo] e outras versões de sistemas baseados em RPS para caracterização *label-free* de reações biomoleculares foram também lançadas.

Com o objetivo de expandir a capacidade da técnica de RPS para uma larga gama de aplicações, incluindo a monitoração de processos dinâmicos, como o caso das reações biomoleculares de superfície, neste trabalho foi realizada caracterização do reflectômetro e do módulo de infusão separadamente, além da caracterização da integração do reflectômetro automatizado com o módulo de infusão de líquidos. Tendo realizada a caracterização foram feitas medidas com amostras líquidas visando aplicações futuras no estudo da cinética de reações biomoleculares.

Este trabalho está conformado por 4 capítulos, que estão distribuídos da seguinte maneira: No capítulo 2 é apresentada tanto a teoria que fundamenta o princípio físico que permite entender a existência das oscilações eletromagnéticas na interface entre um metal e um dielétrico (PS), também se explica a forma em que são utilizadas as curvas de reflectância na determinação das variações do índice de refração no dielétrico externo; o capítulo 3, descreve as características dos equipamentos utilizados, a forma em que foi implementado o módulo de fluxo, junto com a célula de infusão, a preparação das amostras em estudo e finalmente a metodologia tanto de alinhamento do sistema como registro de dados; no capítulo 4, é apresentado em primeiro lugar a caracterização do reflectômetro e do módulo de infusão com o objetivo de conhecer e avaliar os requisitos fundamentais de um sistema convencional, em segundo lugar, apresenta-se curvas de reflectância obtidas da medição de diferentes soluções salinas a partir do reflectômetro integrado com o módulo de infusão, bem com os sensogramas das mesmas amostras realizadas com o objetivo de analisar em função do tempo a resposta do detector ante variações do índice de refração; finalmente no capítulo 5, são expostas as conclusões do trabalho e as perspectivas futuras.

## ***2. Ressonância de Plásmon de Superfície e sua Aplicação***

Neste capítulo são apresentadas as bases teóricas e fenomenológicas tanto da existência das oscilações dos plásmons de superfície em filmes metálicos, como do emprego deste efeito na caracterização e desenvolvimento de sensores RPS para o estudo de reações biomoleculares.

### ***2.1. Plásmon de Superfície***

Plasmônica é uma das áreas da Fotônica que estuda como o campo eletromagnético pode ser confinado em dimensões de mesmos tamanhos ou menores que o comprimento de onda. O componente importante da plasmônica é o metal, pois este suporta modos de propagação de plásmons de superfície (ou *Surface Plasmons*, SP). Plásmons de superfície resultam de acoplamento entre a onda eletromagnética e a oscilação coletiva dos elétrons livres (ou de condução) de um metal. Quando esta oscilação é otimizada, ou seja, são escolhidos parâmetros para que ela atinja a condição de ressonância, este tipo de oscilação é conhecido como oscilação de ressonância de plásmons de superfície (*Surface Plasmons Resonance*, RPS).

### ***2.2. Função Permissividade Elétrica de um Gás de Elétron***

Os plásmons de superfície só podem ser gerados em interfaces onde um dos dois meios apresenta permissividade elétrica negativa, razão por a qual, normalmente são utilizados metais que apresentam frequências inferiores à frequência de plasma, fenômeno que geralmente ocorre quando os metais são irradiados com luz na região do visível e infravermelho.

Para entender com mais clareza este efeito é introduzido o conceito de permissividade elétrica que pode ser obtida classicamente ao analisar a equação de movimento das cargas elétricas de um sistema, quando tem-se tanto a ação de um campo

elétrico externo como o momento dipolar induzido do material [15,1626,27 Otavio]. Essa análise permite ter em conta a contribuição para a permissividade feita por as cargas positivas, os elétrons ligados e os elétrons livres no material, cargas que por estar sujeitas a forças internas distintas, favorecem o fenômeno de ressonância em diferentes porções do espectro eletromagnético.

Devido à alta densidade de elétrons livres nos metais, é possível afirmar que estas cargas exercem uma contribuição dominante na função permissividade, permitindo a criação de modelos simples, a partir só de esse grupo de cargas. Levando-se em conta o anterior exposto e aplicando-se um campo elétrico  $\vec{E} = (E, 0, 0)$  ao um metal que se assume como um gás de elétrons de densidade  $N$ , em um background de cargas positivas fixas, com elétrones de carga  $-q$  e massa  $m$ , será possível determinar a polarização induzida na direção  $x$ , tendo em conta que eventos de colisão são representados por uma força de atrito viscoso de oposição ao movimento e proporcional á velocidade do elétron. A equação de movimento para o deslocamento do elétron pode ser apresentada na seguinte forma. [16,1727,28 Otavio]

$$m\ddot{x} = -qE - \frac{m}{\tau}\dot{x}, \quad (2.1)$$

Onde o primeiro e segundo membro, representam a força elétrica e a força de atrito viscoso, respectivamente,  $\tau$  o tempo médio entre eventos de colisão,  $X$  o deslocamento do elétron e  $E$  o campo elétrico. Assumindo que

$$X = \text{Re}(Xe^{j\omega t}) \quad (2.2)$$

$$E = \text{Re}(Ee^{j\omega t}) \quad (2.3)$$

e tomando que o campo elétrico aplicado varia senoidalmente em função do tempo, com uma frequência  $\omega$ , é possível determinar que:

$$X = \frac{q/m}{\omega^2 - j(\omega/\tau)} E. \quad (2.4)$$

Define-se  $p = -qX$  como o momento de dipolo induzido na posição  $x$ , e  $P = Np$  como a polarização induzida para o caso de  $N$  elétrons por unidade de volume, então a equação 2.4 torna-se:

$$P = -\frac{Nq^2/m}{\omega^2 - j(\omega/\tau)} E. \quad (2.5)$$

A permissividade elétrica do meio é obtida da relação constitutiva entre os vetores densidade de fluxo elétrico, polarização e campo elétrico, relacionados da forma [18referenciar com as notas do prof. Fontana],

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P}, \quad (2.6)$$

Onde  $\varepsilon_0$  é a permissividade elétrica no vácuo, possuindo um valor de  $8,85 \times 10^{-12}$  F/m. Inserindo a polarização na equação de densidade de fluxo, obtém-se,

$$\frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} \equiv \varepsilon' + j\varepsilon'' = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - j(\omega/\tau)}, \quad (2.7)$$

sendo  $\omega_p$  a frequência do plasma, definida da seguinte forma,

$$\omega_p \equiv \left( \frac{Nq^2}{m\varepsilon_0} \right)^{1/2}. \quad (2.8)$$

A partir da equação (2.8), é possível obter a parte real e imaginária da função permissividade, que podem ser escritas da seguinte forma [19buscar referencia]

$$\varepsilon' = 1 - \frac{\omega_p^2 \omega^2}{\omega^4 + (\omega/\tau)^2}, \quad (2.9)$$

$$\varepsilon'' = -\frac{\omega_p^2 (\omega/\tau)}{\omega^4 + (\omega/\tau)^2} . \quad (2.10)$$

Ao considerar tempos de colisão longos comparados com o período das oscilações, é possível simplificar as equações (2.9) e (2.10), que podem ser aproximadas da seguinte forma,

$$\varepsilon' \approx 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} , \quad (2.11)$$

$$\varepsilon'' = -\frac{1}{\tau} \frac{\omega_p^2}{\omega^3} . \quad (2.12)$$

A equação (2.11) que representa a parte real da permissividade será sempre negativa para as frequências que cumprem a condição de  $\omega \ll \omega_p$ , que é a condição necessária para lograr a excitação dos *plásmons* na superfície metálica, para quando está em contato com um dielétrico.

Uma vez que na maioria dos metais o parâmetro  $N$  é elevado, a frequência de plasma localiza-se geralmente na região do ultravioleta, como se mostra na equação (2.8), razão pôr a qual, muitos metais são utilizados para a geração dos plásmom de superfície, que vai desde o visível até o infravermelho [20procurar referencia]. A equação (2.12) representa a parte imaginaria da permissividade negativa e representa as perdas no sistema, devido a os eventos de colisão.

A Fig.2.1 ilustra o comportamento experimental da dependência espectral da parte real e imaginaria da permissividade do ouro, metal utilizado neste estudo. Pode-se apreciar que a parte real da permissividade é negativa na região compreendida entre o visível e o ultravioleta. [21d]. [21referencia (handbook de química e física... ver dissertação Daniel #17)].

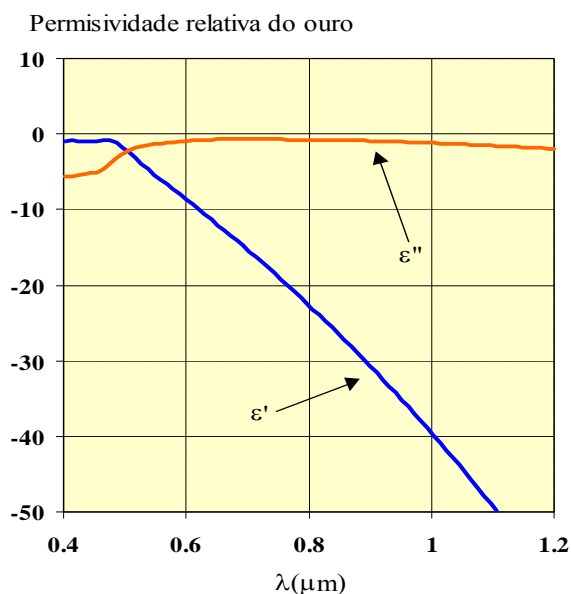


Fig.1 Dependência espectral da permissividade complexa do ouro [a]. Consultar referencia [a] para detalhar as permissividades de outros metais.

### 2.3. Condições Para a Existência dos Plásmons de Superfície

As condições de existência dos *plásmons* de superfície em uma interface podem-se entender melhor a partir da Fig. 2.2. Nela observa-se os dois meios considerados semi-infinitos, com permissividades diferentes  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$ , neste caso uma onda penetra no meio inferior e posteriormente sai no meio superior. Observa-se que a onda incidente esta polarizada no plano de incidência.

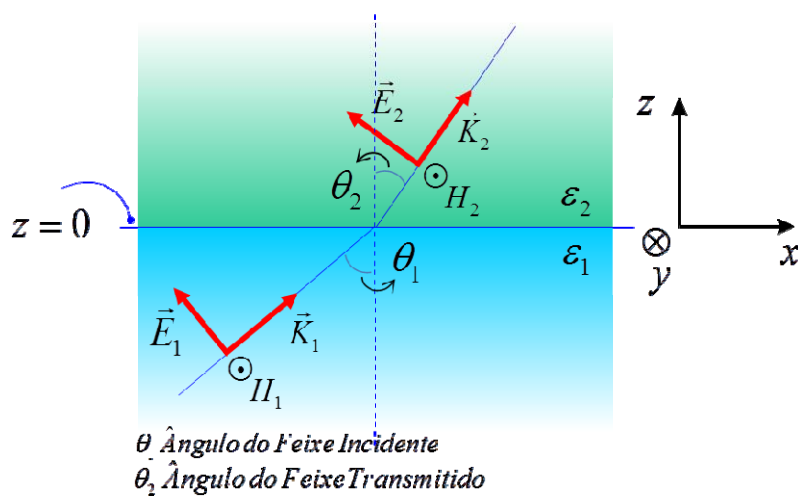


Fig.2 Geometria planar utilizada para determinar a condição de existência das oscilações confinadas na interface.

Para determinar a condição necessária e suficiente que permita a existência de uma oscilação confinada na interface, é necessário modelar o problema impondo a condição de inexistência de reflexão na interface, a partir da incidência de uma onda plana no meio 1 [2216 Daniel]. Essa inexistência de reflexão pode representar tanto o fenômeno de transmissão total na interface como a existência de uma onda confinada na interface.

Uma onda plana no meio, pode ser representada pelo campo elétrico  $\vec{E}_i$ , e magnético  $\vec{H}_i$  e pelo vetor de onda  $\vec{K}_i$  da seguinte forma:[2318 Daniel],

$$\vec{E}_i = \vec{E}_0 e^{-j(\vec{K}_i \cdot \vec{X})} \quad (2.13)$$

$$\vec{H}_i = \frac{1}{\omega \mu_0} \vec{K}_i \times \vec{E}_i \quad (2.14)$$

onde  $i$  representa o meio ( $i=1$  ou  $2$ ),  $\vec{K}_i$  e  $\vec{X}_i$  os vectores de onda e posição no meio  $i$  respectivamente,  $\mu_0$  a permeabilidade magnética no vácuo, e  $\omega = 2\pi c/\lambda$  a frequência angular.

Partindo das equações (2.13) e (2.14), e realizando algumas manipulações algébricas obtém-se o estado de polarização (ondas p) para os dois meios, que podem ser expressos nas seguintes formas,

### **Meio 1:**

$$\vec{E}_1 = A(-k_1, 0, k_x) e^{-j(k_x x + k_1 z)} \quad (2.15)$$

$$\vec{H}_1 = \frac{\vec{K}_1 \times \vec{E}_1}{\omega \mu_0} = \frac{-A \epsilon_1 k_0^2}{\omega \mu_0} (0, 1, 0) e^{-j(k_x x + k_1 z)} \quad (2.16)$$

### **Meio 2:**

$$\vec{E}_2 = B(-k_2, 0, k_x)e^{-j(k_x x + k_2 z)} \quad (2.17)$$

$$\vec{H}_2 = \frac{\vec{K}_2 \times \vec{E}_2}{\omega \mu_0} = \frac{-B \varepsilon_2 k_0^2}{\omega \mu_0} (0, 1, 0) e^{-j(k_x x + k_2 z)} \quad (2.18)$$

onde  $A$  e  $B$  são as amplitudes dos campos elétrico e magnético nos meios 1 e 2 respectivamente e  $k_0 = \omega/c = 2\pi/\lambda$ .

Aplicando as condições de contorno na interface  $z = 0$ , obtemos duas equações que podem ser representadas na forma matricial assim:

$$\begin{pmatrix} k_1 & -k_2 \\ \varepsilon_1 & -\varepsilon_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.19)$$

Conforme ao discutido anteriormente, esse sistema irá apresentar uma solução não trivial, se for satisfeita a condição,

$$\det \begin{pmatrix} k_1 & -k_2 \\ \varepsilon_1 & -\varepsilon_2 \end{pmatrix} = 0 \quad (2.20)$$

que fornece,

$$\varepsilon_2 k_1 = \varepsilon_1 k_2 \quad (2.21)$$

A equação (2.21) explica as duas condições que explicam a existência de campos na vizinhança da interface. A primeira condição apresenta-se quando  $k_1$  e  $k_2$  são puramente imaginários, representando o confinamento da onda eletromagnética na interface: **plásmons de superfície**, a segunda condição tem lugar quando se apresenta transmissão total no **ângulo de Brewster**, cumprindo-se que  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$ ,  $k_1$  e  $k_2$  são reais, é dizer, para ambos meios transparentes. Na sequência serão discutidas as condições anteriormente mencionadas.

### **Condição 1: Plásmon de Superfície**



Para que uma onda este confinada, ou seja evanescente em ambos lados da interface, se estabelece que os parâmetros  $k_1$  e  $k_2$  sejam imaginários puros, além disto precisa-se que a onda confinada se propague paralelamente à interface, ou seja na direção  $x$ , para isto é necessário garantir que  $k_x$  seja um número real.

Sabe-se por definição que  $k_x^2 + k_i^2 = \varepsilon_i k_0^2$  e considerando a equação (2.21), é possível obter,

$$k_1^2 = \varepsilon_1 k_0^2 - k_x^2 \quad (2.22)$$

$$k_2^2 = \varepsilon_2 k_0^2 - k_x^2 \quad (2.23)$$

Igualando e elevando os termos ao quadrado tem-se:

$$\varepsilon_1^2 (\varepsilon_2 k_0^2 - k_x^2) = \varepsilon_2^2 (\varepsilon_1 k_0^2 - k_x^2) \quad (2.24)$$

Usando a equação (2.24) e realizando manipulações algébricas, se pode obter o valor de  $k_x$  como a componente de onda paralela na interface, assim:

$$k_x = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \quad (2.25)$$

Levando em consideração que  $k_x^2 + k_i^2 = \varepsilon_i k_0^2$  e usando a equação (2.25) e possível obter  $k_1$  e  $k_2$  como as componentes do vetor de onda normal na interface nos meios 1 e 2 respectivamente

$$k_1 = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_1^2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \quad (2.26)$$

$$k_2 = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_2^2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \quad (2.27)$$

Devido que as equações (2.26) e (2.27) adotam magnitudes puramente imaginarias deve cumprir-se que,

$$\varepsilon_1 + \varepsilon_2 < 0 \quad (2.28)$$

para assegurar que  $k_{PS}$  seja real da mesma maneira como na equação (2.25), é necessário impor a condição adicional,

$$\varepsilon_1 \varepsilon_2 < 0 \quad (2.29)$$

As inequações (2.28) e (2.29) só podem ser satisfeitas para quando apenas um dos meios, por exemplo, o meio 2, exibe uma permissividade negativa, tal que,

$$\varepsilon_2 < -\varepsilon_1 \quad (2.30)$$

Esta condição é obtida em metais na faixa de frequências inferiores à frequência de plasma [2419 referencia Gustavo]. Satisfazendo-se ao mesmo tempo as equações (2.28) a (2.29) obtém-se uma onda evanescente, o anterior tem lugar ao escolher os parâmetros,

$$k_1 = \pm j\eta_1 \quad (2.31)$$

$$k_2 = \pm j\eta_2 \quad (2.32)$$

Com  $\eta_1 = |k_1|$  e  $\eta_2 = |k_2|$ , valores obtidos das equações (2,26) e (2.27). Essa eleição proporciona um perfil de campo exponencialmente decrescente em cada lado da interface, como pode ser analisado a partir das expressões para as ondas com polarização P, dados pelas equações (2.15) a (2.18). Da análise elaborada na seção 2.1, pode-se concluir que essa condição ocorre se um dos meios for um metal, na região de frequências  $\omega < \omega_p$ , com o outro sendo um meio transparente, tal que a equação (2.28) seja satisfeita. O campo evanescente na interface são realmente as oscilações confinadas, denominadas **Plásmons de Superfície**, que são abreviadas neste documento como PS.

### Condição 2: Ângulo de Brewster

Uma situação mais simples acontece quando ambos meios são transparentes, apresentando um valor positivo da permissividade relativa. Nesta condição os parâmetros especificados pelas equações (2.25) a (2.27) são todos reais, situação em que a solução do problema adequa-se a transmissão total da onda incidente no meio 1 através da interface, sem ocorrência de reflexão. A condição anteriormente mencionada verificasse para um ângulo de incidência  $\theta_1 = \theta_B$ , que pode ser calculado com base em a geometria apresentada na figura 2.2, é possível determinar que,

$$\tan(\theta_1) = \tan(\theta_B) = \frac{k_x}{k_1} \quad (2.33)$$

onde  $k_x$  e  $k_1$  correspondem respectivamente com as projeções retangulares do vetor de onda nos eixos coordenados. Inserindo as equações (2.26) e (2.27) na equação (2.33), pode-se escrever,

$$\theta_B = \tan^{-1} \left( \sqrt{\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1}} \right) \quad (2.34)$$

Os meios transparentes da interface relacionados na equação (2.21) possuem índices de refração  $n_1$ ,  $n_2$  e permissividades relativas  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$  respectivamente, permissividades determinadas a partir da relação  $\varepsilon_i = n_i^2$  e que podem-se escrever,

$$\varepsilon_1 = n_1^2 \quad (2.35)$$

$$\varepsilon_2 = n_2^2 \quad (2.36)$$

Considerando as equações (2.35) e (2.36) se consegue reescrever a equação (2.34), obtendo-se finalmente

$$\theta_B = \tan^{-1} \left( \frac{n_2}{n_1} \right), \quad (2.37)$$

onde  $\theta_B$  corresponde com o ângulo de Brewster, que indica o ângulo para ao qual toda a intensidade da radiação eletromagnética polarizada é transmitida do meio 1 para o meio 2.

#### 2.4. Técnicas de Observação da Ressonância de Plásmon de Superfície

Existem várias formas para se excitar opticamente os PS, em geral os métodos tem em comum que para acoplar o *plásmon* de superfície no material é necessário acoplar o  $k$  da onda incidente com o  $k_{PS}$  do PS. Para alcançar este objetivo, se utiliza uma configuração onde existe um prisma que garante o ângulo de incidência correto, ou seja um prisma que auxilia no acoplamento entre  $k_{PS}$  do PS e o  $k_x$  da onda incidente. Dentro de esta situação e possível separar os acoplamentos em dois tipos: o primeiro é o acoplamento com a configuração Otto (ref Otto, 1968) e o segundo com a configuração Kretschmann (ref Kretschmann et al 1968) que será utilizada neste trabalho.

Na configuração Kretschmann, a amostra é colada com uma de suas faces em um prisma que garante o ângulo do acoplamento plasmônico. Os plásmons de superfície se formam na outra face da amostra onde ela encontra o outro meio dielétrico, neste caso o ar.

Pela condição de ressonância ocorrer com um ângulo de incidência maior que o ângulo crítico do metal utilizado não existe luz transmitida. De esta maneira toda a luz incidente será refletida pela superfície do metal. Porém quando  $k=k_{PS}$  a luz não é refletida pelo metal e sim absorvida por ele.

Como discutiu-se no apartado do Ângulo de Brewster, a existência dos PS tem lugar, se o sistema opera em uma faixa de comprimentos de onda onde o meio metálico tenha permissividade negativa, se a soma das permissividades dos meios é negativa ou equivalente, o modulo da permissividade do dielétrico será menor que aquela do metal, Se estas condições forem satisfeitas se podem garantir os PS nas proximidades da interface, o que implica que a componente x do vector de onda do PS poda ser expressado como:

$$k_x = k_{PS} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} > k_0 \quad (2.38)$$

A desigualdade mostrada na equação (2.38) impedi que sejam excitados os plásmons de superfície pela iluminação direta na interface, já que o número de onda do campo incidente pela interface externa da estrutura é sempre inferior ao parâmetro  $k_{PS}$ . Para lograr a geração do campo evanescente incidente em um lado da interface, e aumentar o número de onda desse campo pode-se utilizar o conceito de reflexão interna total em estruturas prismáticas utilizado por Kretschmann em sua configuração clássica como se apresenta na Fig.2.3.

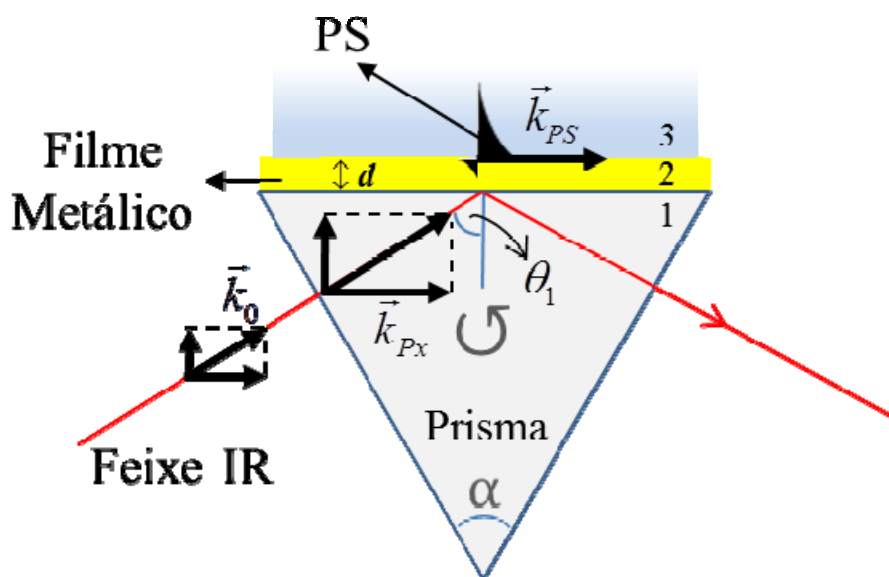


Fig.3 Configuração clássica de Kretschmann (a) e (b) para excitação de plásmão de superfície.

Na configuração de Kretschmann mostrada na Fig.2.3 [2516 Sergio], se observa um filme metálico que apresenta uma espessura  $d$ , suficientemente delgada para permitir que o campo transmitido pelo metal atinja o meio 3 (meio externo) com uma amplitude significativa. O filme metálico pode ser evaporado sobre a mesma face do prisma o sobre um substrato de vidro. Nesta configuração, o prisma aumenta o número de onda do campo incidente para  $k_p = n_1 k_0$ , de tal forma que a componente x este dada por

$$k_{px} = n_1 k_0 \sin \theta. \quad (2.39)$$

Ajustando o ângulo de incidência com um maior valor que o ângulo crítico obtém-se o acoplamento máximo entre o campo incidente e o PS na condição de ressonância,

$$k_{Px} = k_{PS} , \quad (2.40)$$

onde  $k_{PS}$  é o número de onda do plásmon de superfície gerado no meio dielétrico como se observa na Fig.2.3 (b). As equações (2.39) e (2.40) permitem determinar o ângulo de ressonância, que pode-se escrever como,

$$\theta_{PS} = \arcsen\left(\frac{k_{PS}}{n_1 k_0}\right), \quad (2.41)$$

Um valor para o ângulo de ressonância para a magnitude do vetor de onda do PS pode ser obtido, substituindo (2.38) em (2.41) fornece

$$\theta_{PS} \approx \arcsen\left(\frac{1}{n_1} \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}}\right). \quad (2.42)$$

A caracterização do efeito de RPS pode ser feita com a geometria mostrada na Fig.2.3, realizando uma medição da intensidade da luz polarizada que é refletida na superfície metálica. O efeito pode ser observado utilizando um feixe de luz polarizado no plano de incidência, devido a que a oscilação requer uma componente de campo elétrico normal a interface. Ajustando o ângulo de incidência em torno do valor dado por  $\theta_{PS}$  observa-se uma absorção na intensidade de luz refletida da interface metálica. Esta técnica é conhecida *attenuated total reflection* (ATR), utilizada em muitos trabalhos como base do desenvolvimento de sensores químicos e biológicos [27,28,29,30,2,19,23,15 Sergio], como também para a caracterização de filme metálicos ao determinar tanto parâmetros óticos como espessuras [16 Sergio].

Para caracterizar o efeito RPS na configuração de Kretschmann, pode utilizar-se a formulação de Fresnel para uma camada simples, possuindo duas interfaces separando os meios 1, 2 e 3, com permissividades  $\varepsilon_1, \varepsilon_2$  e  $\varepsilon_3$  que correspondem as permissividades relativas do prisma, do metal e do meio externo, respectivamente, e sendo  $d$  é a espessura do filme metálico, como se indica na Fig.2.3. A equação que permite determinar a reflectância, é dada por [31 y 326 o 14 Gustavo]

$$R = \left| \frac{r_{12} + r_{23}e^{-2jk_2d}}{1 + r_{12}r_{23}e^{-2jk_2d}} \right|^2, \quad (2.43)$$

sendo

$$r_{12} = \frac{\varepsilon_1 k_2 - \varepsilon_2 k_1}{\varepsilon_1 k_2 + \varepsilon_2 k_1}, \quad (2.44)$$

$$r_{23} = \frac{\varepsilon_2 k_3 - \varepsilon_3 k_2}{\varepsilon_2 k_3 + \varepsilon_3 k_2}, \quad (2.45)$$

A Fig.2.4 apresenta uma curva típica que representa o efeito RPS, na qual é possível observar a influência dos parâmetros característicos da estrutura múltiplas camadas, como por exemplo, a espessura do filme, a rugosidade da superfície metálica, as constantes óticas dos meios envolvidos, etc. Modificações nestes parâmetros perturbam a posição de ressonância, a largura da curva e o valor mínimo da refletância. O estudo de esses efeitos permite a evolução de sistemas ópticos de medição e o desenvolvimento de sensores químicos e biológicos [332 Daniel].

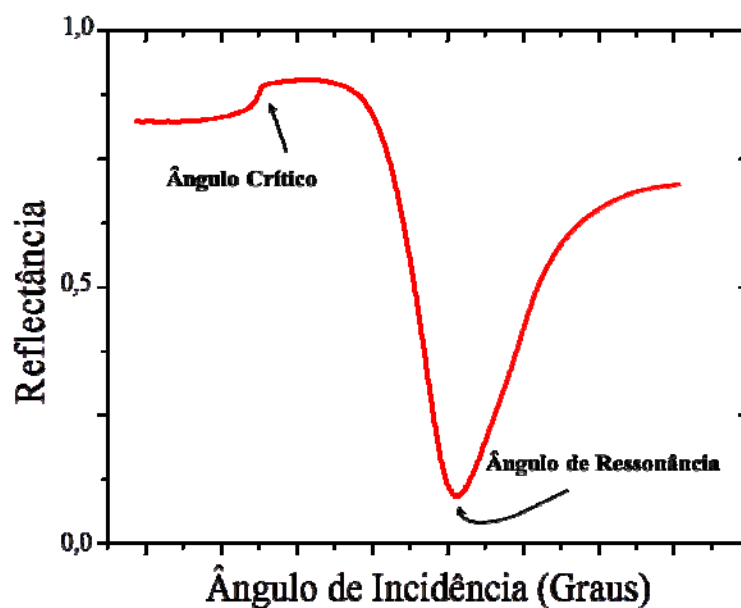


Fig.4 Função refletância, que representa o efeito RPS.

## 2.5. Parâmetros Característicos da Linha de Absorção RPS

O efeito RPS depende dos parâmetros ópticos e estruturais dos meios envolvidos. A linha estreita de absorção ressoante apresentada na figura 2.4 possibilita alcançar com alta precisão os parâmetros do filme metálico. O fato de a absorção ressonante estar situada numa região angular bastante estreita facilita que o efeito seja usado para detectar pequenas variações da permissividade do meio externo, princípio básico utilizado na elaboração de sensores. A traves do estudo e análise de alguns parâmetros é possível determinar as características otimizadas dos elementos utilizados no desenvolvimento de sensores baseado em RPS. Os três parâmetros que podem ser otimizados para obter maior sensibilidade são a meia largura de linha  $W_{PS}$ , o ângulo de ressonância  $\theta_{PS}$  e o valor mínimo de reflectância na condição de ressonância  $R_{\min}$ .

A aproximação Lorentziana para a reflectância possibilita entender os parâmetros que definem a linha do espectro RPS, esta aproximação é válida na região angular próxima ao ângulo de ressonância, que permite expressar a função de reflectância da seguinte forma [3425 Daniel]

$$R(k_x) \approx 1 - \frac{(1 - R_{\min})K''^2}{(k_x - K')^2 + K''^2} \quad (2.45)$$

onde,

$$K_x = \sqrt{\varepsilon_1} k_0 \text{sen } \theta \quad (2.46)$$

e

$$K' = \sqrt{\varepsilon_1} k_0 \text{sen } \theta_{PS} \quad (2.47)$$

Sendo  $k_x$  a componente retangular do vetor de onda incidente na interface,  $\theta$  o ângulo de incidência,  $K'$  e  $K''$  as partes real e imaginaria da componente  $x$  do vetor de onda do PS,  $\varepsilon_1$  a permissividade elétrica do prisma, e  $R_{\min}$  a reflectância mínima justamente na condição de ressonância  $k_x = K'$ , considerando que  $R = \bar{R}$  se  $|K''| = k_x - K'$ , e possível obter

$$|K''| = \sqrt{\varepsilon_1} k_0 (\text{sen } \theta - \text{sen } \theta_{PS}). \quad (2.48)$$



Para pequenas perdas tem se que  $|K''| \ll K'$ , ou equivalentemente  $w_{PS} \ll \theta_{PS}$ , onde  $w_{PS}$  corresponde a meia largura angular, realizando a seguinte aproximação de primeira ordem para a função seno,

$$\text{sen } \theta \approx \text{sen } \theta_{PS} + \left( \frac{d}{d\theta} \text{sen } \theta \Big|_{\theta=\theta_{PS}} \right) \Delta\theta = \text{sen } \theta_{PS} + \cos \theta_{PS} (\theta - \theta_{PS}) \quad (2.49)$$

A equação (2.48) pode-se transformar em

$$|K''| = \sqrt{\varepsilon_1} k_0 w_{PS} \cos \theta_{PS}. \quad (2.50)$$

Os parâmetros meia largura de linha  $w_{PS}$  o ângulo de ressonância  $\theta_{PS}$  e o valor mínimo de refletância na condição de ressonância  $R_{\min}$ , anteriormente tratados podem-se apreciar na Fig.2.5.

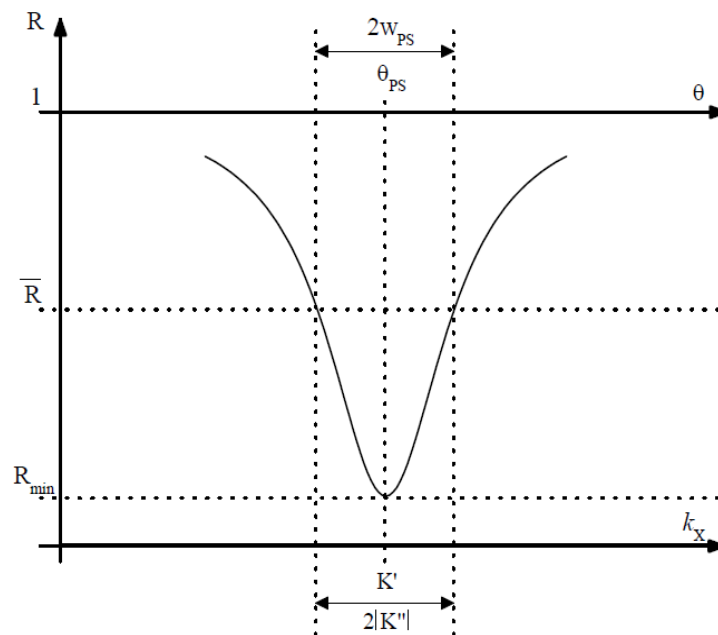


Fig.5 Curva de ressonância que mostra os parâmetros de  $\theta_{PS}$ ,  $w_{PS}$ ,  $R_{\min}$ ,  $\bar{R}$ ,  $K'$  e  $|K''|$ .

Considerando a equação (2.45) e os parâmetros apresentados em na Fig. 2.5 é possível obter a refletância media  $R_{\min}$ , como:

$$\bar{R} = \frac{1}{2}(1 + R_{\min}) \quad (2.51)$$

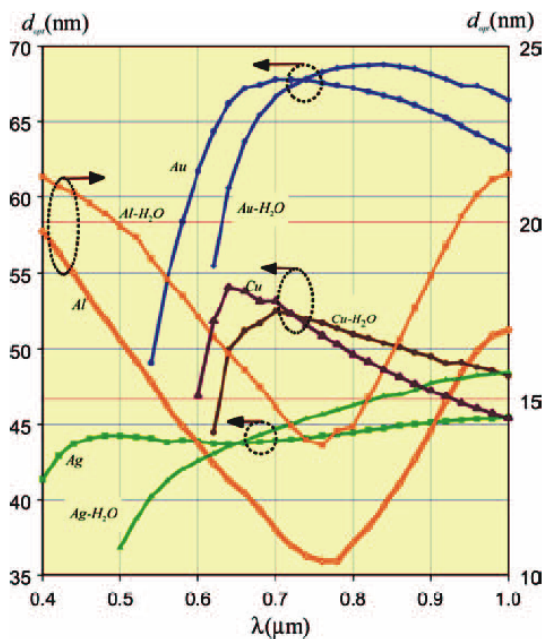
Substituindo as equações (2.46), (2.47) e (2.50) em (2.45) a reflectância assume a forma

$$R(\theta) \approx 1 - \frac{(1 - R_{\min})W_{PS}^2}{(\theta - \theta_{PS})^2 + W_{PS}^2} \quad (2.52)$$

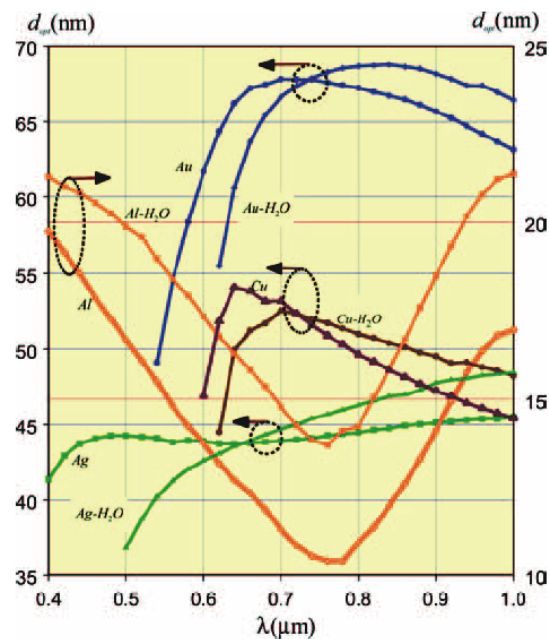
Definindo a meia largura reduzida  $W_r$  como  $W_r = \frac{W_{PS}}{\sqrt{3}}$ .

O deslocamento angular abaixo ou acima do valor  $\theta_{PS}$  onde sucede a máxima declividade da curva está diretamente relacionado à sensibilidade do efeito com modificações 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 pode-se reconhecer a região de comprimentos de onda de máxima sensibilidade, potencializando assim o efeito de RPS no desenvolvimento de sensores [7gustavo].

Para concluir o estudo do fenômeno de RPS é apresentado o comportamento do efeito nos filmes metálicos frequentemente utilizados nas pesquisas, e apresentados na literatura. Existem várias curvas teóricas, que possibilitam determinar tanto o metal como o comprimento de onda que minimiza a média largura reduzida  $W_r$ , considerando o vácuo e água como meio em contato com o filme metálico conforme se ilustra na Fig.2.6. Nesta figura é possível observar a configuração SF2-Metal-Vácuo (2.6-a) e SF2-Metal-Água (2.6-b) respectivamente, observa-se que para o caso da estrutura SF2-Au-Vácuo o  $W_r$  obtido é aproximadamente  $0,02^\circ$  para  $\lambda = 975$  nm, sendo está a menor largura reduzida entre os metais apresentados. Essa característica torna atrativa a utilização do ouro no estudo do PS e, além disso, este metal possui alta estabilidade química quando exposto à atmosfera [3522 gustavo – 367 daniel].



(a) Daniel pag 75Bucar pdf wr

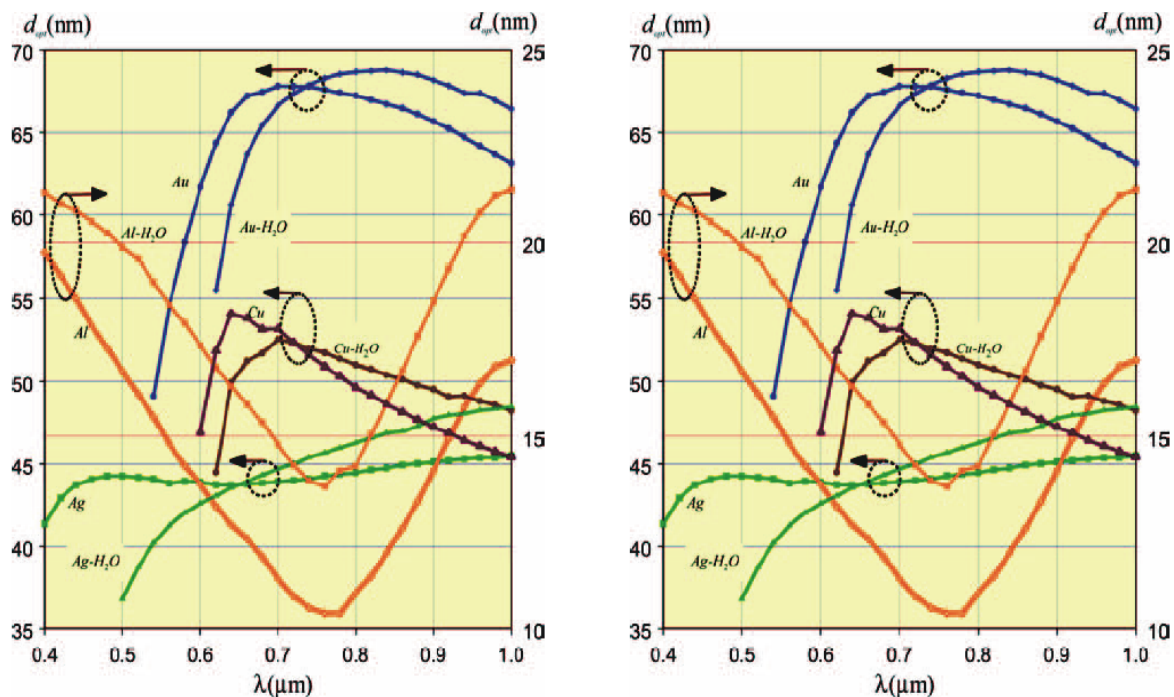


(b) Daniel pag 76 buscar pdf wr

Fig.6 (a) dependência espectral da meia largura reduzida da RPS para cobre, prata, alumínio e ouro na configuração Metal-Vácuo de Krestschmann com prisma SF2 (b) dependência espectral da meia largura reduzida da RPS para cobre, prata, alumínio e ouro na configuração Metal-Água de Krestschmann com prisma SF2.

Um parâmetro importante na construção do sensor é a espessura, conforme se observa na Fig.2.7-a (Espessura  $d$ ) mostra que os metais nobres como o cobre (Cu), a prata (Ag), o alumínio (Al) e ouro (Au), têm uma espessura de ótima para o estudo RPS, observando que os filmes de ouro para comprimentos de onda no infravermelho ( $\lambda=975.1$  nm) podem ser otimizados com espessuras entre 62,5 e 65nm.

Outro parâmetro relevante no sensor é a posição do ângulo de ressonância. Neste caso quanto mais próximo ao ângulo de ressonância estiver de  $60^0$  mais facilmente é possível medir a curva de RPS, impedindo uma incidência rasante na face externa do prisma, ademais de facilitar que a célula de difusão funcione basicamente na configuração horizontal, facilitando a manipulação de amostras líquidas. A Fig.2.7-b apresenta a dependência espectral do ângulo de ressonância para a espessura ótima dos filmes metálicos, observa-se que o ângulo de ressonância para o ouro no vácuo para  $\lambda=975.1$  nm fica próximo de  $56^0$ .



(a) Gustavo pag 20 trocar para SF2 Espessura

(b) Daniel pag 77 Bucar pdf angulo RPS

Fig.2.7 (a) dependência espectral da espessura ótima, para cobre, prata, alumínio e ouro na configuração de Krestschmann com prisma SF2 (b) dependência espectral de  $\theta_{PS}$  para cobre, prata, alumínio e ouro na configuração SF2-Metal-Água.

## 2.6. Efeito RPS no Desenvolvimento de Sensores Biomoleculares

O princípio de funcionamento dos sensores biomoleculares RPS está baseado na dependência que existe entre  $k_{PS}$  e o índice de refração do meio dielétrico que forma a interface por onde propaga-se o PS, e na possibilidade de gerar uma alteração local de índice de refração na proximidade da interface como resultado de uma reação molecular. Esta dependência além de permitir estudar as características da superfície dos metais, possibilita a utilização de PS como "sondas" que determinam a variação do índice de refração do meio dielétrico produzido na proximidade (até várias centenas de nanômetros para uma interface ouro-água) da superfície do metal. Sacado de REP 219 pag 54 do pdf.

### 2.6.1. Variação do Índice de Refração do Meio Dielétrico nas Proximidades da Interface.

A condição de excitação dos PS para a configuração de Kretschmann, depende da constante dielétrica do meio dielétrico (também denominado meio externo) como é observado nas equações (2.37) e (2.46). Por isso é importante analisar as perturbações que sofre o vetor de onda do PS, por efeito das variações no índice de refração no meio externo. Na Fig.2.8 ilustra-se por um lado, o cambio volumétrico homogêneo de todo o índice de refração do meio externo e por outro, o cambio superficial homogêneo produzido por uma fina camada de espessura  $d$  que é inferior ao comprimento de penetração do campo eletromagnético no meio dielétrico. A perturbação do vetor de onda será denotada como  $\delta k_{PS} = k_{PS} - \bar{k}_{PS}$ , sendo  $\bar{k}_{PS}$  o novo vetor de onda.

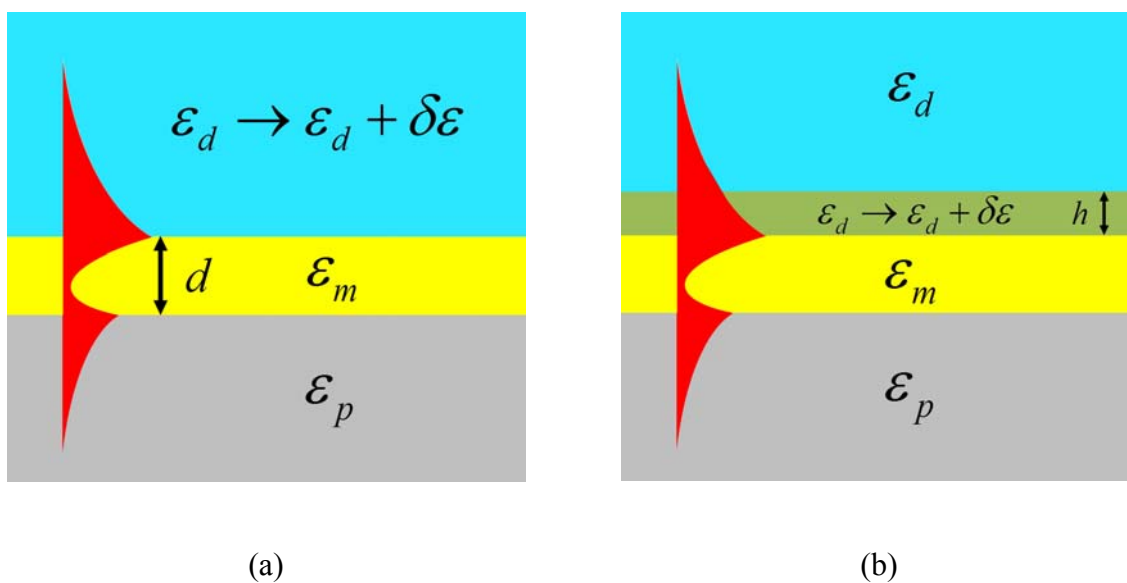


Fig.7 (a) cambio de índice de refração volumétrico e (b) superficial do meio externo.

Na Fig.2.8  $\epsilon_p$ ,  $\epsilon_m$  e  $\epsilon_d$  correspondem com as permissividades do prisma, metal e meio dielétrico respectivamente,  $d$  e  $h$  corresponde com as espessuras do filme metálico e da camada de agente biomolecular que modifica em  $\delta\epsilon$  a permissividade do meio dielétrico externo.

### 2.6.1.1. Cambio do Índice de Refração Volumétrico

A partir do ponto de vista teórico, a variação que experimenta  $k_{PS}$ , como consequência da alteração do índice de refração do dielétrico externo ( $\varepsilon(x) \rightarrow \bar{\varepsilon}(x) = \varepsilon(x) + \delta\varepsilon$ ), pode ser analisada pela teoria de perturbação das guias de onda, que teoricamente é muito similar à teoria que explica a excitação de PS pela configuração de Kretschmann utilizada neste trabalho. [98 REP\_219]. Uma estrutura que contém um fino filme metálico que se encontra localizado entre dois dielétricos, mostra que a perturbação do vetor de ondas dos plásmos de superfície possui um perfil de índices de refração da forma:

$$\varepsilon(x) = \begin{cases} \varepsilon_d & \\ \varepsilon_m & \\ \varepsilon_p & \end{cases} \quad \bar{\varepsilon}(x) = \begin{cases} \varepsilon_d + \delta\varepsilon & x \geq 0 \\ \varepsilon_m & -d \leq x \leq 0 \\ \varepsilon_p & x \leq -d \end{cases} \quad (2.54)$$

Por um lado, a variação sofrida pelo vetor de ondas  $k_{PS}$  diminui à medida que se reduz a espessura do filme metálico, razão por a qual o campo eletromagnético tende a estender-se no prisma, isto como resultado da proximidade com a espessura de corte, que uma vez é sobre passada o  $k_{PS}$  converte-se em uma onda plana em uma situação de reflexão total. Por outro lado, a diminuição de  $\delta k_{PS}$  com a espessura é menos pronunciada a medida que o comprimento da onda incidente aumenta, da mesma maneira, existe também uma diminuição da variação de  $\delta k_{PS}$  como consequência do aumento do comprimento de onda incidente.

A variação que o vetor de onda incidente experimenta como consequência de  $\delta\varepsilon$ , pode ser simplificada para uma onda que se propaga em uma interface metal-dielétrico, permitindo obter uma expressão para  $\delta k_{PS}$  que permita uma melhor compressão de se mesmo e de sua dependência com as constantes dielétricas dos meios envolvidos. Será suficiente com avaliar a equação (15 de REP\_219) para dois índices de refração do meio dielétrico diferentes  $\varepsilon_d$  e  $\varepsilon_d + \delta\varepsilon$ , para assim poder determinar  $\delta k_{PS}$ . De esta forma para

pequenas alterações da constante dielétrica do meio dielétrico ( $|\varepsilon_d| \ll |\delta\varepsilon|$ ), pode-se assumir que os campos na interface permanecem iguais e o vector de onda apenas variara  $|k_{PS} - \bar{k}_{PS}| \ll |k_{PS}|$ . Tendo em conta o anterior,  $\delta k_{PS}$  pode desenvolver-se até obter que

$$\delta k_{PS_{\text{volumetrica}}} = k_{PS} - \bar{k}_{PS} = \frac{(k_{PS})^3}{2k_0^2 \varepsilon_d^2} \delta\varepsilon \quad (2.55)$$

É possível reescrever a perturbação  $\delta k_{PS}$  em função do índice de propagação efetivo do PS, usualmente denotado como  $N_{PS}$  obtendo

$$(\delta k_{PS}/k_0)_{\text{volumetrico}} = \left( \frac{N_{PS}}{n_d} \right)^3 \delta n, \quad (2.56)$$

onde  $N_{PS} = k_{PS}/k_0$  e  $\delta\varepsilon = 2n_d \delta n$ . Levando em consideração o rango do infravermelho, se observa que os metais nobres (por exemplo ouro ou a prata) com  $|\varepsilon'_m| < \varepsilon_d$  possuem uma componente imaginaria da constante dielétrica muito menor que sua parte real  $|\varepsilon'_m| \gg |\varepsilon''_m|$  ademais, se for negligenciada a absorção do dielétrico, a equação (2.56) pode simplificar-se até obter que

$$(\delta k_{PS}/k_0)_{\text{volumetrico}} \approx \left( \frac{\varepsilon'_m}{\varepsilon'_m + \varepsilon_d} \right)^{3/2} \delta n \quad (2.57)$$

A Fig.2.9 mostra a variação do vector de ondas do PS de uma única interface metal-dielétrico (equação 2.57) no caso da interface ouro-dielétrico ante um câmbio de índice de refração volumétrico do meio dielétrico, assumindo distintos valores de  $n_d$  com as constantes óticas de [172 REP\_ 219-Jonhson] e tomando como variação do índice de refração do meio externo  $\delta n = 0,01$ .

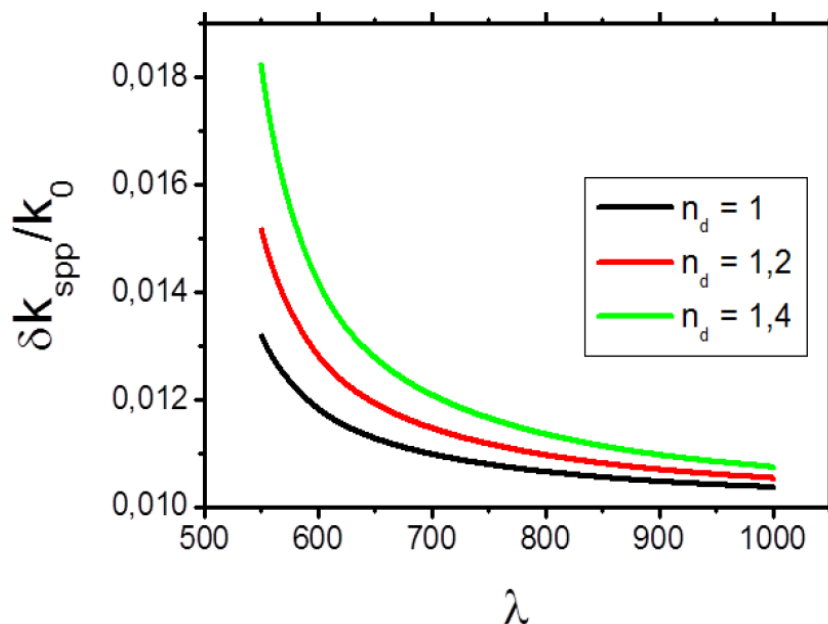


Fig.8 Variação do vetor de ondas do PS de uma única interface metal-dielétrico ante um cambio de índice de refração volumétrico do meio dielétrico para três valores diferentes de  $n_d$  (1, 1.2 e 1.4) [REP\_219]

Na Fig.2.9 é possível observar que  $\delta k_{ps}$  diminui à medida que aumenta o comprimento de onda, enquanto a mesma variação incrementa-se de forma proporcional com o valor do índice de refração do meio externo.

### 2.6.1.2. Cambio do Índice de Refração Superficial

As expressões anteriormente calculadas correspondem com a variação do índice de refração volumétrico, é dizer, em todo o meio externo. Além disso, nas aplicações em biosensores os câmbios de índice de refração devidos à reações biológicas são produzidos unicamente em uma região próxima à superfície metálica (Fig.2.8-b). Portanto, unicamente uma parte da onda evanescente interacionará com a camada biológica. A fracção do campo evanescente empregada na detecção depende do tamanho do agente molecular y da intensidade e distancia de penetração do campo eletromagnético.

Devido ao caráter evanescente do campo eletromagnético pelo que se propaga o PS, no caso em que o câmbio de índice de refração do meio dielétrico seja produzido em uma região de espessura muito menor que a distancia de penetração do dielétrico e próxima à



interface, o  $\delta k_{ps}$  experimentado pelo câmbio de índice de refração superficial será proporcional à espessura  $d$  e sempre menor que o experimentado por um câmbio de índice de refração volumétrico. Contudo, a dependência espectral exibida na Fig.2.9 seguirá sendo válida para esta situação. Ambos parâmetros,  $\delta k_{ps}$  volumétrico e superficial, são iguais quando a espessura  $h$  abrange o comprimento total do campo evanescente em o meio dielétrico.

## 2.7. Diferentes Formas de Detecção em Sensores RPS

Os sensores biomoleculares baseados na técnica da RPS, estão compostos basicamente por três elementos fundamentais: a fonte de luz, a configuração óptica e finalmente a forma de detecção. Partindo da configuração de Kretschmann é possível fazer uma classificação em função do tipo de fonte de luz utilizada e do sistema de detecção empregado. A Fig.2.10 apresenta um gráfico que mostra a classificação dos sensores biomoleculares, baseados na configuração óptica de Kretschmann.

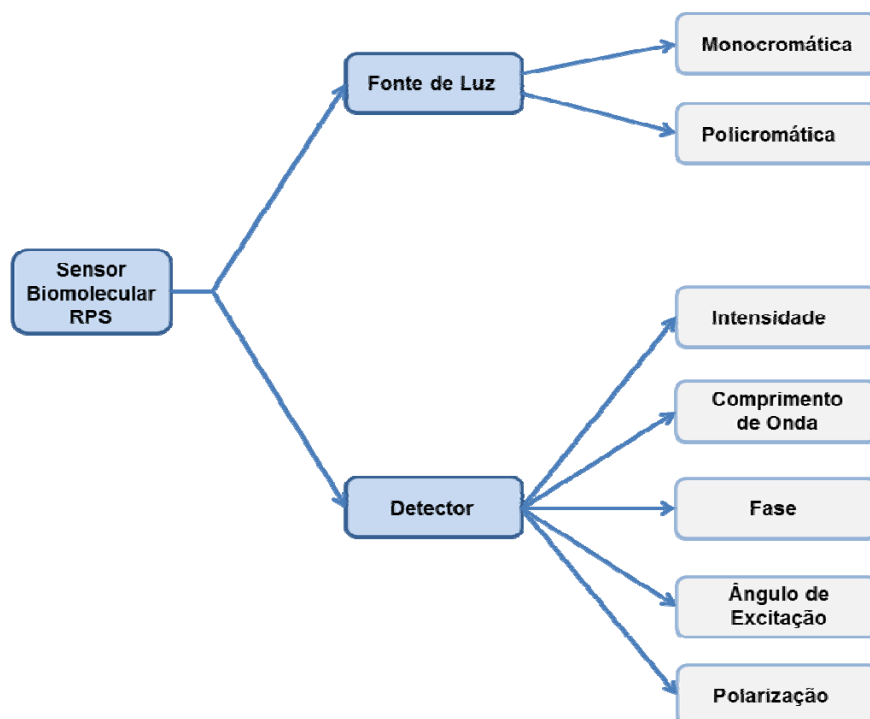


Fig.9 Classificação dos sensores biomoleculares RPS, baseados na configuração óptica de Kretschmann.

Entre as diferentes formas de medição usadas pelos biosensores RPS destaca-se dois principalmente já que são as configurações mais utilizadas: os sensores baseados na medição da intensidade de luz refletida na interfase metal – dielétrico e os sensores que medem as variações do ângulo de ressonância, utilizando em ambos os casos uma fonte de luz monocromática. Além destas existe uma terceira configuração na qual são medidas as variações do comprimento de onda na ressonância, quando o sistema permanece em um ângulo fixo utilizando uma fonte de luz policromática.

### 2.7.1. Sensor RPS Baseado na determinação da Variação do Ângulo $\theta_{PS}$

O sensor RPS angular, encarga-se de monitorar as variações do ângulo  $\theta_{PS}$ , onde se produz a ressonância dos plásmon de superfície, ou seja, o ângulo de incidência em que é obtido o mínimo da intensidade refletida na interfase metal – dielétrico. A Fig.2.11 mostra dois espectros RPS, com ângulos  $\theta_{PS}$  diferentes que correspondem respectivamente a médios dielétricos com propriedades ópticas distintas, como por exemplo índices de refração diferentes, ou incluso a câmbios na temperatura da amostra.

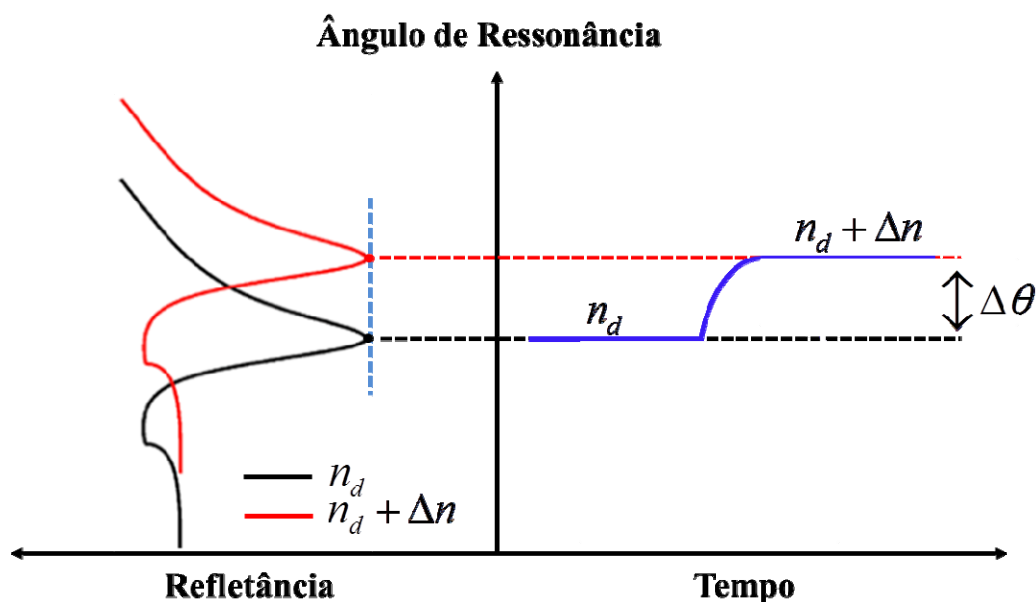


Fig.10 Forma de detectar câmbios no índice de refração, a partir da medição do  $\Delta\theta_{PS}$ .

Na Fig.2.11  $\Delta\theta$  representa a diferença do ângulo de ressonância entre duas amostras distintas,  $n_d$  e  $n_d + \Delta n$  que correspondem ao índice de refração da amostra inicial e final respectivamente.

### 2.7.2. Sensor RPS Baseado na determinação da Variação da Refletância

A diferença do sensor RPS angular, o sensor RPS espectral monitoriza a variação da intensidade dos câmbios na refletância para um ângulo fixo, ângulo em que a derivada da curva de refletância é máxima. A forma em que é feita a medição de índices de refração neste caso e apresentada graficamente na Fig.2.12

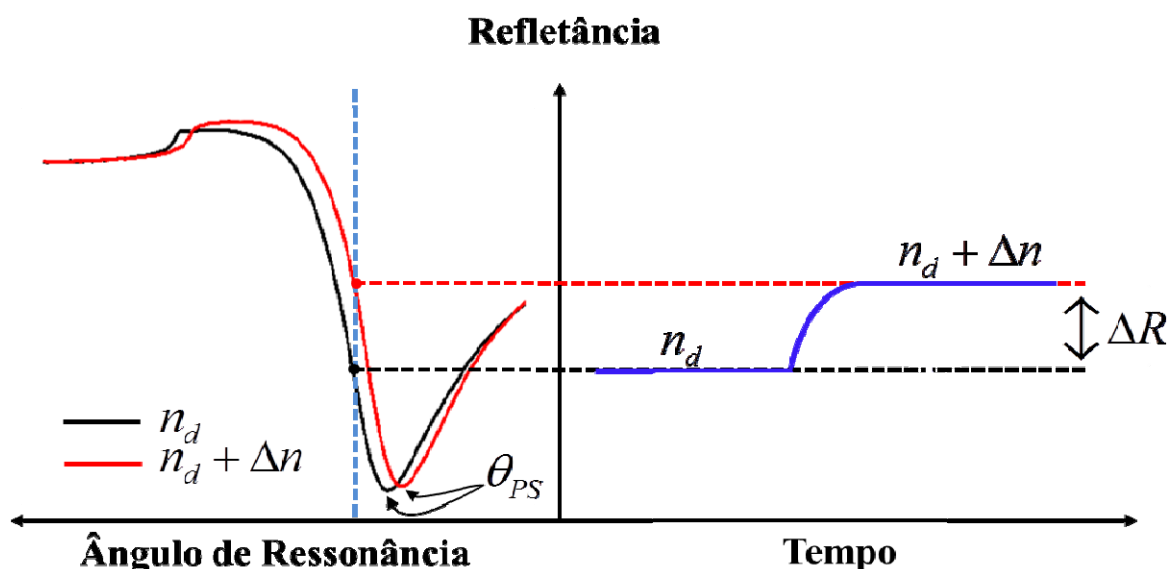


Fig.11 Forma de detectar câmbios no índice de refração, a partir da medição do  $\Delta R$ .

Na Fig.2.12  $\Delta R$  corresponde à diferença de refletância entre duas curvas para o mesmo valor angular, que mostra a variação para distintas amostras entre  $n_d$  e  $n_d + \Delta n$ . Os sensores biomoleculares baseados na variação angular e de intensidade, são denominados convencionais, já que são empregados com mais frequência em dispositivos comerciais, devido a sua versatilidade, simplicidade e baixo custo, caso que não ocorre com os sensores espectrais, que se encargam em determinar  $\Delta\lambda$  como a variação do comprimento de onda [x]. (buscar referencia para isto) Sacado de REP 219 para complementar

## 2.8. Sensibilidade do Sensor RPS

A sensibilidade do sensor RPS depende drasticamente das variações produzidas no meio dielétrico ou externo que modificar o vetor de onda PS, da distancia de penetração do campo eletromagnético e da distancia de propagação do SP. Os parâmetros anteriormente mencionados dependem das constantes dielétricas dos distintos meios, que a sua vez dependem do comprimento de onda.

A sensibilidade de um sensor RPS esta definida neste caso como

$$S_{RPS}(\theta) = \frac{\Delta\theta_{PS}}{\Delta n}, \quad (4.2)$$

onde  $\Delta\theta_{PS}$  e  $\Delta n$  correspondem com as variações experimentadas pelo meio externo do ângulo de ressonância e índice de refração respectivamente, para cada uma das concentrações estudadas. Valores que foram obtidos a partir da diferenciação de cada uma das curvas RPS da Fig.4.13 e da equação (3.6) respectivamente. A Fig.4.13 mostra o comportamento linear onde a derivada corresponde com  $S_{RPS}(\theta) \approx 94$ .

### ***3. Materiais e Métodos***

O processo de construção e desenvolvimento de sensores baseados no efeito da ressonância de plásmon de superfície ou RPS, é um procedimento que geralmente implica a convergência de vários campos do conhecimento, e a utilização de equipamentos especializados que geralmente são de custos elevados, optando-se no melhor dos casos por construir o próprio desenho, o que implica que os resultados apresentem-se de uma maneira mais lenta.

Para realizar este trabalho foram utilizados principalmente dois equipamentos desenvolvidos no laboratório de Fotônica do DES-UFPE. O reflectômetro automatizado [Ref. Gustavo] e o módulo de infusão [Ref. Loibman]. Neste capítulo serão detalhados os equipamentos, e a metodologia utilizada na caracterização e integração dos sistemas anteriormente mencionados. A metodologia inclui o procedimento utilizado nos experimentos que fornecem o bom funcionamento dos equipamentos, indicando que o sistema pode ser utilizado em pesquisas mais específicas, orientadas na caracterização de reações biomoleculares.

#### ***3.1. Reflectômetro Automatizado***

O reflectômetro utilizado é um equipamento de alta precisão, que possui entre suas aplicações a possibilidade de determinar propriedades ópticas e estruturais de interfaces e o desenvolvimento de sensores biológicos. O funcionamento do reflectômetro inclui várias etapas, as quais devem ser adequadas para obter espectros de ressonância bem definidos. As etapas mais importantes do sistema são: o acondicionamento da fonte de luz, a movimentação do prisma (rotacional e translacional) e finalmente o controle, detecção e processamento do sinal, etapas que serão detalhadas posteriormente, a fim de entender sua funcionalidade dentro do reflectômetro. A Fig.3.1 apresenta o diagrama setorizado do reflectômetro, onde é possível apreciar cada uma das partes que conformam as três etapas do seu funcionamento.

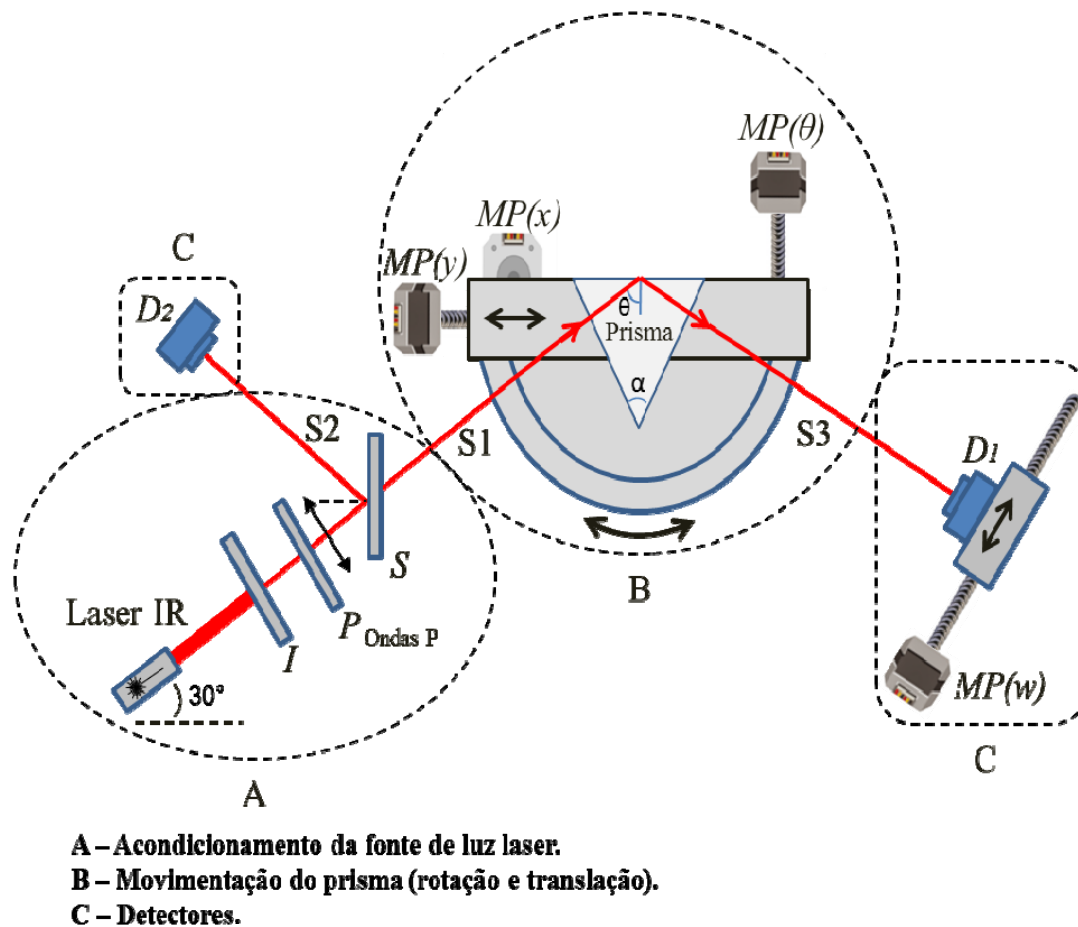


Fig.12 Diagrama esquemático e setorizado do reflectômetro.  $D_1$  e  $D_2$  fotodetectores de sinal e referência respectivamente,  $I$  – Íris,  $P$  – Polarizador,  $S$  – Splitter,  $MP(\theta)$  – Motor de passo do estágio de rotação,  $MP(x)$  – motor de passo de translação  $x$ ,  $MP(y)$  – Motor de passo para translação  $y$ ,  $MP(w)$  – Motor de passo para correção do fotodetector  $D_1$ .

Dependendo das necessidades o reflectômetro permite trabalhar com diferentes tipos de prisma, como por exemplo, prismas retos de vidro BK7 ( $n=1,515$ , para  $\lambda = 975,1nm$ ), utilizado geralmente em experimentos com gases, ou prismas equiláteros de vidro SF2 ( $n=1,643$ , para  $\lambda = 975,1nm$ ). O emprego de desse último com maior índice de refração, permite realizar testes com soluções aquosas, já que desloca a linha 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 o posicionamento da célula de infusão.

O prisma utilizado neste trabalho é um prisma equilátero de vidro SF2, com aristas de 50 mm, e valores nominais para o ângulo interno de  $\alpha = 60^\circ$ , como se observa na Fig.3.1.

### 3.1.1. Acondicionamento do Laser

Para obter a polarização de ondas P, o reflectômetro precisa de uma fonte de luz laser polarizada e colimada, por conseguinte é necessário acondicionar a sinal. As partes utilizadas para ao acondicionamento de laser são: uma fonte de emissão laser de estado solido não polarizada, marca Melles Griop, com comprimento de onda no intervalo do infravermelho de 975,1 nm, e potência de 73 mW, um íris (*I*), um polarizador (*P*) e um semi-espelho (*S*). (Fig.13)

O feixe do laser utilizado neste trabalho possui um diâmetro da ordem de 1 cm, a fim de reduzir este diâmetro foi passado a través de um íris (*I*) sendo obtido um raio com um diâmetro de aproximadamente 1 mm, seguidamente o feixe foi polarizado no plano de incidência [Referencia para ondas P e S]. Uma vez que o feixe se encontra colimado e polarizado é dividido por um semi-espelho, em dos raios: (*S1*) em direção ao prisma e (*S2*) em direção ao fotodetector de referência  $D_2$ , que em conjunto com o fotodetector  $D_1$ , produziram os sinais que permitiram determinar a reflectância dentro do sistema, tal como será detalhado no apartado 3.1.3.

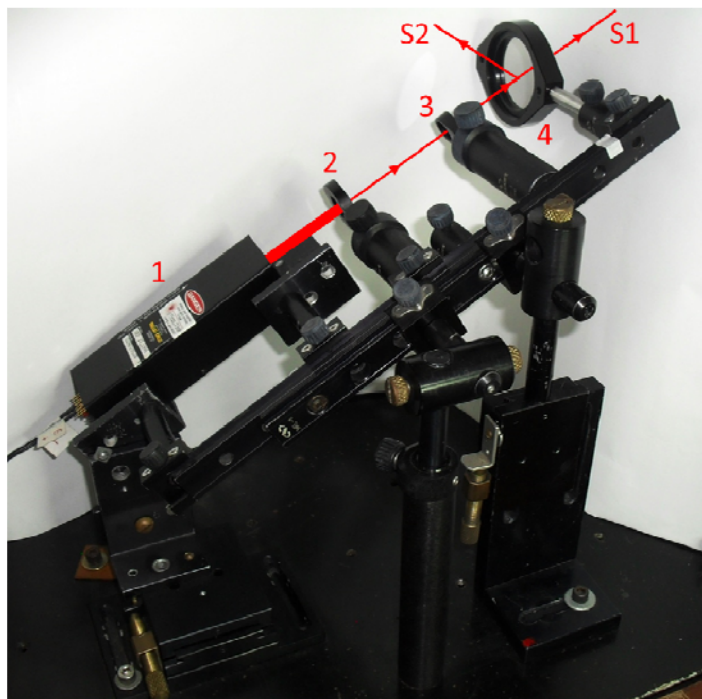


Fig.14 Fotografia partes utilizadas no acondicionamento do laser. (1) Laser Infravermelho  $\lambda=971,5$  nm; (2) Íris (*I*); (3) Polarizador no plano de incidência (*P*) e (4) Semi-espelho (*S*).

### 3.1.2. Movimentação do Prisma

Para lograr que o prisma equilátero logre movimentos tanto de rotação como de translação (eixos  $x$  e  $y$ ), o reflectômetro possui um sistema mecanizado que permite fixar o prisma de um suporte com liberdade de rotação em torno do eixo que passa pelo incentro da face triangular do prisma, com movimento controlado pelo motor de passo  $MP(\theta)$ . Também é possível realizar movimentos de translação ao longo de duas direções ortogonais, no plano do substrato de vidro, que podem ser realizadas por médio dos motores de passo  $MP(x)$ ,  $MP(y)$ . Os motores anteriormente mencionados são acionados independentemente por o sistema de controle que se especifica no apartado 3.1.3. O mecanismo de movimentação do prisma é apresentado na Fig.3.3

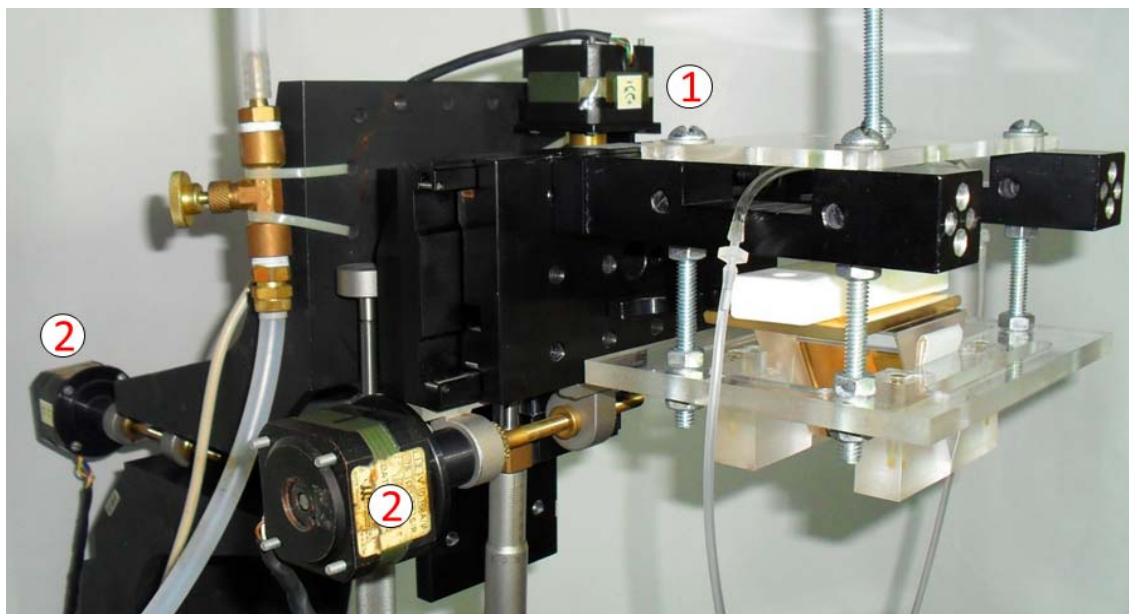


Fig.15 Mecanismo da movimentação do prisma. (1)  $MP(\theta)$  – Motor de Rotação; (2)  $MP(x)$  – Motor de Translação em  $x$  e (3)  $MP(y)$  – Motor de Translação em  $y$ .

### 3.1.3. Detecção, Controle e Processamento

O processo de detecção involucra os feixes S2 e S3 que incidem respectivamente nos fotodetectores  $D_2$  (fotodetector de referência) e  $D_1$  (fotodetector de sinal) respectivamente. Sendo S2 o feixe refletido no semi-espelho e S3 o feixe transmitido no ar



depois que o feixe S1 reflete-se na interface metal-liquido. Os feixes e fotodetectores anteriormente mencionados podem-se apreciar na Fig. 3.4.

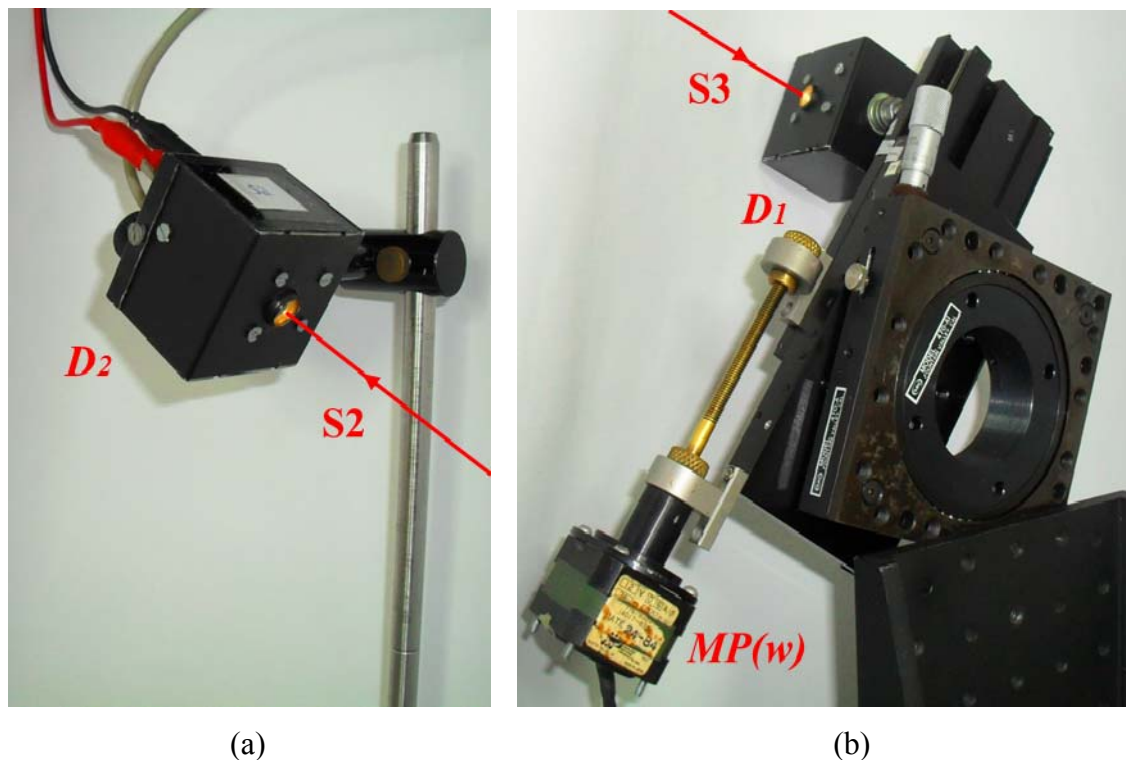


Fig.16 (a) Fotodetector de referência  $D_2$  e (b) fotodetector de sinal  $D_1$ .

O fotodetector  $D_2$ , sempre em posição fixa, mede a intensidade do feixe S2, com o objetivo de eliminar qualquer flutuação na potencia do laser. O segundo fotodetector  $D_1$  é movimentado por o motor de passo  $MP(w)$ , mantendo-o na posição de máxima intensidade refletida. Os dois sinais gerados por estes fotodetectores são processadas e monitoradas por dois canais de um conversor analógico-digital DAS-16, 100 kHz (Keithley Instruments, Cleveland, Ohio-EAU), instalado dentro de um PC, que junto a um software desenvolvido no ambiente *Delfi* logram o controle e processamento dos sinais de todo o sistema [referencia Gustavo]

Para que seja realizada a etapa de processamento é necessário evitar as flutuações na sinal processada pelo sistema, Para otimizar a medida de refletância são realizadas 1000 medições obtendo uma média da razão entre o sinal S3 e a sinal de referência S2, medidas que junto ao razão S1/S2, permitem determinar o valor da refletância, da fase superior do prisma por meio da seguinte equação:

$$R = \frac{S3/S2}{S1/S2} = \frac{S3}{S1} \quad (3.1)$$

Onde a razão  $S1/S2$ , é um valor invariável e independente das flutuações no nível de potencia do laser. No apartado 3.2.3, se detalha como se determina experimentalmente esta razão.

### 3.2. Alinhamento e Calibração Óptica do Reflectômetro

A metodologia estabelece que ao momento de trocar o prisma de acoplamento, por outro com geometria e dimensões diferentes, a óptica do sistema tem que ser alinhada novamente, com o objetivo de garantir que o feixe que incide perpendicularmente na face lateral do prisma seja transmitido dentro do prisma para incidir finalmente na parte central da face superior, posição do prisma que esta bem definida e é conhecida como ponto de referencia (M) [Ref. Gustavo pag. 43]. A Fig.3.5 ilustra o ponto onde deve incidir o feixe para garantir que o feixe transmitido coincida com o ponto de referencia (M).

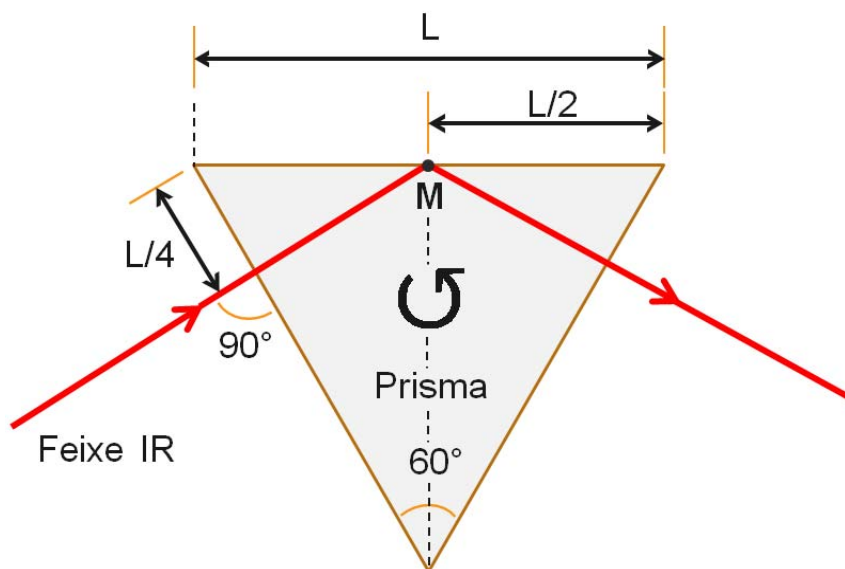


Fig.17 Configuração do prisma para definição do ponto de referencia.

Na referência [Ref. Gustavo pag. 43], detalha-se um protocolo que indicam os passos para conseguir alinhar de maneira certa o sistema para um prisma de ângulo reto.

Uma vez que neste trabalho foi utilizado um prisma equilátero foi necessário além de seguir o protocolo mencionado, realizar algumas modificações e acrescentar passos novos ao procedimento. Seguidamente indicam-se os 4 procedimentos de interesse no alinhamento do sistema.

- Protocolo para garantir que o prisma gire em sua incentro. (Acrescentando o protocolo existente na referencia [Ref. Gustavo pag. 43]).
- Pontos de referencia translacional e rotacional.
- Protocolo de calibração dos fotodetectores. (Acrescentando o protocolo existente na referencia [Ref. Gustavo pag. 50])

### ***3.2.1. Giro em sua Incentro***

Para o correto funcionamento do reflectômetro, é necessário verificar se a rotação do prisma esta sendo realizada em torno de seu incentro (I). Para lograr esse alinhamento antes de colocar o laser incidindo de forma perpendicular, são realizados os seguintes passos:

1. Garantir que um feixe vermelho fique perpendicular à mesa óptica e na metade do estagio de rotação. O laser posteriormente é localizado embaixo do suporte do prisma.
2. Fazer um desenho em papel da face triangular do prisma com marcas que indiquem o incentro (I). Desenho que posteriormente é colado na posição lateral do prisma como é mostrado na Fig.3.6.
3. Movimentar os motores  $MP(x)$ ,  $MP(y)$  e  $MP(\theta)$ , já seja com ajuda do software ou manualmente, tentando procurar que o feixe vermelho fique alinhado com a linha vertical do desenho.

Os passos anteriormente podem ser melhor entendidos com a ilustração da Fig.3.6.

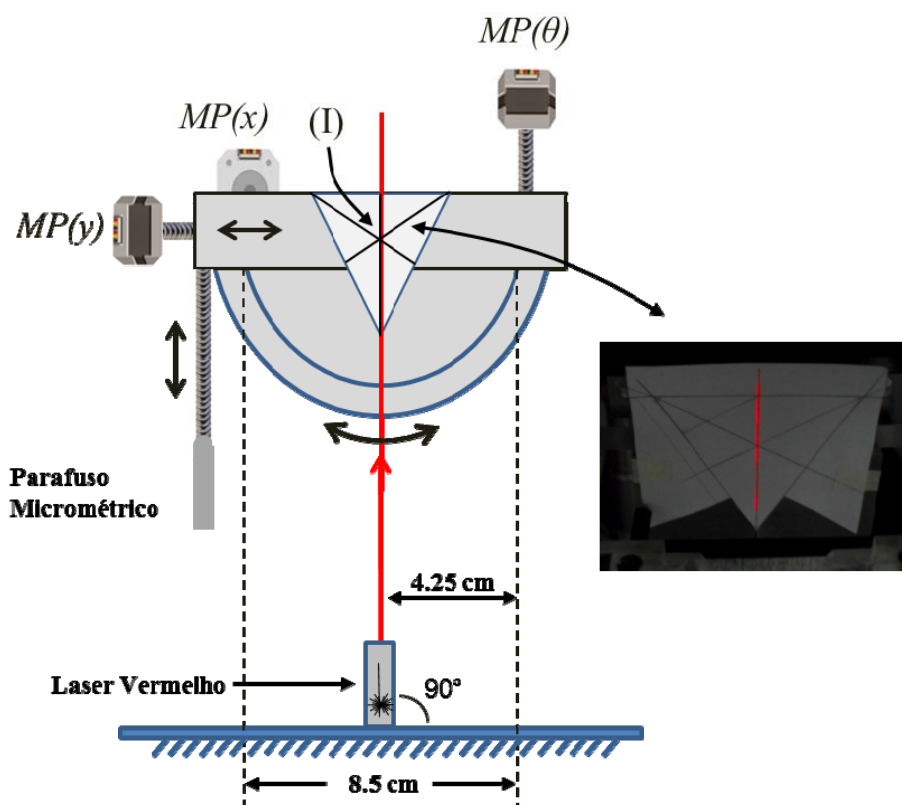
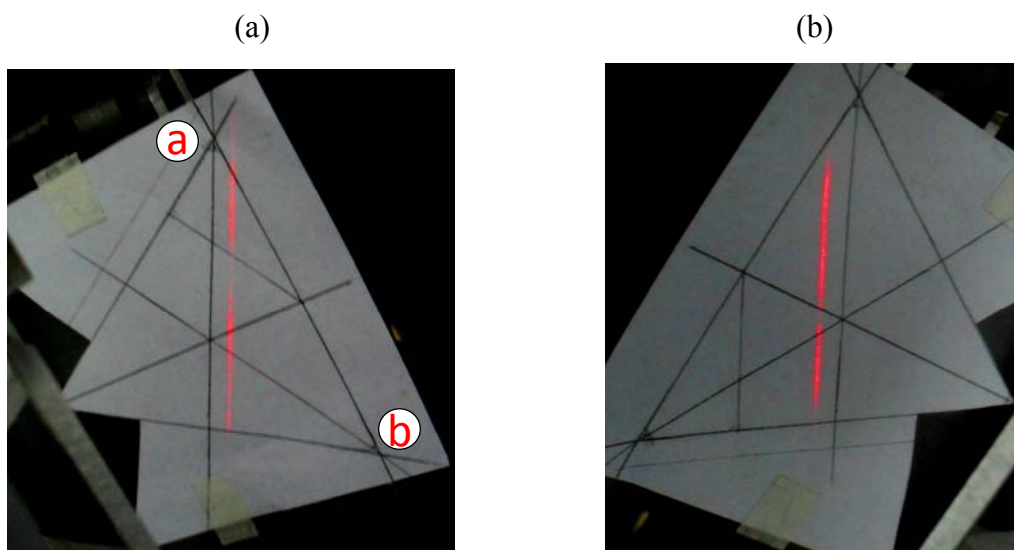


Fig.18 Procedimento para alinhar o prisma para que gire no incentro (I).

4. Rotar em sentido horário ou anti-horário o desenho procurando alinhar visualmente o feixe vermelho com as linhas que emergem dos vértices (a) e (b).
5. Com base no ponto 4, podem acontecer os casos que ilustram-se na Fig.3.7.



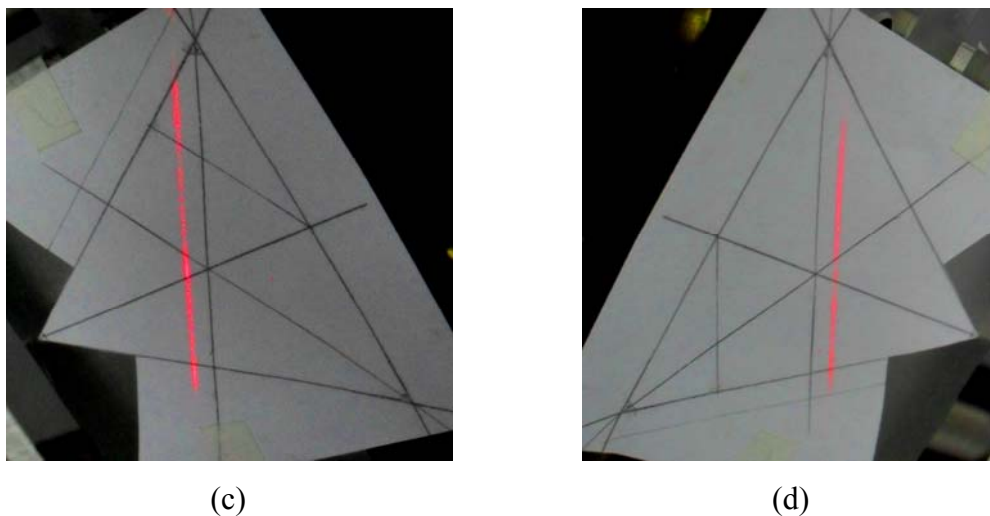


Fig.19 Procedimento para alinhar o prisma para que gire em torno do incentro.  
OJO Colocar letras a los vértices en las fotos

As Fig.3.7 (a) e (b) correspondem a rotações horário e anti-horário respectivamente, indicando que o prisma tem que subir para permanecer na posição certa, (a separação entre o feixe vermelho e a linha paralela, corresponde com a distancia que deve ser movimentado o estágio de rotação) está movimentação é feita com ajuda do parafuso micrométrico que mobiliza o estágio de rotação sobre a vertical. As Fig.3.7 (c) e (d), correspondem a rotações horário e anti-horário respectivamente, indicando que o prisma deve baixar, seguindo o mesmo procedimento indicado para o caso das Fig.3.7 (a) e (b).

### ***3.2.2. Pontos de Referencia Translacional e Rotacional***

O sistema de controle do reflectômetro tem a capacidade de armazenar assim como a posição de translação como de rotação uma vez seja fechado o aplicativo, no entanto ante um desligamento inoportuno de energia o sistema pode perder esta informação, razão pôr a qual, depois de alinhar o prisma para que gire entorno a sua incentro, é necessário assignar pontos de referencia nas posições de translação e rotação, com o objetivo de evitar realizar novamente o procedimento exposto no apartado 3.2.1.

Para determinar o ponto de referencia de translação só é necessário na parte superior do suporte do prisma fazer uma linha que indique o deslocamento entre as partes

fixa e móvel (linha contínua indica deslocamento zero em translação). O ponto de referencia rotacional pode ser determinado ao sinalar em uma tela afastada do prisma a posição do feixe refletido na face lateral do prisma, indicando desta maneira rotação zero quando o feixe refletido coincide com o ponto de referencia. A Fig.3.8 ilustra a forma de determinar os pontos de referencia discutidos anteriormente.

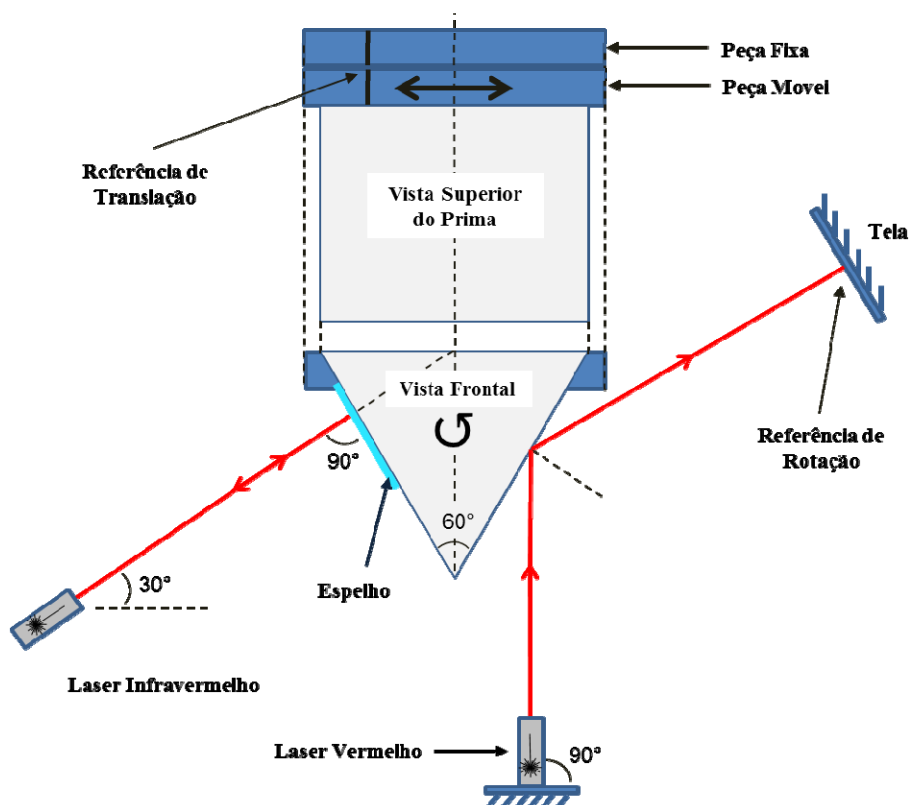


Fig.20 Alinhamento translacional e rotacional do prisma. Ojo colocar L/4 na Fig.

Uma vez determinados os pontos de referencia de translação e rotação, tem-se que garantir que o laser infravermelho incida no ponto de referencia (M), para isso o laser deve incidir perpendicularmente o prisma na posição de L/4, procedimento realizado com ajuda de um espelho como se indica na Fig.3.8.

### 3.2.3. Calibração dos Fotodetectores

Para realizar a calibração dos fotodetectores, o feixe principal é dividido em dois raios pôr o semi-espelho S, o raio transferido incide no fotodetector de sinal  $D_1$ , e o raio

refletido incide no fotodetector de referência  $D_2$ . A fim de eliminar as flutuações geradas pela fonte de luz laser, se determina a razão entre  $D_1$  e  $D_2$ , tal como se explicou no apartado 3.1.3. Nesta configuração o sistema posiciona o detector  $D_1$  procurando a maior intensidade de laser, conseguindo a melhor razão. Na Fig. 3.9 se observa que o feixe transmitido pelo semi-espelho incide diretamente no fotodetector de sinal.

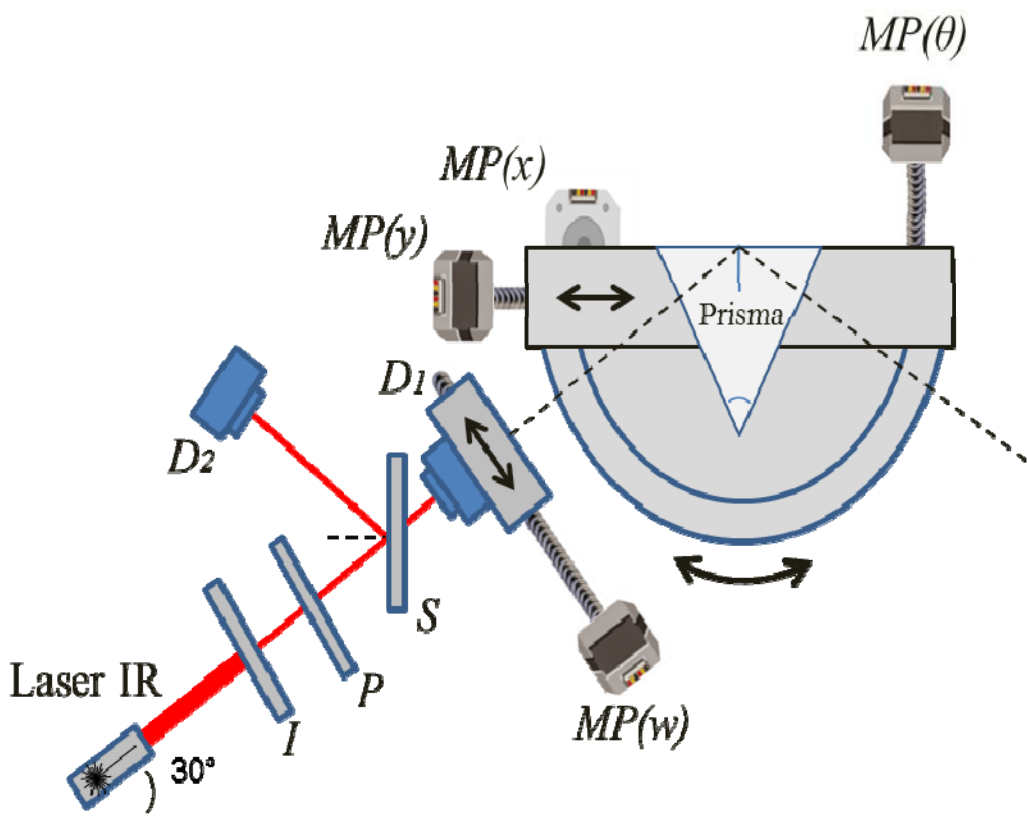


Fig.21 Calibração dos fotodetectors para a determinação da razão  $D_1/D_2$ .

### 3.3. Sistema de Infusão

O módulo de infusão é de grande importância na determinação da resposta do dispositivo sensor, já que permite determinar variáveis relevantes como a velocidade de análise, a reprodutibilidade e a confiabilidade do sistema, permitindo comparar o rendimento e desempenho com diferentes sistemas sensores ou técnicas de detecção.

O sistema utilizado neste trabalho serve ao propósito de inserir um líquido de maneira contínua ou descontínua, através de um circuito hidráulico, permitindo que a

solução aquosa em estudo flua dentro de uma célula de infusão, que está em contato direto com a superfície sensora ou filme metálico. A continuação apresentam-se as características do módulo de infusão, e o sistema hidráulico desenvolvido por o grupo de Fotônica.

### **3.3.1. Módulo de Infusão**

O módulo de infusão esta composto por um notebook com interface gráfica criada em Qt Creator, um módulo de potência controlado por um microprocessador Arduino Mega e um conjunto de peças motorizadas com suporte para as seringas. O sistema desenvolvido é capaz de controlar independentemente quatro vasões com volumes de alguns microlitros por minuto, função realizada por quatro peças motorizadas, que permitem trabalhar com 5 diferentes padrões de seringa (1, 3, 5, 10 e 20 ml). Vale a pena aclarar que o sistema permite adaptar seringas de insulina de 1ml em qualquer peça mecânica e inserir o volume na função de seringa de 10 ml, tendo em conta que nessa função 1 ml inserido é equivalente a 100 $\mu$ l. Utilizando uma seringa de insulina (1 ml), pode-se obter uma vazão mínima de 1 ml/hora, equivalente a 0.3 $\mu$ l/seg aproximadamente.

As seringas são comprimidas de maneira independente por êmbolos acionados por motores de passo de precisão (200 passos por volta), os quais ao sua vez são controlados por um microcontrolador Arduino Mega que possui una interface gráfica, criada em o software Qt Creator, que permite que o usuário desde um PC com conexão USB, poda selecionar o número de seringas com que deseja trabalhar, o volume da seringa, o volume ao inserir e o tempo no qual será realizado o procedimento. O sistema completo pode-se apreciar na Fig.3.10. [13 referência Loidmann]





Fig.22 Foto ilustrativa do sistema de infusão. 1. notebook com interface gráfica criada em Qt Creator, 2. módulo de potencia controlado por um microprocessador Arduino Mega e 3. peças motorizadas com suporte para as seringas (Extraída de [Loidmann]).

### ***3.3.2. Aquecimento da Peça Motorizada***

O calor gerado por os motores de passo em cada um das peças motorizadas causa um aquecimento de toda a peça de alumino, calor que lentamente é transferido á amostra conteúda na seringa. Este efeito térmico pode alterar o índice de refração da amostra, posto que a densidade dos líquidos diminui com o aumento da temperatura.

Com o propósito de avaliar a influência de esta variável em cada um dos espectros de refletância foram realizadas curvas que relacionam a variação de temperatura com respeito ao tempo. A seguir mostra-se na Fig.3.11 o arranjo implementado para obter as curvas de temperatura em função do tempo.

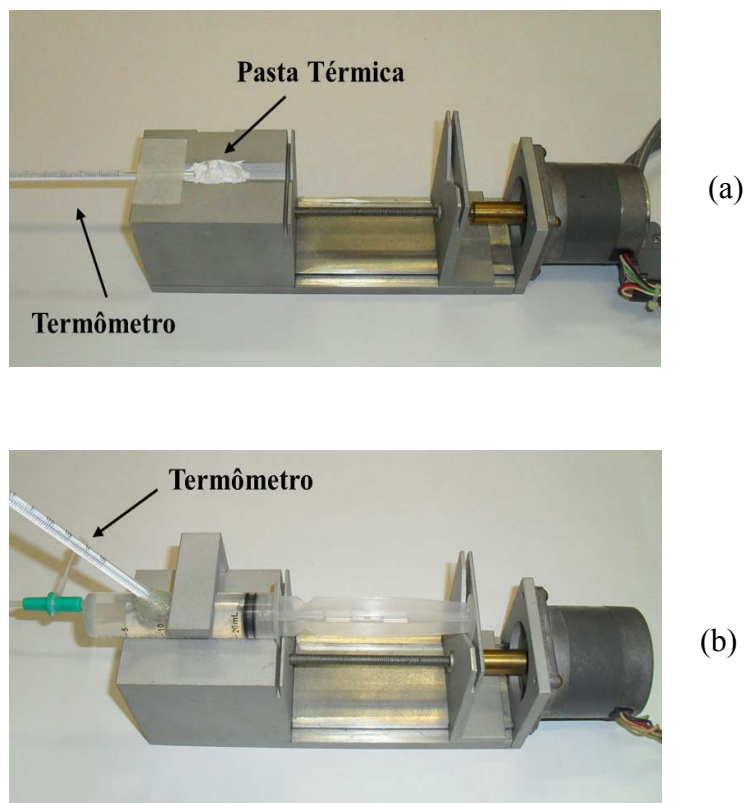


Fig.23 Forma experimental de medir a temperatura em função de tempo; (a) para a peça motorizada e (b) para a amostra ( $H_2O$  destilada) contéuda na seringa.

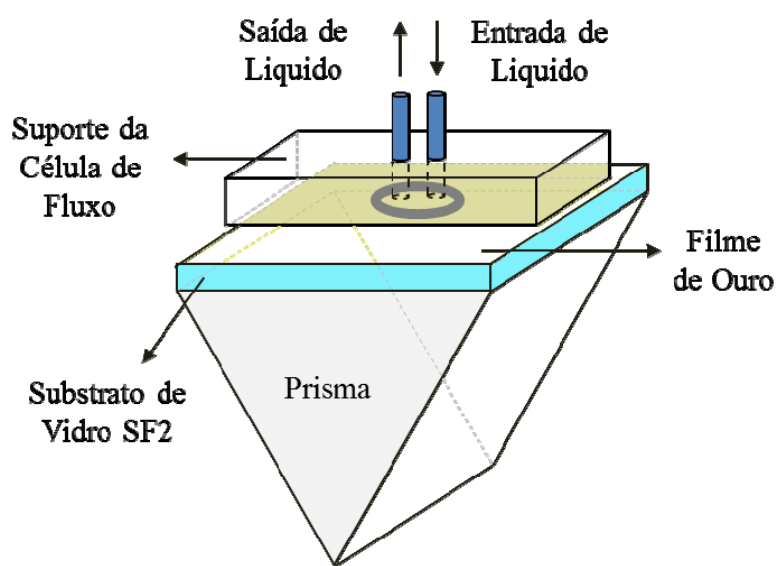
Para realizar as medidas da temperatura foi utilizado um termômetro análogo com uma incerteza de  $\pm 1^{\circ}C$ , foram realizados dos arranjos, no primeiro caso (a) o termômetro foi posicionado no suporte da seringa para medir a temperatura na peça motorizada. No segundo caso (b) o termômetro foi posicionado dentro da seringa para medir a temperatura na amostra. Nas duas situações o sistema de infusão se encontrava na função de  $5 \mu l/min$  equivalente a 4 segundos por passo.

### 3.3.3. Célula de Infusão

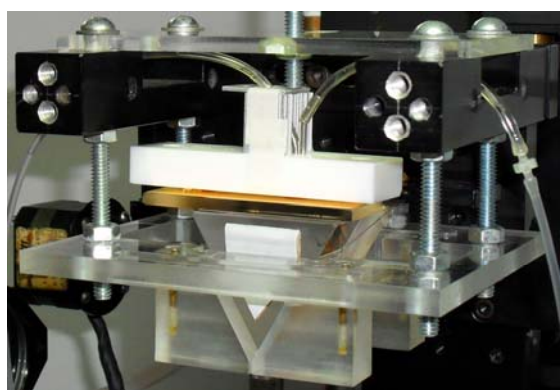
Uma célula de infusão é uma peça que possibilita confinar temporalmente o líquido que entra em contato com o filme de ouro, a peça utilizada em este trabalho foi feita em teflon, por sua baixa absorção, apresenta uma cavidade de aproximadamente  $30 \mu l$ , com

respectiva entrada e saída de fluxo. Esta célula de infusão permitiu o passo contínuo das amostras líquidas em estudo. As dimensões da célula são especificadas na Fig.3.12 (c).

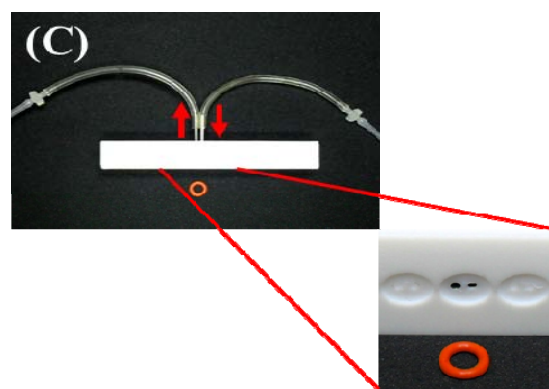
Para evitar fugas contou-se com um anel de borracha (o-ring) que se encontra entre a célula de infusão e o filme metálico, o anel apresenta as seguintes características: diâmetro interno e externo de 4.45 mm e 7.85 mm respectivamente, e espessura de 1.65 mm. A Fig.3.12 ilustra de forma detalhada a posição da célula de infusão, junto com suas partes.



(a)



(b)



(c)

OJO: dimensiones da celula de infusão. Letras em las aristas y a um lado la letra=xxcm  
Fig.24 (a) Diagrama esquemático da posição da célula de infusão; (b) fotografia da célula de infusão sobre prisma do reflectômetro e (c) partes da célula de infusão.

Para a realização de experimentos com fluxo contínuo de amostras através da célula de infusão, foi desenvolvido um circuito hidráulico com um volume aproximado de 5 ml desde a seringa até a célula de infusão. O circuito foi feito com mangueiras estomacais com diâmetro interno de 2 mm aproximadamente, infusores IF05C de duas vias (Compojet) e torneiras de 3 vias (Embramed), com esses componentes foi montado um multiplexador de soluções de  $5 \times 1$ . Conforme ao ilustrado na Fig.3.13 A operação de chaveamento entre as distintas amostras foi feita manualmente.

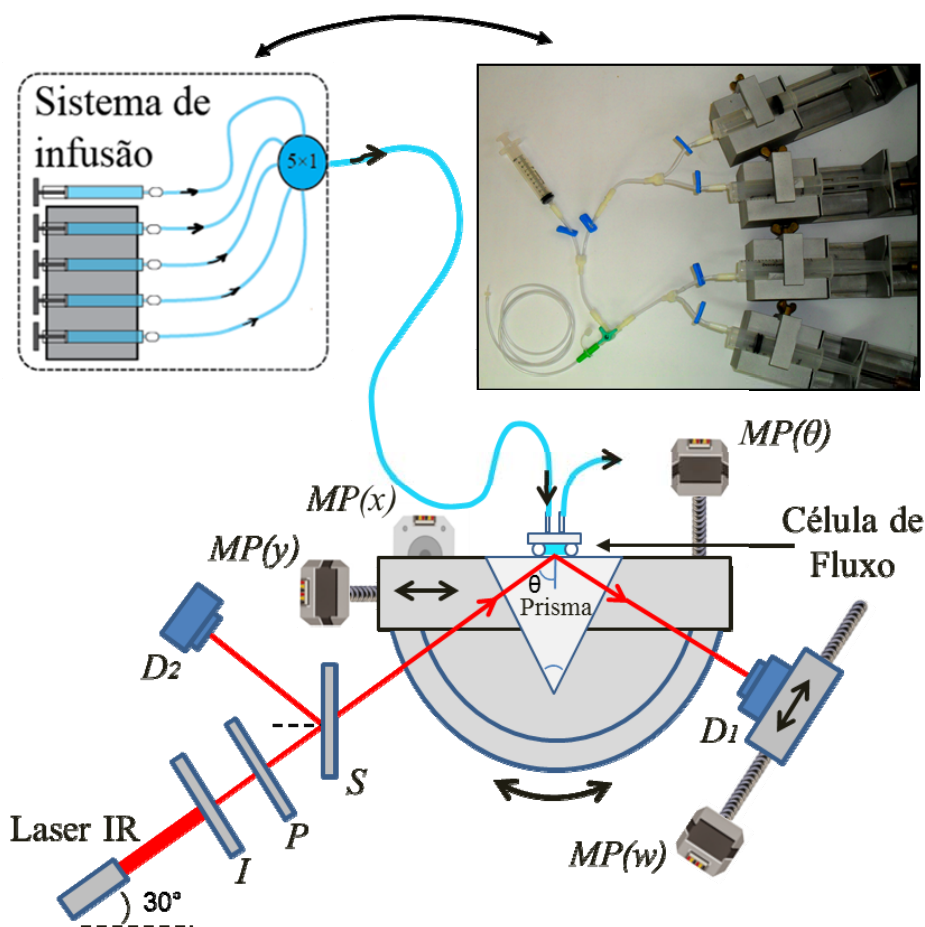


Fig.25 Diagrama esquemático do sistema hidráulico já integrado ao reflectômetro.

O sistema apresentado na Fig.3.13 é de fundamental importância na determinação da resposta sensora, rendimento e desempenho, já que permite definir variáveis importantes (velocidade de análise, reprodutibilidade e confiabilidade do sistema), e comparar diferentes sistemas ou técnicas de detecção.

Dependendo das necessidades de uma reação biomolecular, o sistema de infusão deve ter a capacidade de inserir com diferentes vasões cada uma das substâncias ou

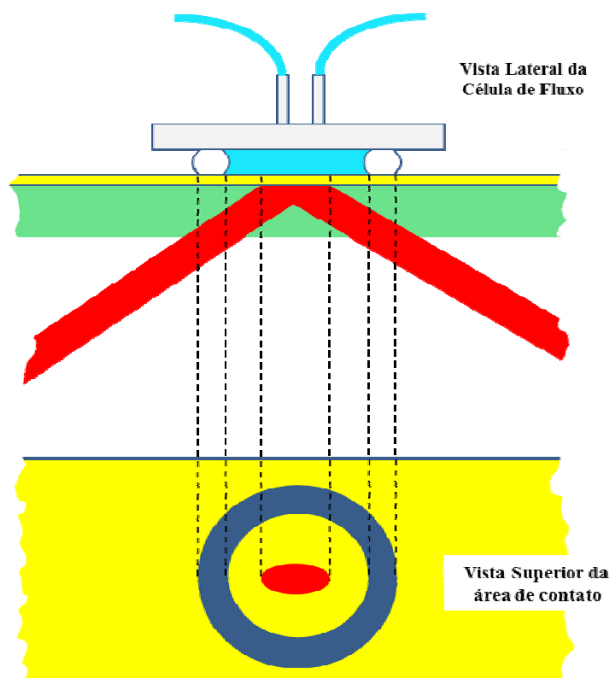
amostras involucradas, ao igual que cumprir com uma serie de requisitos básicos, os quais mencionam-se a continuação:

- É essencial que o analito não seja absorvido pelas paredes do sistema de fluxo, incluindo a superfície interna das mangueiras, por tanto, deve ser quimicamente resistente e inerte.
- A distância entre os contentores de amostras, válvulas e célula de infusão deve de ser o mais curto possível, evitando tanto a utilização de volumes maiores, como também a diluição entre amostras sucessivas pelo efeito de difusão.
- Espera-se que o módulo de infusão injete as amostras de maneira uniforme, mantendo constante a taxa de fluxo.
- É importante que o sistema não esquite as amostras, já que pode alterar as propriedades ópticas das mesmas.
- O desenho da célula de fluxo deve permitir que os agentes presentes na amostra entrem em contato direto com a superfície do transdutor (filme metálico ou camada polimérica), tendo claro que a taxa de fluxo não deve ser muito elevada, já que se o agente biomolecular contido na amostra é inserido com muita rapidez, ele não poderá interagir com as moléculas bioreceptoras que encontra-se imobilizadas na superfície. Para evitar fugas se espera que a borracha que fica entre a célula de infusão e a superfície transdutora faz uma boa união.
- Como a célula de fluxo finalmente tem que rotar, é necessário que as mangueiras tenham liberdade para que sucedan este tipo de movimentos.

#### ***3.3.4. Incidência do Feixe Laser na Célula de Fluxo***

Para conseguir espectros de refletância das amostras líquidas contidas na célula de infusão, é necessário que o feixe laser incida justamente na pequena área efetiva limitada a aproximadamente  $12.56 \text{ mm}^2$ , encerrada por o anel de borracha que impede a saída do

líquido da célula. A incidência do laser na célula de infusão é um procedimento que apresenta um grau de dificuldade, porque a área interna é relativamente pequena e o comprimento de onda do laser se localiza na faixa do infravermelho o qual impede sua visualização direta. A Fig.3.14 ilustra o anterior exposto com uma vista lateral e superior.



Ojo: cambiar lateral por frontal + nombrar as partes do gráfico + flechas al rayo laser  
 Fig.26 Calibração dos fotodetectores ou determinação da razão  $D1/D2$ .  
 OJO Aumentar tamanho do spot vermelho

Para alcançar a incidência do laser dentro da célula de fluxo, pode-se seguir os seguintes procedimentos:

1. Se o feixe laser atinge a face lateral, no ponto  $L/4$ , como se mostra na Fig.3.5, garante que a radiação incide no ponto de referência (M), então com ajuda do paquímetro se procura este ponto na face horizontal do prisma, posteriormente se posiciona a borracha, junto com a célula de fluxo nesse ponto.
2. Gira-se o prisma junto com um substrato sem filme de ouro até o ângulo onde o feixe que incide internamente na face superior não sofra reflexão total, conseguindo ser transmitido fora do prisma, posteriormente com ajuda de um cartão infravermelho localizar o ponto onde se deve posicionar a célula de fluxo. A Fig.3.15 mostra o procedimento explicado anteriormente.

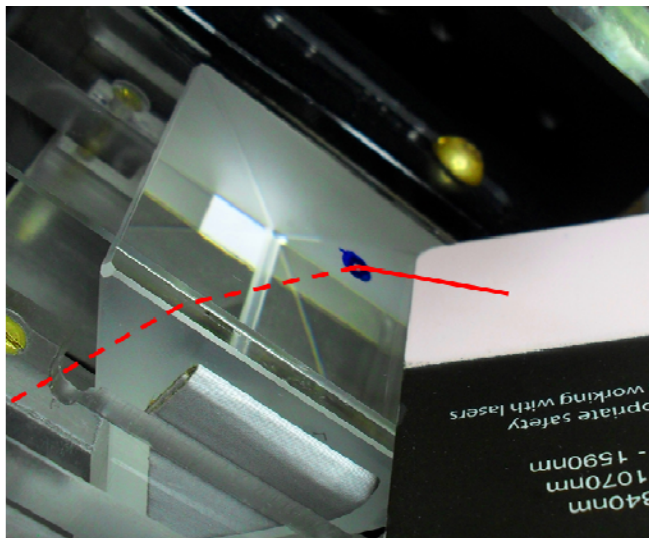
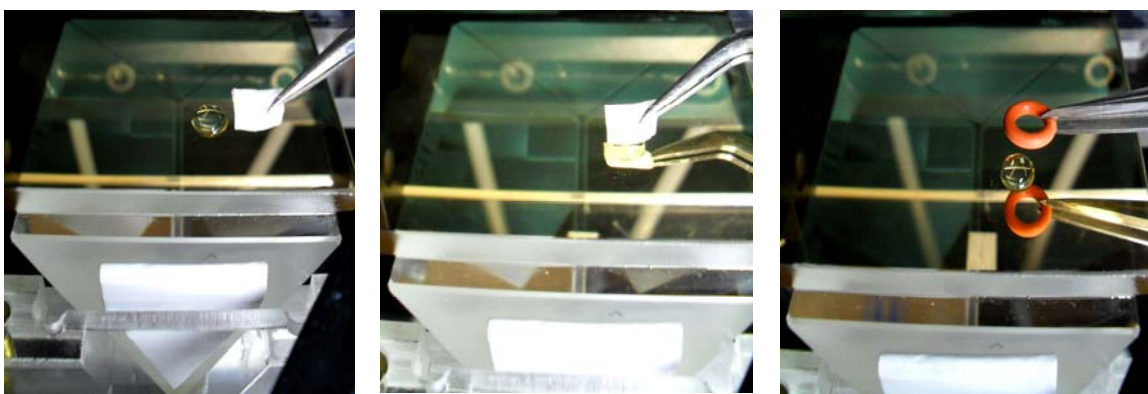


Fig.27 Método de localização o ponto certo, para o qual o laser atinge a área interna da célula de infusão.

3. Outra alternativa menos convencional pero que oferece uma rápida localização do ponto de referência ( $M$ ), consiste em situar uma gota de água com ajuda de um pincel próxima ao ponto de incidência do laser na face horizontal que corresponde à posição da célula de infusão. Quando a intensidade do sinal do fotodetector  $D_1$  alcança a mínima intensidade, é possível afirmar que esta é a posição do ponto ( $M$ ), tendo em conta que este procedimento é feito para a posição angular donde presenta-se o mínimo de refletância (ângulo de ressonância) para a água. Na Fig.3.16 mostra o procedimento explicado anteriormente.



(a)

(b)

(c)

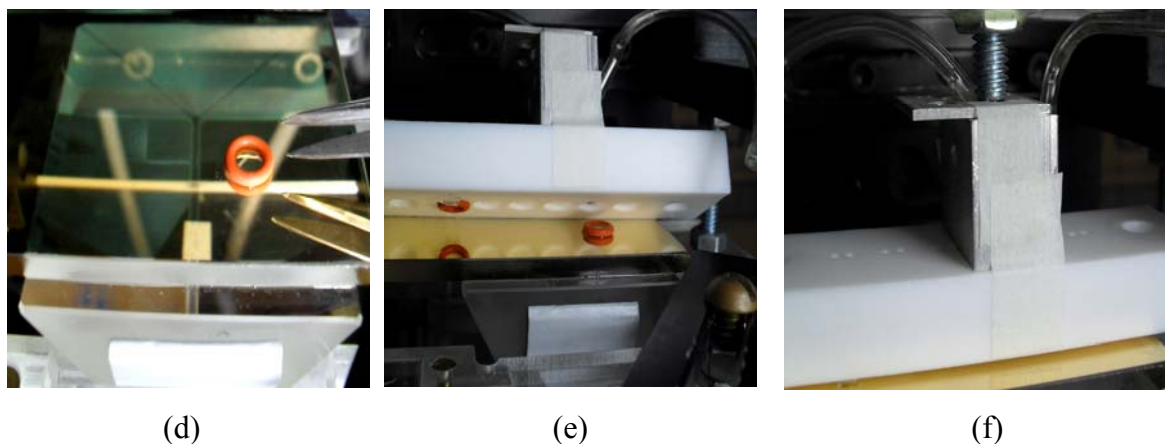


Fig.28 Fotografias que ilustram uma das formas de lograr que o laser atinja a área encerrada por a borracha (célula de infusão).

Na Fig.3.16 (a) dois gotas de água são depositadas sobre o filme, na posição próxima ao ponto de incidência do ponto de referencia (M); (b) ao mesmo tempo que é movimentada a gota de água sobre o filme metálico, também observa-se no osciloscópio a sinal do detector  $D_I$  (fotodetector de sinal), procurando um mínimo que indique que a gota esta na posição correta. Lembre-se que o mínimo acontece quando o prisma esta rotado no ângulo de ressonância; (c,d) já na posição correta é colocada a borracha sobre a gota de água; (e) com muito cuidado é colocada a célula de infusão, procurando não movimentar a borracha e (f) finalmente assegura-se a célula de infusão com o parafuso, com uma pressão muito baixa, só a suficiente para não ter fugas no circuito hidráulico.

É importante ressaltar que o ultimo procedimento mencionado, ainda não sendo um método convencional, resulta ser um processo eficaz, simples e de grande ajuda para conseguir que o ponto de incidência do laser na fase superior fique localizado dentro da célula de infusão.

### ***3.4. Filme Metálico como Superfície Sensora***

O procedimento para casar os índices de refração entre o prisma e o substrato, geralmente é levado a cabo com a adição de aceite mineral com índice de refração similar a qualquer dos meios que precisar ser casados, logrando desta maneira uma boa união, sem a retenção de bolhar de ar como um dos principais problemas na hora de unir opticamente



dois meios. Por um lado, uma das desvantagens radica em que a utilização deste óleo pode terminar por contaminar a filme metálico ou incluso a mesma amostra em estudo, por outro lado, trocar o substrato que há sido casado desta maneira, poderia tornasse dispendioso, já que implica desmontar e limpar rigorosamente com álcool as superfícies de contato, evitando deixar rastros de óleo antes de realizar esta operação novamente.

Com o objetivo de encontrar uma melhor forma de “casar” opticamente o prisma com o substrato, sem utilizar substâncias oleosas que implicam um procedimento dispendioso, foi substituído o óleo mineral por um filme de PVC

A estrutura do filme utilizada neste trabalho foi fabricada sobre substrato de vidro BK7 com 4 mm de espessura e índice de refração  $n = 1,643$ , para  $\lambda = 975,1\text{nm}$ , contendo bicamadas de Cr (3 nm) e Au (54 nm – 99,999% de pureza). A fina camada de Cr tem como objetivo facilitar a aderência do filme de ouro ao substrato. Os substratos foram fabricados no laboratório Ginzton da Universidade de Stanford (Stanford, Califórnia – EUA). A Fig.3.17 mostra em mais detalhe a estrutura composta do substrato de vidro de índice de refração  $n_p$ , coberto com o filme metálico de espessura  $d$  e índice de refração complexo (Anexo A).

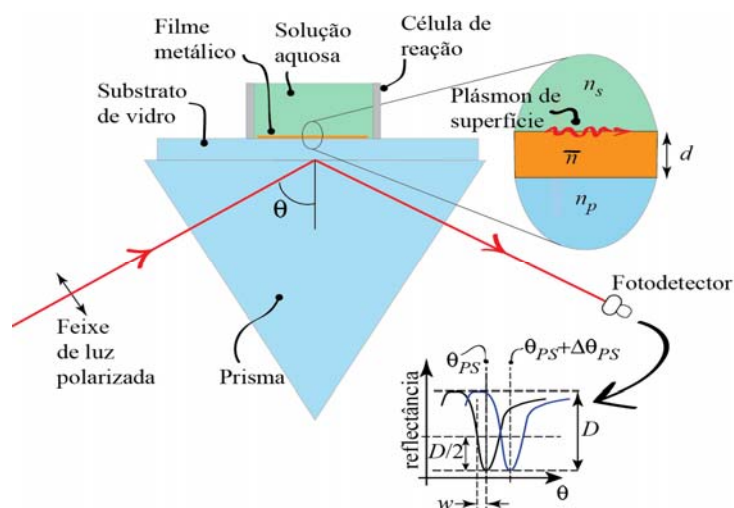


Fig.29 Configuração de Kretschmann para observação do efeito de RPS em interface metal-líquido.

### ***3.5. Amostras Salinas***

Neste trabalho foram utilizadas amostras salinas que foram preparadas tendo em conta certas precauções, como por exemplo, a utilização dos mesmos equipamentos para a realização das medições tanto de solvente como do soluto, isto com o objetivo de manter uma baixa propagação de erro na preparação das amostras, mantendo assim a uniformidade em estas ao longo da pesquisa.

A quantidade de soluto em cada solução foi pesada em uma balança semi-analítica (Marte AS1000) com uma incerteza de  $\pm 0.01$ g. Os volumes de água destilada foram medidos com o emprego de bquer de 20 ml com incerteza de  $\pm 1$  ml. Soluções aquosas com cinco valores distintos de índices de refração foram preparadas diluindo quantidades controladas de NaCl em água destilada. Se obtiverem amostras com um volume de 100 ml, e concentrações de NaCl de 0, 5, 10, 15 e 20 mg/ml.

Durante os experimentos, quatro seringas de 20 ml foram acondicionadas no sistema de infusão, uma das quais contendo sempre água pura, foi utilizada para lavagem do sistema entre as medições de amostras com diferentes concentrações de NaCl. A quinta amostra conectada ao multiplexor, permaneceu em uma seringa fora do sistema de infusão, aguardando tomar o lugar da primeira amostra inserida, tal como mostrou-se na Fig.3.13.

## ***4. Resultados e Discussão***

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos da caracterização do reflectômetro e do modulo de infusão separadamente, além da caracterização da integração do reflectômetro automatizado com o modulo de infusão de líquidos. Tendo realizada a caracterização são apresentados os resultados das medidas com amostras liquidas com o objetivo de mostrar os alçasses e deficiencias do sistema, que poderiam o definir as futuras aplicações, orientadas ao desenvolvimento de sensores biomoleculares.

## 4.1. Caracterização do Reflectômetro e Módulo de Infusão

### 4.1.1. Avaliação do Tempo de Aquisição no Reflectômetro

O sistema detecção, controle e processamento do refletômetro mostra que o processo de aquisição e visualização dos dados de reflectância em função do tempo, depende das propriedades do conversor analógico-digital e do software do computador. Foram realizadas curvas de reflectância em função do tempo para frequências de 1, 5 e 10 segundos de amostragem obtendo uma gráfica que relaciona tempo registrado em função do tempo real (Fig. 4.3).

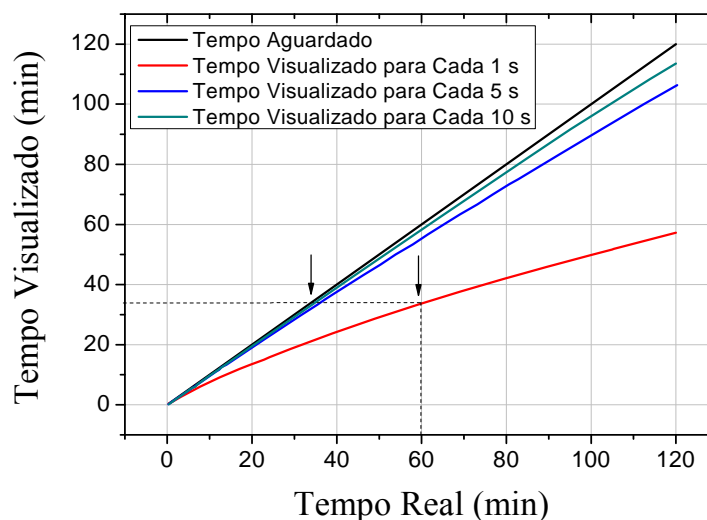


Fig.301 Tempo de registro de dados em função do tempo real.

Na figura 4.1 se observa que o tempo registrado para um evento não coincide com o tempo real em que o evento ocorre, para medidas de uma hora os registros realizados com frequências de amostragem de 5 e 10 segundos, o tempo registrado defasa-se em xx e xx minutos consecutivamente [Daniel pag67], valores aceitáveis para reações que acontecem lentamente ou para experimentos onde o comportamento da reflectância no tempo não representam uma prioridade. No entanto para uma medida de uma hora com uma frequência de amostragem de 1 segundo será registrado pelo sistema um tempo transcorrido de 35 minutos que mostra um grande desfase que ocasiona uma “compressão ou deformação” das curvas de reflectância em função do tempo, gerando um uma leitura errada da velocidade com que acontecem as associações e dissociações em uma reação biomolecular.

#### 4.1.2. Sensograma do Feixe S1

A fim de avaliar a influência do calor do motor de passo transferido ao mecanismo de movimentação do fotodetector  $D_I$ , foram realizadas três medidas da sinal S1 em períodos de 24 horas, para as medidas tomadas no primeiro e segundo período foi desligada a fonte de alimentação do motor de passo que movimenta  $D_I$ , no entanto as medidas realizadas no terceiro período foram feitas com a fonte de alimentação ligada. Foi obtida uma gráfica refletância em função do tempo para cada um dos períodos.

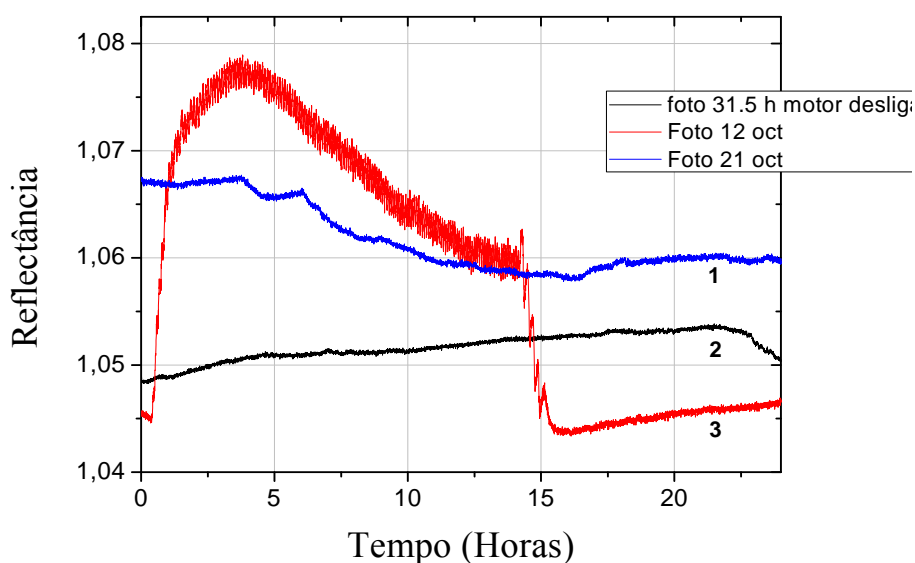


Fig.31 Refletância em função do tempo do feixe S1

Na Fig.4.2 é possível observar que as curvas 1 e 2 que foram registradas com a fonte dos motores de passo desligada, apresentam flutuações na refletância de 0,009 e 0,005 respectivamente, na curva 3 registrada com a fonte dos motores ligada foi obtida uma flutuação da refletância de 0,033, representando um aumento significativo em comparação com as curvas 1 e 2. O aumento e descenso da refletância na curva 3 é atribuído à movimentação do fotodetector  $D_I$  por parte do motor de passo  $M(W)$ , causada por a ligação ao início da medição e des-ligação depois de 15 horas. Este efeito gera que o motor transfira o calor ao parafuso que sofre uma dilatação térmica que finalmente movimenta a área sensora do fotodetector provocando o aumento da flutuação.

### 4.1.3. Filme de PVC como “Casador” de Índices de Refração

Foram realizadas três curvas de refletância para de diferentes configurações e igual meio dielétrico. A curva 1 foi feita para uma configuração SF2-ar, as curvas 2 e 3 foram feitas para SF2-BK7-Au-ar, utilizando meios “casadores” diferentes, no primeiro caso foi utilizado óleo mineral e no segundo um filme de PVC. A Fig.4.3 ilustra a comparação entre três curvas de refletância obtidas.

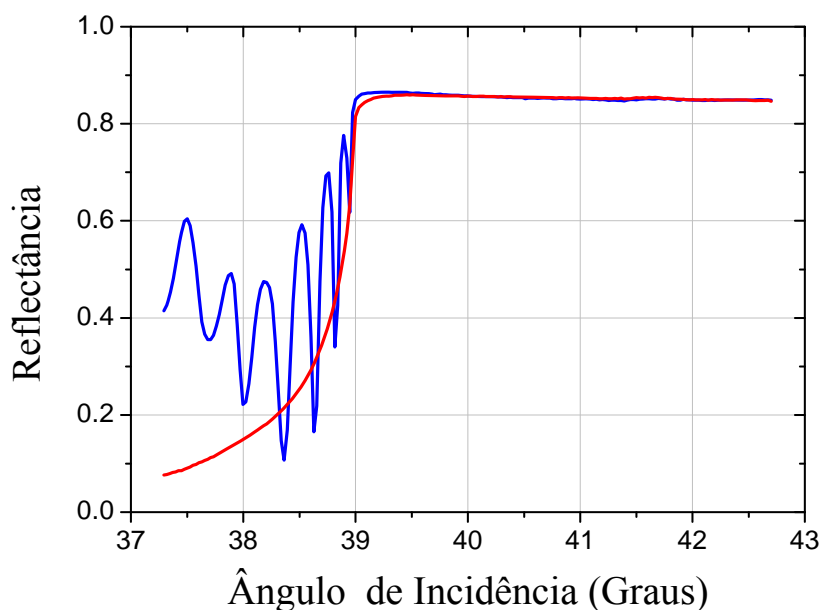


Fig.32 Espectro de refletância total (vermelho) e intento de RPS (azul), registrados para uma estrutura SF2-BK7-Cr-Au-ar. Falta curva RPS y numerarlas

Observa-se na figura 4.3 que na configuração SF2-ar se obtém um espectro de refletância, total, na configuração SF2-BK7-Au-ar utilizando óleo se obtém uma curva RPS, no entanto, na configuração SF2-BK7-Au-ar usando o filme de PVC foi obtida uma curva que mostra uma múltipla reflexão interna do feixe transmitido dentro do filme de PVC, que origina uma interferência dependente do ângulo de incidência. Em conclusão as curvas permitem dizer que o filme de PVC não permite o acoplamento dos indexes de refração do prisma e do substrato, ou seja não é possível obter a curva RPS.

### 4.1.4. Interferência Externa ao Reflectômetro

No caso do reflectômetro utilizado nesta pesquisa, além de sua estrutura convencional conta com um terceiro fotodetector denominado fotodetector CCD, o qual se encontra localizado na parte exterior e se utiliza para configurar o conversor analógico-digital. Apesar de que o fotodetector CCD não tem relação direta na aquisição das medições de refletância, a luz que incide em ele pode influir nos espectros de refletância obtidos pelo sistema. Na procura de uma melhor compreensão deste efeito e apresentada uma gráfica de refletância que foi obtida utilizando uma configuração óptica [SF2-BK7-Au- (água destilada a  $24^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ )] e um ângulo de rotação do prisma de 5,5 graus, que mostra uma marcada interferência na curva (Fig.4.9).

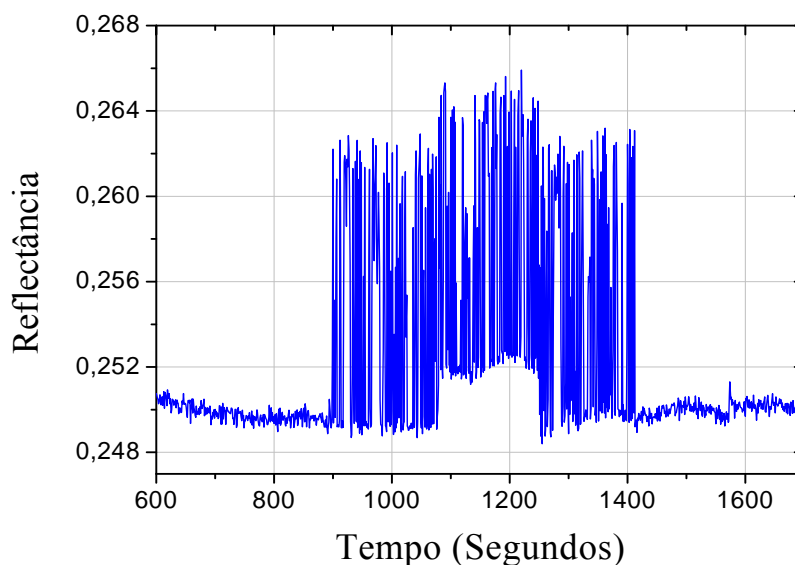


Fig.33 Interferência gerada pela incidência indireta de luz na CCD. Falta flechas indicando la interferência + indicar o delta de reflectância

Verificou-se que a interferência produzida pelo detector alcança níveis da ordem de 0,02, suficientes para “emascarar” pequenas variações no meio dielétrico, que poderiam corresponder a câmbios causados por uma determinada reação biomolecular tal como se observa na Fig.4.9.

Em trabalhos prévios realizados com reações biomoleculares [Daniel pag. 66] se encontro que uma camada de anti-IgG com o agente IgG pode formar uma segunda camada, que é representada por uma refletância  $\Delta R=0,04$ , comparando este valor com o valor da interferência observado no gráfico anterior pode-se dizer, que a interferência alcançaria a ocultar o 50% desta reação. Sendo notório a grande influência de esta

interferência nos espectros de refletância. Uma pequena interferência adicional está atribuída ao momento no que o reflectômetro se encontra descoberto.

#### ***4.1.5. Vasões Inseridas por o Módulo de Infusão***

O módulo de infusão tem um limite de operação, que depende tecnicamente da quantidade de passos necessária para que os motores girem uma volta. Foram determinados os valores das vasões mínimo e máximo com o qual o módulo pode operar para as seringas de 3, 5, 10 e 20 ml, seguidamente são apresentados os valores obtidos na tabela 1.

Tabela 1. Vasão máxima e mínima para os diferentes padrões seringa.

<i>Seringa</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>Vasão Mínima (<math>\mu\text{l}/\text{min}</math>)</i>	<i>Vasão Máxima (ml/min)</i>
<i>1</i>	<i>3</i>	<i>2,24</i>	<i>7,46</i>
<i>2</i>	<i>5</i>	<i>3,42</i>	<i>11,41</i>
<i>3</i>	<i>10</i>	<i>5,10</i>	<i>16,86</i>
<i>4</i>	<i>20</i>	<i>8,55</i>	<i>28,50</i>

Na tabela 1 se observa que o valor de vasão mínima possui uma faixa entre 2,24 e 8,55, e na vasão máxima os valores variam entre 7,46 e 28,50, sendo que as vasões aumentam progressivamente com relação ao volume da seringa.

A fim de comparar a vasão com o qual opera o sistema, com a vasão experimental, foram realizadas medidas de volume em função do tempo, inserindo um volume de 19 ml em 19 minutos de forma contínua. A Fig.4.4 apresenta o volume em função do tempo correspondente à caracterização do módulo de infusão na função de vasão de 1 ml/min (16,66  $\mu\text{l}/\text{min}$ ).

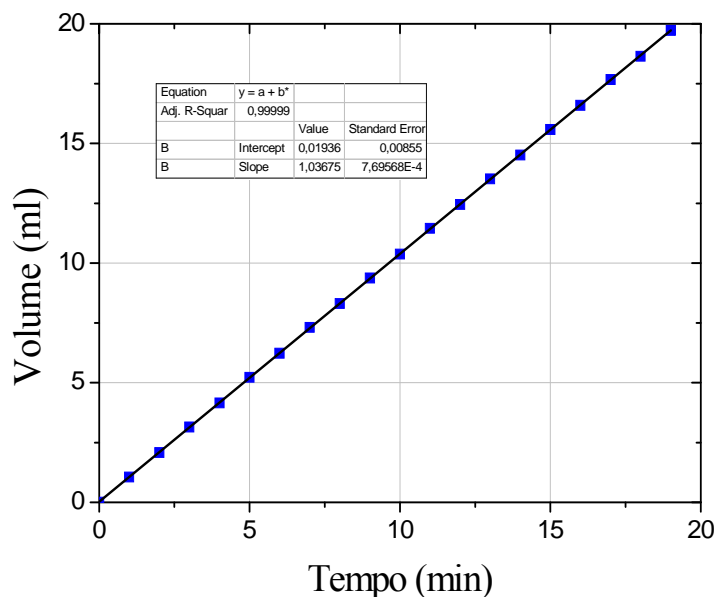


Fig. 34 Volume em função do tempo para um líquido inserido com uma seringa de 20 ml, marca Descarpak, na função de vazão 1ml/min.

De acordo com a Fig 4.4 pode-se observar que experimentalmente se obtém uma vazão de 1,037 ml/min (17,28  $\mu$ l/min) afastando-se 3,4% aproximadamente da vazão o qual o módulo pode operar. Dado que as dimensões das seringas podem variar de uma marca a outra, recomenda-se que as seringas sejam caracterizadas antes de cada experimento para dar certeza da vazão inserida no sistema.

#### ***4.1.6. Influência da temperatura da peça motorizada no Índice de Refracção***

A fim de avaliar a influência da temperatura na variação do índice de refração, foram registradas medidas da temperatura em função do tempo para o suporte e para uma amostra de água destilada contéuda na seringa que está acoplada ao suporte. As duas curvas obtidas são mostradas na Fig.4.5.



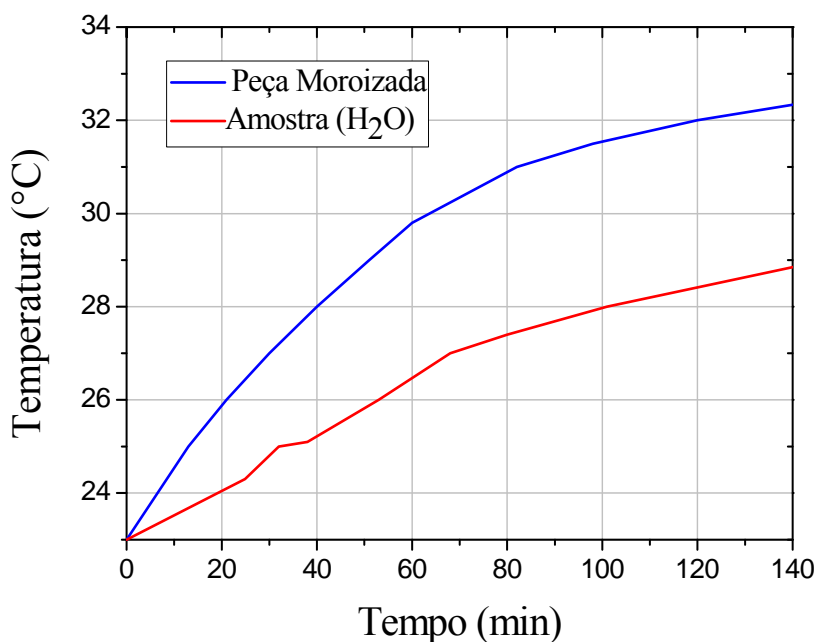


Fig.35 Incremento da temperatura em função do tempo de uma peça motorizada e de uma amostra inserida com uma vazão de 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . OJO CAMBIAR NOMBRE DE PIEZA MOTORIAZADA POR SOPORTE, jeringa com água, numerarlas

As curvas apresentadas na figura 4.5 mostram um comportamento não linear, destacando um aumento progressivo da temperatura com respeito ao tempo. Pode-se apreciar que ao longo de 120 minutos o aquecimento do suporte, transfere calor lentamente ao água contéuda na seringa, ocasionando que neste período de tempo a amostra eleve sua temperatura em 3,7  $^{\circ}\text{C}$  aproximadamente. Elevações na temperatura podem ocasionar uma alteração nas medidas de reflectância que permitem determinar o índice de refração. É importante ressaltar que o aumento da temperatura não será significativo se o calor é dissipado antes de entrar na célula de infusão, com o qual o índice de refração não sofrera câmbios apreciáveis.

Continuando com a análise da influência da temperatura foi determinada teoricamente a variação do índice de refração em função da temperatura, a partir da equação de Sellmeier, utilizando um comprimento de onda de 975,1 nm (Anexo IV). Com base nesta equação foi obtida uma gráfica que mostra o comportamento linear da variação do índice de refração em função da temperatura, tal como pode-se apreciar na Fig.4.6.

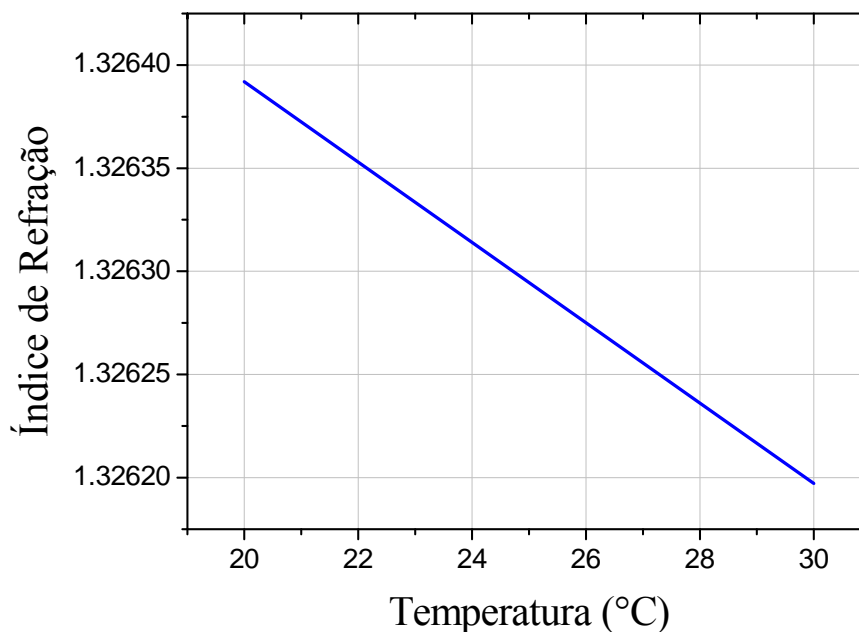


Fig. 36 Aproximação para  $\lambda=975,1$  nm o índice de refração da água como função da temperatura.

Para uma faixa de temperatura entre 20 e 30 °C se observa uma diminuição do índice de refração da água a medida que aumenta a temperatura. Foi obtida a pendente para a reta  $dn/dT=-1,95 \times 10^{-5}$ , o que significa que para uma variação de 3,7 °C, a amostra de água variara sua índice de refração em aproximadamente 0,0007.

## 4.2. Integração Reflectômetro Automatizado-Módulo de Infusão

### 4.2.1. Área de contato e Área iluminada

Deve-se enfatizar que existe uma distinção entre área de contato e área iluminada, a primeira corresponde a área encerrada pela célula de infusão e a segunda se refere à região atingida pelo feixe a qual depende do ângulo de incidência. A fim de encontrar o ponto exato para fazer incidir o feixe dentro da área encerrada pela célula de infusão, foi realizada uma medição de reflectância em função da posição. Os resultados experimentais de reflectância da área de contato entre a célula de infusão e o filme de ouro, são apresentados na Fig. 4.7.

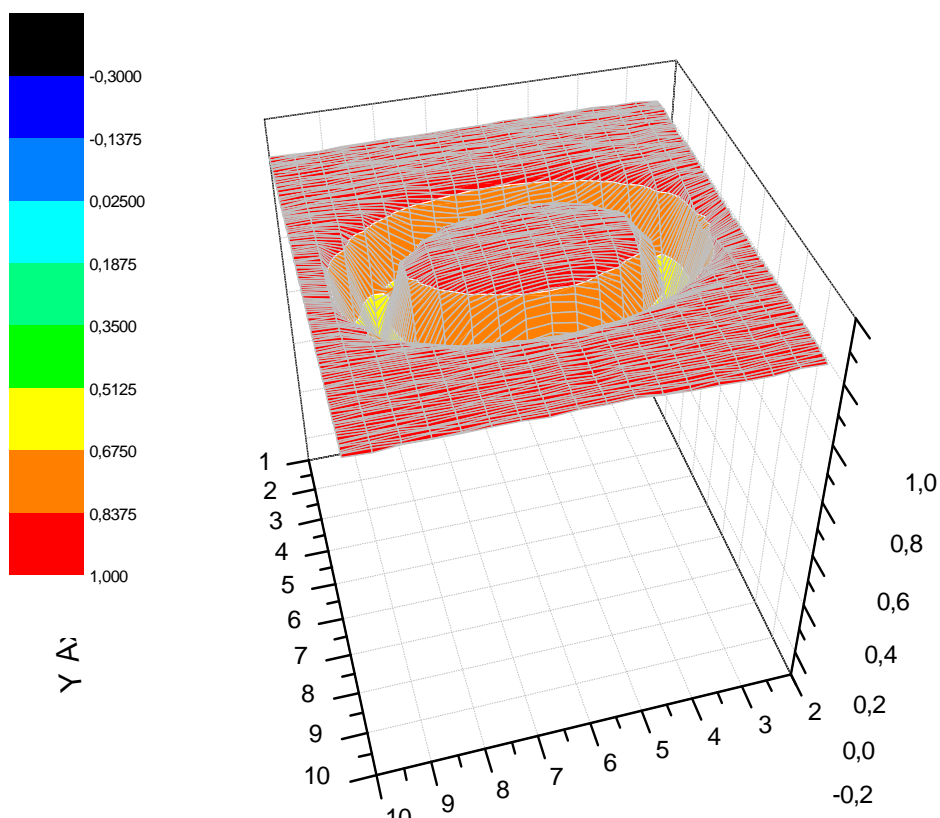


Fig.37 Reflectância em função da posição que mostra a área limitada por a borracha, para uma célula de infusão sem líquido.

Na Fig.4.7 se observa uma depressão circular que corresponde a o área de contato entre a borracha e o filme metálico, que permite ver com clareza a área encerrada pela célula de infusão, a qual estará em contato direto com a solução aquosa e cujo valor de refletância encontrasse na faixa de 0,8375 e 1, que corresponde a cor vermelho da escala apresentada na figura.

Com a ideia de possibilitar uma adequada visualização da área de contato da célula de infusão e o filme de ouro se mostra um corte transversal da curva de nível de refletância em função de posição, na Fig.4.8.

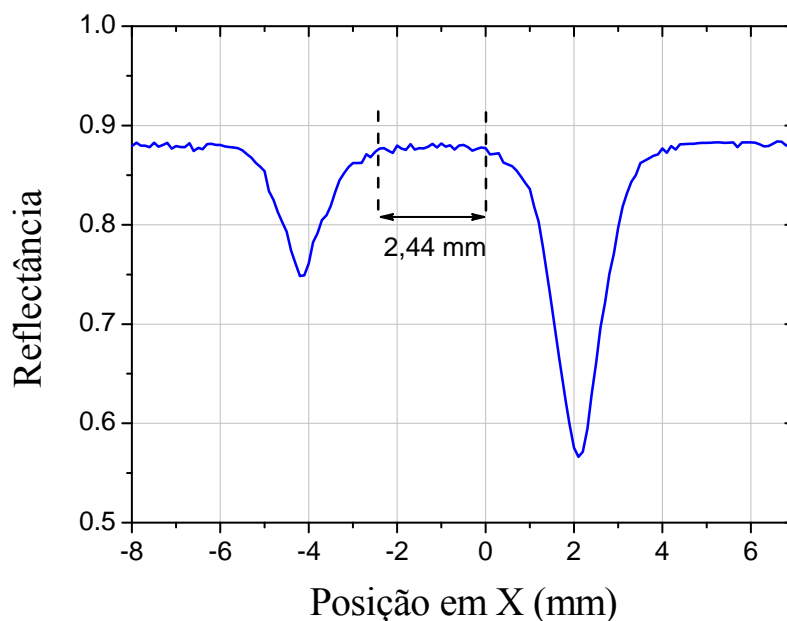


Fig.38 Reflectância em função da posição, para uma varredura feita por a metade da célula de infusão sem líquido.

Na Fig.4.8 nota-se que os dois valores mínimos apresentam diferentes refletâncias, causa atribuída ao fato que o parafuso que assegura a célula de infusão não exerce uma pressão uniforme sobre ela, influenciando as dimensões da área de contato. A partir da Fig.4.8 foi determinado o diâmetro da célula de infusão cujo valor foi de 2,44 mm, que permitiu calcular uma área de contato de aproximadamente  $4,66 \text{ mm}^2$ , área que corresponde a uma refletância meia de 0,88. Considerando que para um laser de 1 mm de diâmetro que incide na superfície do filme metálico com um ângulo de 60 graus a área iluminada pelo feixe corresponde a uma área aproximada de  $1,6 \text{ mm}^2$ , e possível afirmar que este feixe pode ser alojado dentro da célula de infusão, sem atingir a região de baixa refletância.

#### 4.2.2. Curvas de Calibração

A curva de calibração do refletômetro integrado foi realizada para um fluxo em estado de repouso. Foram graficados os valores de deslocamentos angulares  $\Delta\theta$  em função das concentrações salinas para uma faixa menor a 10 mg/ml. A curva obtida e apresentada na Fig. 4.10.

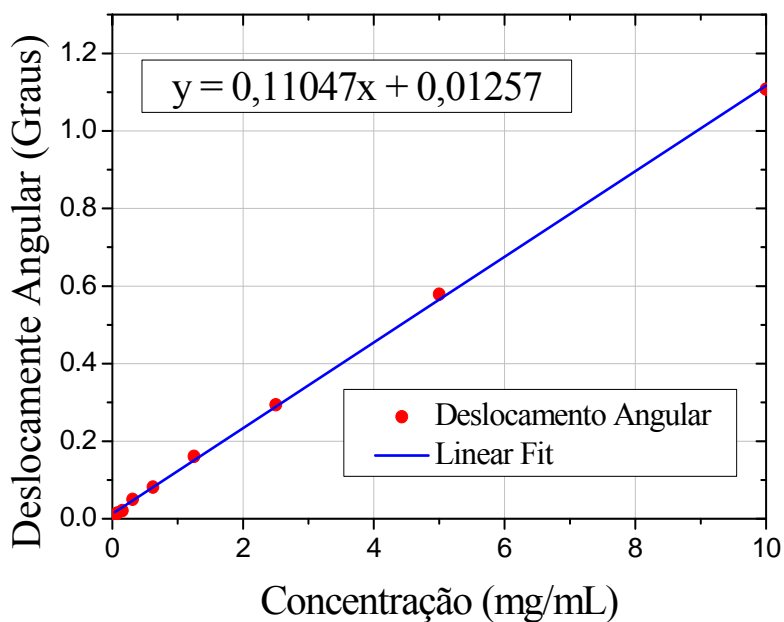


Fig.39 Curva de calibração que mostra o comportamento linear do sensor ante a presença de concentrações salinas diluídas progressivamente por dois.

Observa-se que para concentrações salinas embaixo de 10mg/ml o reflectómetro na configuração SF2-BK7-Au-(Concentração salina) responde linearmente com uma pendente  $d\theta_{ps}/dC = 0,11$  graus/mg de NaCl, a qual permite calcular concentrações salinas a partir do deslocamento do ângulo de ressonância.

A Fig.4.11 mostra a resposta do reflectómetro para as concentrações entre 0,00 e 0,04 mg/ml as quais não podem ser apreciadas com detalhe na Fig.4.10.

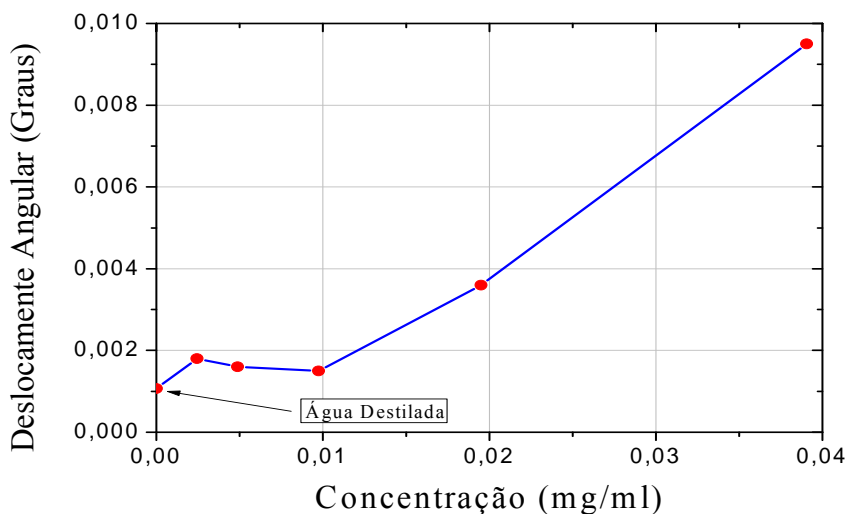


Fig.40 Curva de calibração para concentrações embaixo de 0,4mg/ml.

Na Fig.4.11 é possível observar que para concentrações embaixo de 0,02 mg/ml a curva afasta-se da linearidade, mostrando que este comportamento é coerente com a resolução angular do reflectômetro que só alcança 0,005 graus (80 $\mu$ rad).

### ***4.3. Medidas Realizadas com o Sistema Integrado***

Neste apartado apresentam-se vários testes que foram realizados para avaliar a capacidade de medição e de controle de fluxo de substâncias líquidas pelo sistema integrado. Em geral os resultados mostram que tanto para fluxos em regime contínuo como estático, é possível determinar o índice de refração de soluções aquosas a partir dos espectros de reflectância total e RPS. Nesses experimentos a temperatura das amostras foi mantida em 24 °C  $\pm$  1 °C.

#### ***4.3.1. Determinação do Índice de Refração a partir do Ângulo Crítico***

Com base no arranjo apresentado no apartado (3.13), foi possível realizar um experimento preliminar para determinar as propriedades ópticas da solução a partir da medição de reflectância do prisma sem filme metálico. Essa medida foi realizada em regime estático para amostras salinas com concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg de NaCl / ml. A Fig.4.12 mostra as curvas de reflectância para cada uma das amostras salinas onde observa-se os pontos de maior declividade que corresponde com o valor do ângulo crítico.

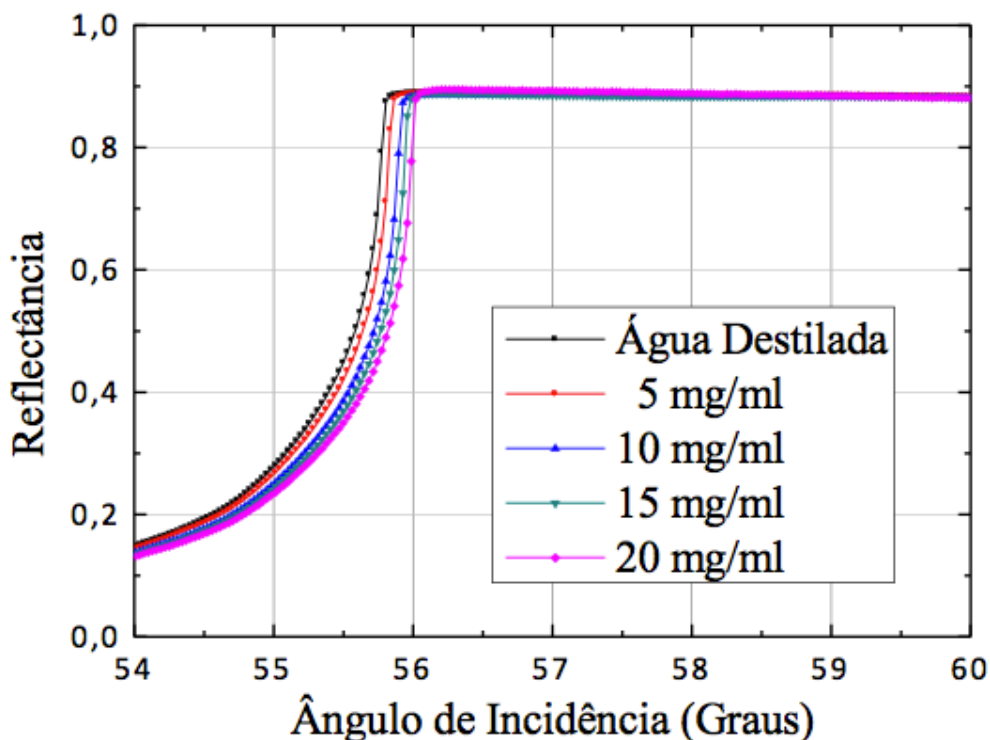


Fig.41 Reflectância do prisma como função da concentração de NaCl.

Na Fig.4.12 pode-se apreciar uma pequena alteração na condição de reflexão interna total como função da concentração da amostra contida na célula de infusão. Da curva de reflectância total para o água é possível extrair o valor experimental do ângulo crítico, que corresponde a 55,835 graus. Conhecendo que o índice de refração do prisma de vidro SF2 é de 1,634 para um comprimento de onda de 975,1 nm, é conforme à equação xx do anexo I, foi determinado o valor do índice de refração da água  $n_s = 1,348$ , valor que difere apenas em 1% do valor tabulado na literatura [11 Artigo].

#### 4.3.2. Análises das Curvas RPS e Sensogramas Realizados com o Sistema Integrado

A fim de avaliar a resposta do reflectômetro integrado foram registrados espectros de reflectância para água destilada e quatro amostras salinas com concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg/ml. A Fig.4.13 mostra as cinco curvas de RPS em filme de ouro medidas no sistema como função da concentração de NaCl, realizadas em regime estático.

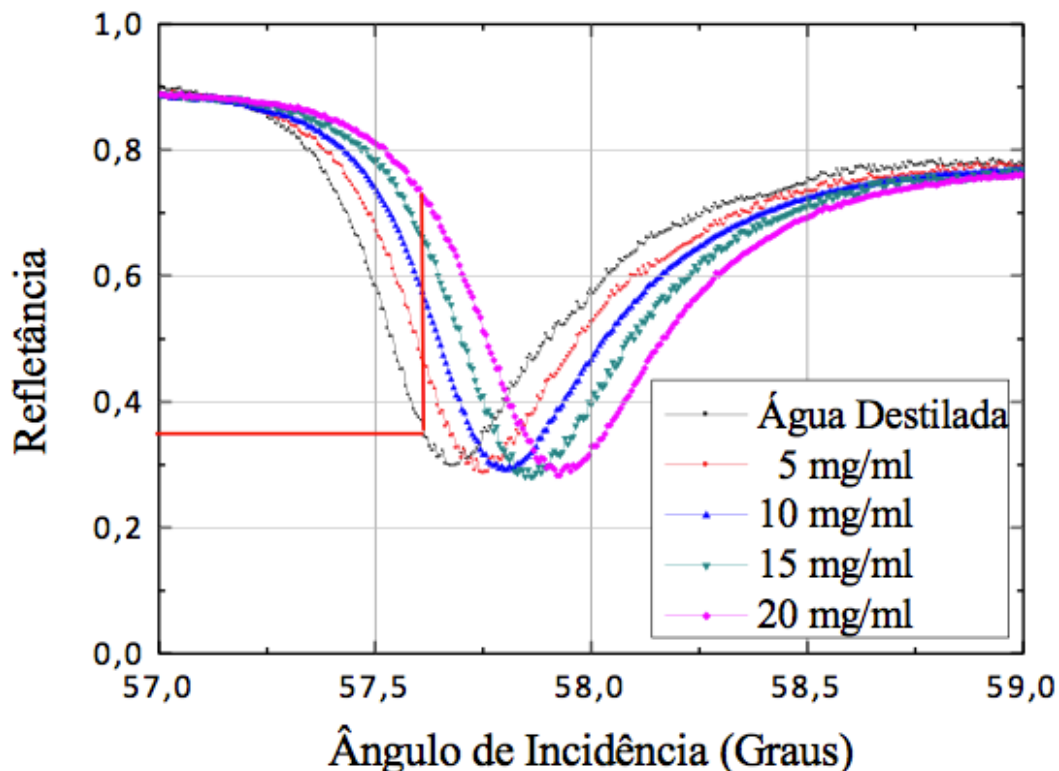


Fig.42 Curvas RPS para diferentes concentrações salinas.

Na Fig.4.13 pode-se observar que a medida que aumenta a concentração de sal apresenta-se também um aumento progressivo no mínimo da curva RPS, que corresponde com o ângulo de ressonância  $\theta_{PS}$ . Três características relevantes podem ser extraídas da curva RPS, as quais são o ângulo de ressonância, a meia largura e a faixa dinâmica que para o caso da água destilada foram respectivamente,  $\theta_{PS}=57,6826$  graus,  $w = 0,196$  graus e  $D = 0,6$ . Substituindo estes valores na equação xx (Anexo I) se obtém o fator de qualidade  $Q_{PS} = 139$ , valor que é aproximadamente 1/3 daquele previsto teoricamente. Essa diferença entre os valores pode ser o resultado do fato de a espessura do filme não estar otimizada para máximo fator de qualidade [9 artigo]

Foi realizado um experimento com amostras líquidas com concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 mg/ml, que foram injetadas através da célula de infusão a uma taxa de 1ml/min por cinco minutos cada, com o objetivo de analisar a variação temporal da refletância e a influência da lavagem no espectro de refletância. Nesse experimento foi utilizado um prisma em uma posição angular fixa, com o ângulo de incidência interno  $\theta = 57,6$  graus. O gráfico obtido é apresentado na Fig.4.14.



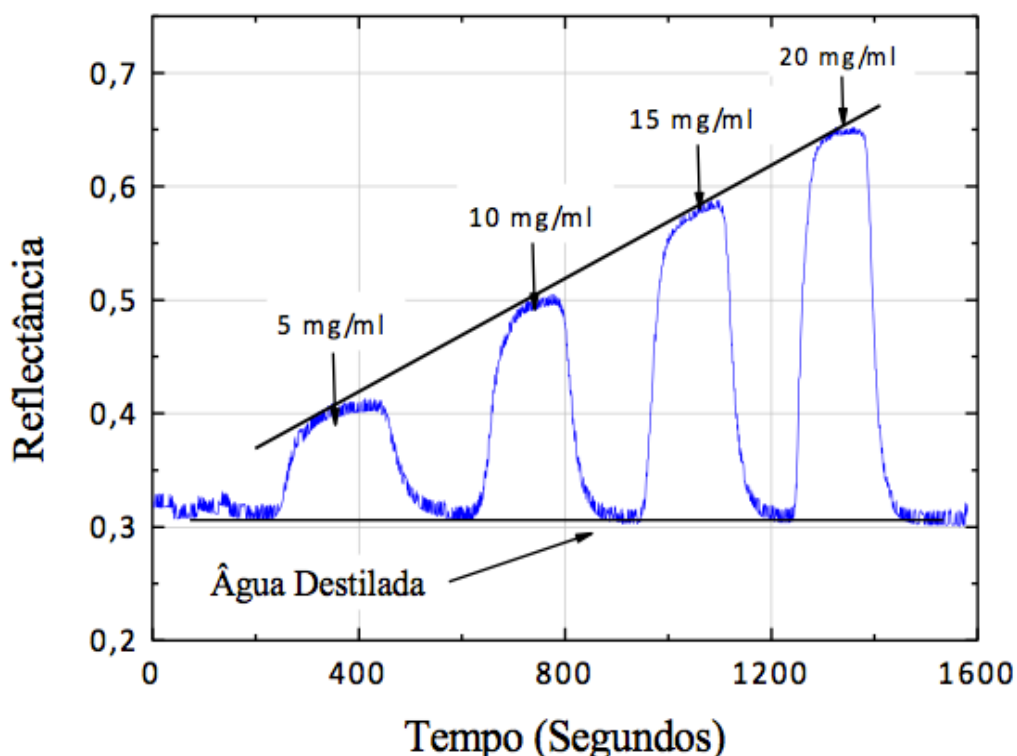


Fig.43 Dependência temporal do sinal de reflectância.

Na Fig.4.14 obtém-se para as concentrações em estudo uma relação linear entre o sinal e a concentração de NaCl. Usando o fator de qualidade  $Q_{PS}=139$  (Anexo I), a variação da refletância observada para a amostra de 20 mg/ml cujo valor foi de 0,35 e utilizando a equação xx (Anexo I) foi possível obter a variação relativa do índice de refração da amostra  $\Delta n_s / n_s = 0,0025$ . Essa variação está de acordo com o valor tabulado na literatura que é de 0,0027 [11 artigo]. Pode-se observar também na figura que depois de inserir cada uma das amostras salinas e realizar o processo de lavagem a sinal de reflectancia retorna à linha base, que corresponde com a reflectancia da água (concentração 0 mg/ml).

Com o objetivo de conhecer tanto a resposta do sensor RPS como a sensibilidade, utilizando a informação apresentada nas figuras 4.12 - 4.14, foi realizado um gráfico que mostra o deslocamento angular  $\Delta\theta_{PS}$  em função do índice de refração, Na Fig. 4.15 apresenta o deslocamento angular  $\Delta\theta_{PS}$  em função do índice de refração.

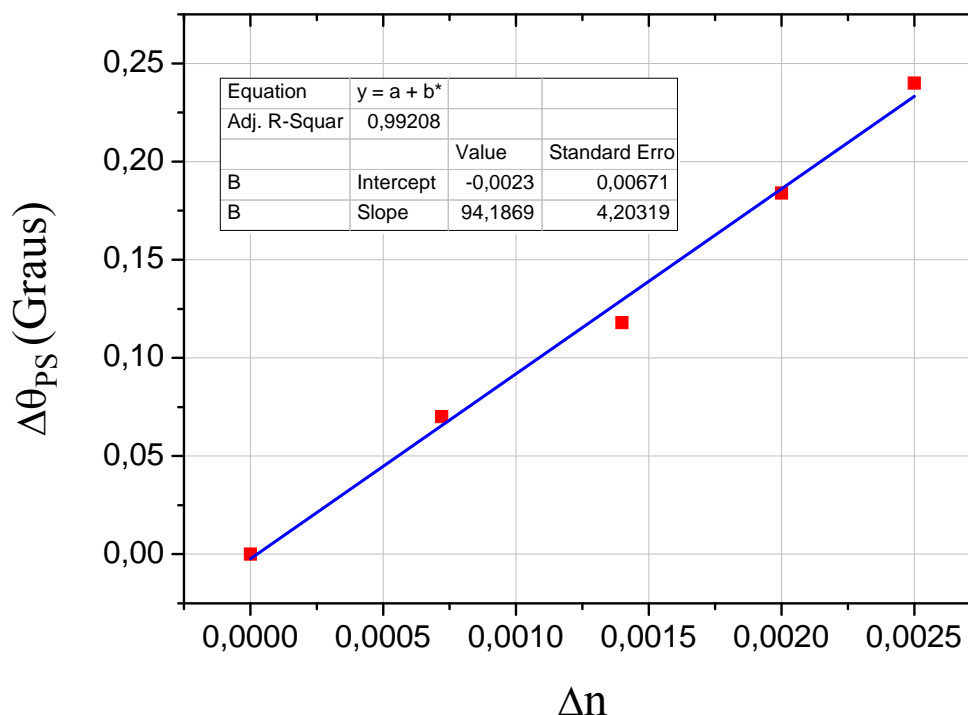


Fig.44 Variação do ângulo de ressonância  $\Delta\theta_{PS}$  em função das variações no índice de refração  $\Delta n$ , para diferentes concentrações salinas.

Na Fig.4.15 observa-se que os valores do índice de refração para o rango de concentrações de 0 até 20 mg/ml incrementam-se linearmente com respeito às variações do ângulo de ressonância  $\Delta\theta_{PS}$ . Considerando que a pendente da gráfica  $\Delta\theta_{PS}/\Delta n = 94$  e que as medições foram registradas com o reflectômetro na resolução de  $0.05^\circ$ , é possível determinar a partir da equação xx um valor de sensibilidade para o índice de refração do sensor de  $S=5.3 \times 10^{-4}$ . (Ojo pensar si se modifica por resposta sensora)

O valor do índice de refração pode ser também determinado em função da concentração de NaCl em soluções aquosas, como se apresenta na Fig.4.16

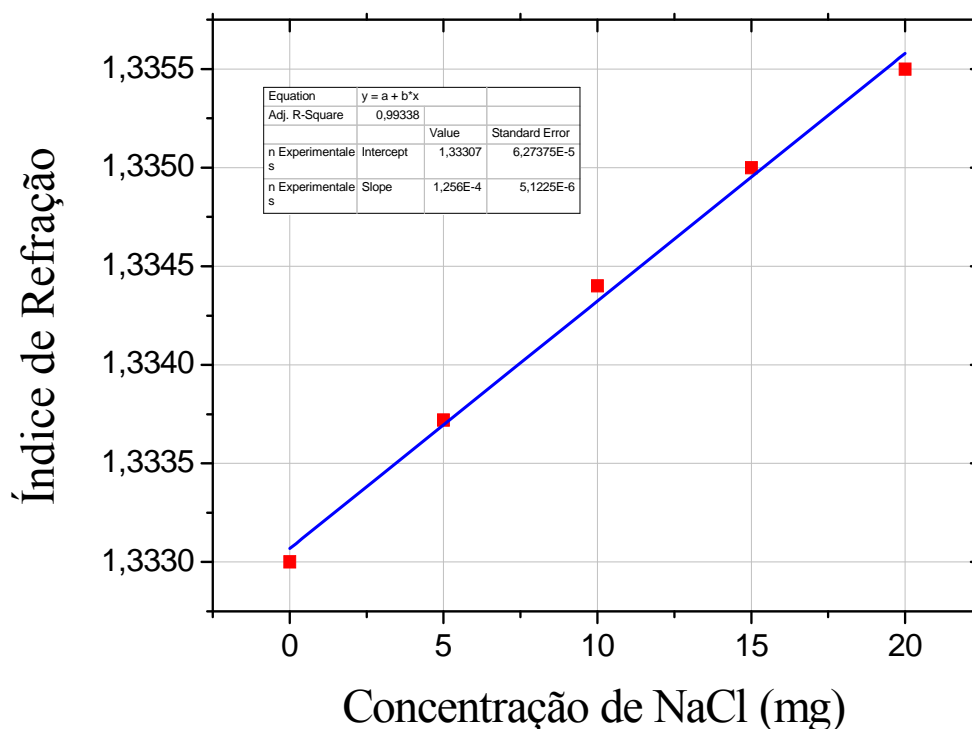


Fig.45 Índice de refração em função da concentração de NaCl.

Na Fig.4.16 Observa-se que o valor do índice de refração incrementa-se linearmente com a concentração de NaCl, obtivendo uma reta com pendente de  $1,25 \times 10^{-4}$  ml/mg. Realizando a razão entre o valor da sensibilidade para o índice de refração e o valor da pendente da reta da figura 4.16, foi possível calcular para com ângulo variável, a máxima sensibilidade de detecção da variação em concentrações salinas, obtendo um valor de 4,24 mg/ml.

Outra correlação que pode ser estabelecida para a mesma faixa de concentrações do experimento anterior, e a refletância em função do índice de refração como e apresentado na Fig. 4.17. Observa-se que neste ajuste as medidas experimentais coincidem com a reta linear, obtendo-se uma pendente com um valor aproximado de 140, que permite calcular o índice de refração a partir da refletância ou reciprocamente calcular a refletância a partir da refração.

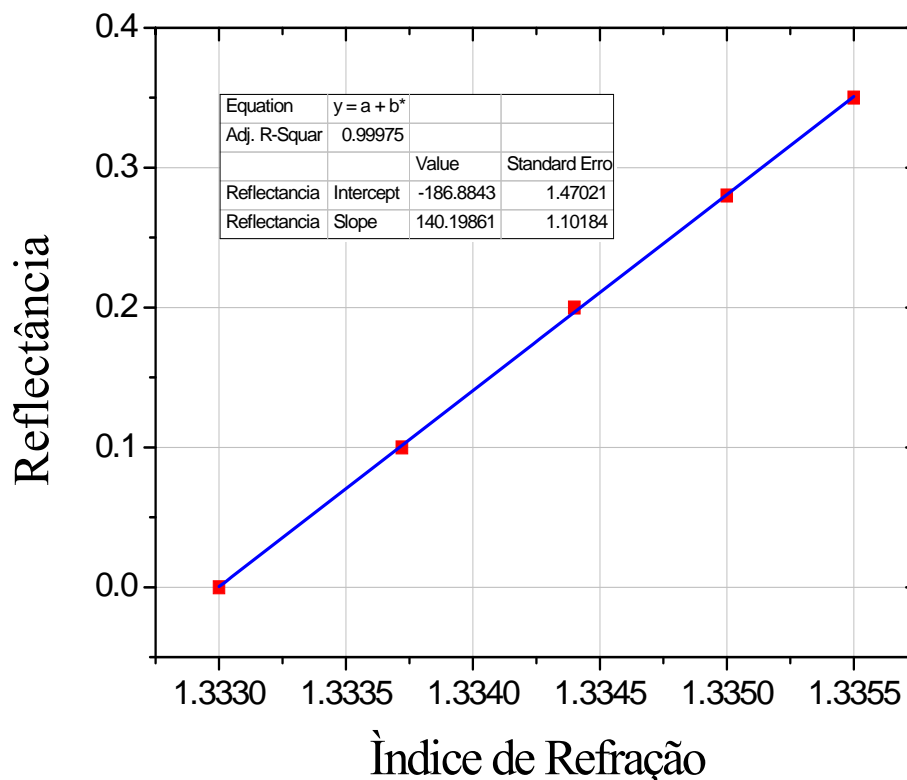
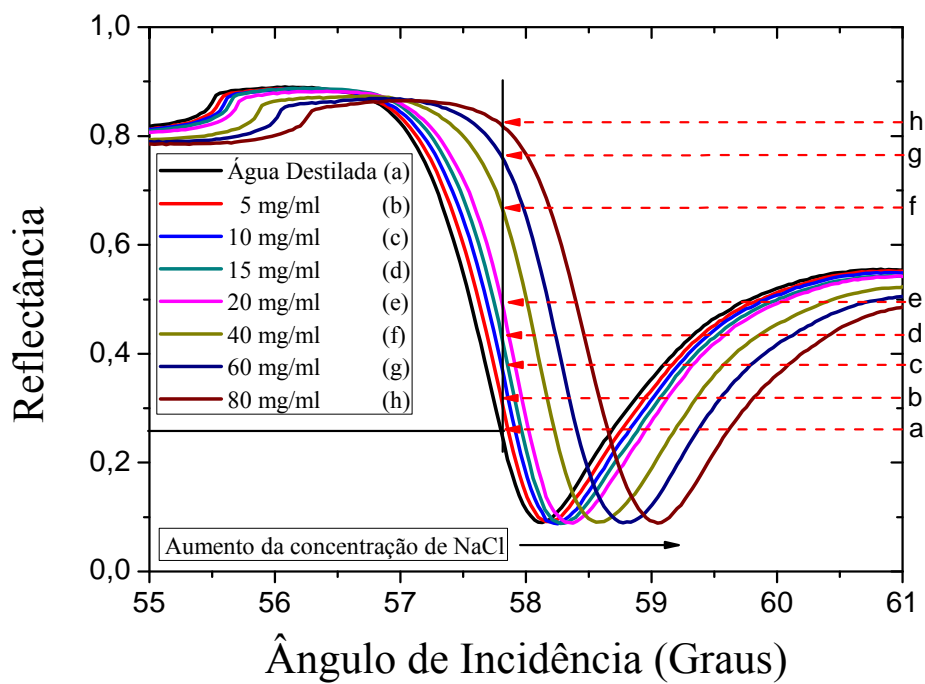


Fig.46 Reflectância em função do índice de refração das concentrações salinas.

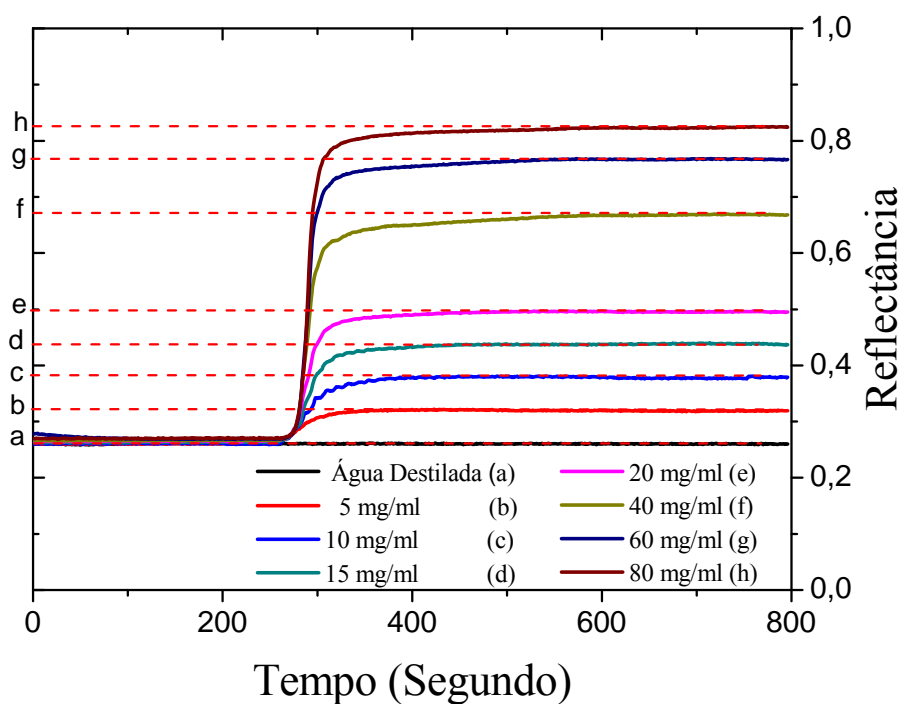
#### 4.3.3. Resposta do Sensor RPS ante Fluxos Dinâmicos

Com o propósito de permitir um melhor entendimento da resposta do reflectômetro integrado em regime dinâmico, foram realizados sensogramas e curvas RPS para diferentes concentrações.

Foram realizadas curvas RPS para amostras em regime estático a uma temperatura média de 24 °C, com concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 40, 60 e 80 mg/ml, as quais foram registradas utilizando um filme de ouro de xx nm e pureza xxxx %. Para este mesmo conjunto de amostras foram feitos sensogramas utilizando um ângulo fixo com um feixe incidente de 57,81 graus e uma taxa de amostragem de um segundo. A seguir são apresentadas as curvas RPS e os sensogramas obtidos nas Fig.4.18 (a) e Fig.4.18 (b) respectivamente.



(a)



(b)

Fig. 47 (a) Curvas RPS para diferentes concentrações; (b) Reflectância em função do tempo para ângulo fixo.

Na Fig.4.18 (a) pode-se observar, como as curvas RPS são deslocadas para ângulos maiores a medida que aumenta a concentração da amostra, com deslocamento angular meio para as primeiras cinco amostras de 0,6 graus por cada 5 mg/ml, e de 0,24 graus por cada 20 mg/ml, para as três amostras restantes. Nesta mesma gráfica foi plotada uma reta vertical próxima ao ângulo donde se apresenta a maior declividade (57,81 graus) para as 5 primeiras amostras (a-e). Com referência a esta reta pode-se apreciar para as cinco concentrações mais baixas que os cruzamentos entre as curvas RPS e a reta apresentam espaçamentos similares. Caso contrário a comportamento das três amostras restantes (f-h) nas quais os espaçamentos são diferentes. Na Fig.4.18 (b) apresenta-se os sensogramas que mostram a variação de reflectância para cada uma das amostras estudadas na Fig.4.18 (a), é possível observar que para as amostras que se localizam na região linear (a-e) a variação da refletância manteve-se em um valor próximo de 0,06, no entanto para as amostras que se encontram fora de região linear e que apresentam concentrações mais altas (f-h), observa-se variações na refletância diferentes. Estas observações nos permitem concluir que para concentrações abaixo de 20 mg/ml, a resposta do sensor apresenta um comportamento lineal.

Com o propósito de limpar o circuito hidráulico foi inserida água, depois de realizar a mediação de cada amostra salina, os dados do sinal de refletância obtidos após o lavagem foram sobrepostas e ampliadas A Fig.4.19, mostra uma ampliação da parte inicial dos sensogramas da Fig.4.18 (b).

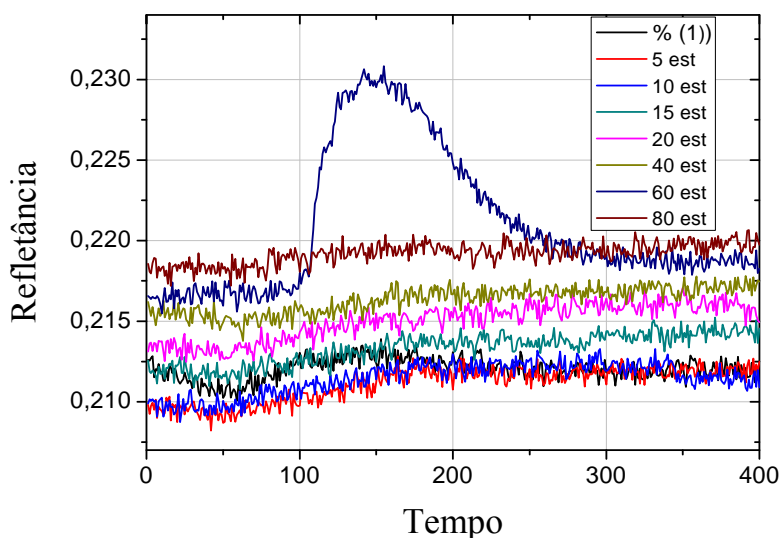


Fig.48 Refletância do prisma como função da concentração de NaCl.

Ao realizar uma comparação entre as curvas do sensograma da Fig.4.19, é possível observar um aumento progressivo no sinal de refletância que possivelmente pode ser causado pelos resíduos de NaCl que ficam dentro do circuito hidráulico após da medição, e que não são sacados pôr o processo lavagem, outra provável causa de este aumento e a adsorção da solução salina por os elementos do circuito.

Por último a Fig.4.20 apresenta para as concentrações anteriormente descritas uma comparação entre as curvas RPS registradas tanto para amostras em regime estático como em regime dinâmico (amostras inseridas com uma taxa 1 ml/min).

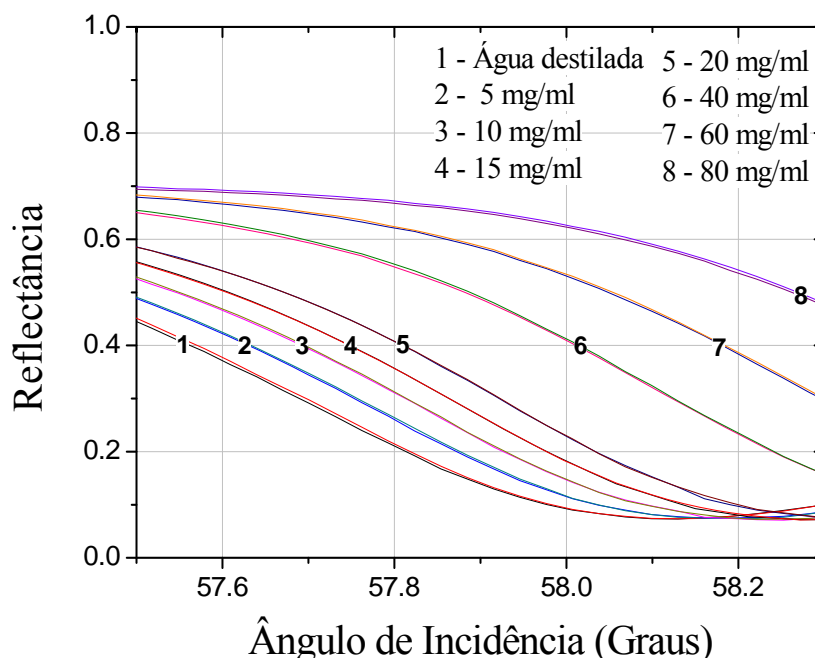


Fig.49 Curvas RPS para diferentes concentrações em fluxo estático e dinâmico.

Na Fig.4.20 se observa que as curvas RPS obtidas para uma mesma amostra que foram registradas em regime estático ou regime dinâmico aparecem sobrepostas, não sendo possível perceber um deslocamento que permita distinguir uma de outra, sugerindo que para as condições deste experimento no existe um efeito significativa do fato de realizar experimentos em regime estático o dinâmico.

#### 4.4. Efeito da Temperatura na Reflectância

A temperatura da amostra contéda na célula de infusão pode sofrer variações as quais podem ser causadas por flutuações da temperatura no laboratório o da amostra mesma que esta sendo inserida no momento. As variações térmicas que afetam as soluções aquosas modificam o índice de refração da amostra, estas variações são detectadas pôr o sensor RPS e finalmente mostradas em uma curva de refletância em função do tempo.

Com o propósito de acrescentar a caracterização do reflectômetro integrado no estudo das variações térmicas nas amostras, foi necessário inicialmente determinar a relação que existe entre a refletância e a temperatura. Com ajuda do gráfico de variação do índice de refração em função da temperatura utilizando uma temperatura entre 20 e 30 °C, que corresponde a uma faixa de 10 °C (Fig.4.7) e a refletância em função do índice de refração (Fig.4.17) foi possível determinar a relação refletância em função da temperatura que se mostra na Fig.4.21

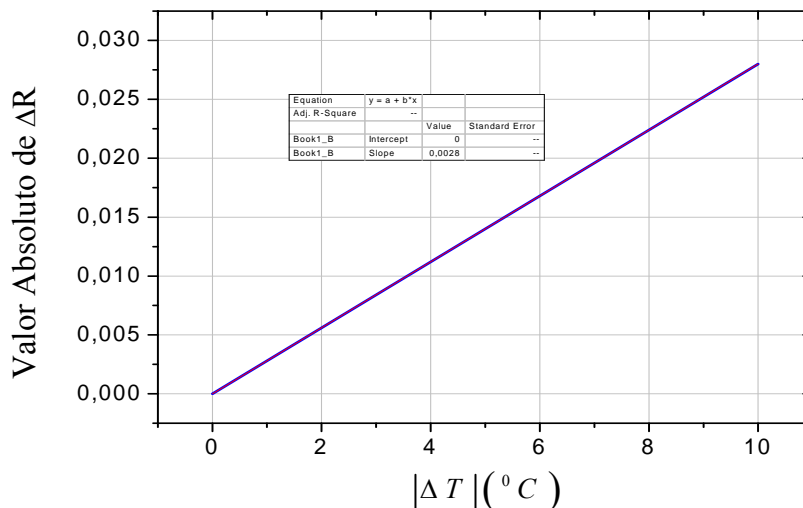


Fig.50 Reflectância em função da temperatura para uma amostra com  $20 < T < 30$  °C e para uma configuração SF2-BK7-Au-(água destilada a 24 °C).

Na Fig.4.21 observa-se que para a faixa de temperaturas entre 0 e 10 °C, o reflectômetro na configuração SF2-BK7-Au-(agua destilada), responde linearmente com uma pendente  $dR/dT = 0,0028$ , a qual permite determinar que para uma amostra de agua destilada que varia sua temperatura em 1 °C, o sistema responde com variações no índice de refração de aproximadamente 0,0028.



Posteriormente foi planejado um experimento com o objetivo de observar como varia a refletância em função da temperatura. Tomando em conta que o desenho da célula não permite o posicionamento de um termômetro dentro de ela, se optou por realizar esta medição na seringa antes de inserir a amostra. No experimento foram inseridas de maneira sucessiva duas amostras de água com uma taxa de 30 ml/ min e com temperaturas medidas de  $15 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  aproximadamente. O sensograma obtido é apresentado na Fig.4.22.

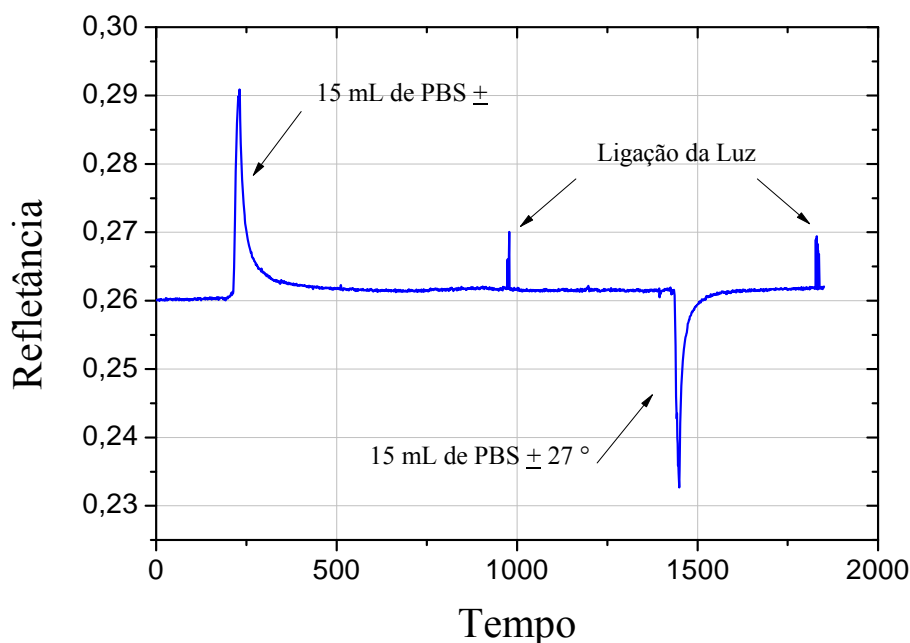


Fig.51 reflectância em função do tempo para uma amostra de PBS.

O sensograma da Fig.4.22 mostra duas variações significativas no sinal de refletância, que correspondem com a detecção da variação do índice de refração gerado por as variações na temperatura da amostra alojada dentro da célula de infusão. É possível apreciar um aumento (a) e um descenso (b) na refletância de aproximadamente 0,03, em ambos casos que correspondem respectivamente com as temperaturas de 15 e 36 °C da água inserida dentro da célula de infusão.

Uma maneira de determinar a temperatura da amostra dentro da célula de infusão e utilizando a relação de refletância em função da temperatura  $dR/dT = 0,0028^\circ\text{C}^{-1}$  encontrada na Fig.4.21, nesta Figura foi possível determinar que para uma variação de 0,03 no sinal de refletância se apresenta uma variação aproximada de 11 °C na temperatura da amostra contéuda na célula de infusão. Sendo a temperatura de referência de 24 °C, se

obtem que as temperaturas aproximadas das amostras dentro da célula de infusão são de 14 e 35 °C respectivamente. Observando uma leve diferença entre elas, a variação entre o valor estimado e o valor medido pode ter relação com os câmbios de temperatura gerados pela adsorção e dissipação de calor a o longo do percorrido pelo circuito hidráulico do sistema.

Continuando com a ideia de analisar a influência da temperatura na refletância foi realizado um experimento utilizando regimes estático e dinâmico para observar se eles geram câmbios significativos no valor de refletância. Para uma temperatura meia de 24 °C, foram estabelecidas condições de tempo e vasão em que foi inserida água destilada dentro da célula de infusão (Tabela 2). Utilizando estas condições foram realizados três sensogramas que registram a refletância em um período de sete horas, para uma posição do prisma de 5.5 graus. A Fig.4.23 apresenta o resultado dos três sensogramas que foram realizados independentemente e baixo as mesmas condições anteriormente descritas.

Tabela 2. Vasão máxima e mínima para os diferentes padrões seringas.

<i>Intervalo de tempo (horas)</i>	<i>Vasão (ml/min)</i>	<i>Vasão (µl/min)</i>
<i>0-1</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>1-2</i>	<i>2 ml em 60 min</i>	<i>11,1</i>
<i>2-3</i>	<i>3 ml em 60 min</i>	<i>16,7</i>
<i>3-4</i>	<i>5 ml em 60 min</i>	<i>27,8</i>
<i>4-5</i>	<i>10 ml em 120 min</i>	<i>55,6</i>
<i>5-7</i>	<i>0</i>	<i>0</i>

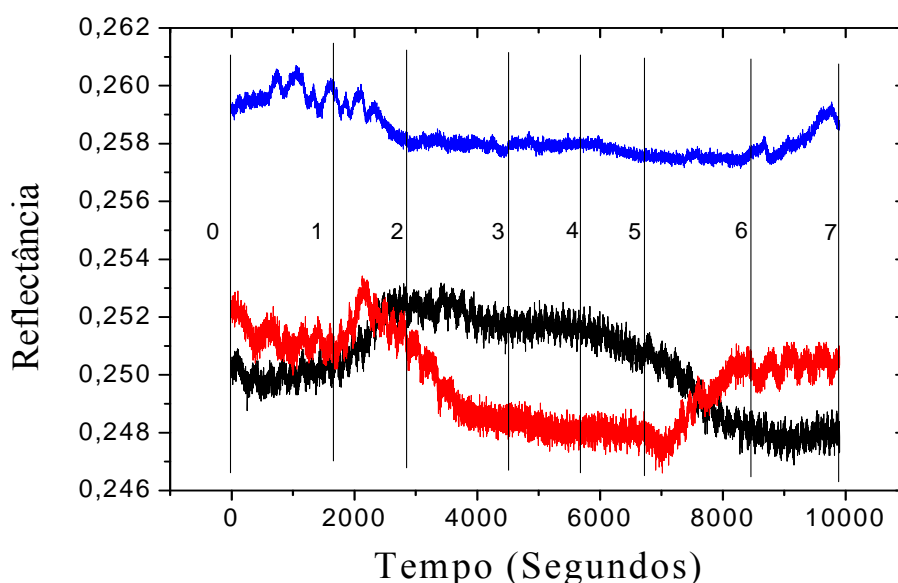


Fig.52 Reflectância em função do tempo.

É possível observar nos sensogramas da Fig.4.23 que para cada intervalo de tempo indicado na tabela 2 a sinal de refletância não mantém um padrão no comportamento que possa ser associado à vasão inserida no momento. É provável que as variações na refletância tinham uma relação direta com os câmbios de temperatura da amostra inserida ou do ambiente da sala mesma. Se a causa das flutuações do sinal é realmente a temperatura, os espectros 1, 2 e 3 apresentam variações máximas de xxxx, xxxx e xxxx, valores acima do erro do sistema de 0,002 reportado em (Gustavo) e que correspondem respectivamente com flutuações de temperaturas de aproximadamente xxx, xxx e xxx °C.

Visando analisar a influência da temperatura dentro da sala foi realizado um experimento utilizando uma amostra de água destilada com temperatura meia de 24 °C em regime estático, uma frequência de amostragem de 10 segundos e um prisma com uma posição angular de 5,5 graus. O sensograma que mostra a evolução do sinal de refletância para um período de sete dias e apresentado na Fig.4.24.

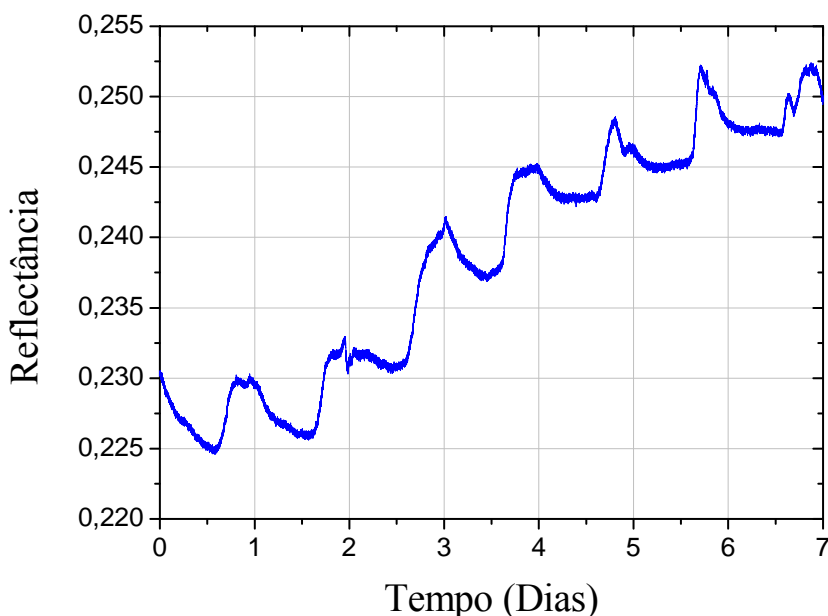


Fig.53 Evolução do sinal de refletância para um período de 7 dias.

Durante todo o período de medição do experimento foi monitorada periodicamente a temperatura da sala com um termômetro, observando-se que esta permaneceu aproximadamente em 24°C, esperando-se obter uma curva de refletância com leves

variações no percorrido dos dias, no entanto pode-se apreciar na Fig.4.24 que a sinal de refletância vá aumentando progressivamente no transcurso do tempo. Este comportamento nos indica que existe um fator que interfere no comportamento da curva.

Entre os parâmetros que podem afetar visivelmente a curva de refletância está a variação da temperatura, é por isso que se opto por determinar este valor indiretamente com base na relação  $dR/dT = 0,0028$ , sendo o valor da refletância 0,023, obtém-se um valor  $dT = 8,2^{\circ}\text{C}$ , que indica a variação da temperatura, novamente observando o comportamento da curva esperasse que este valor corresponda a um descenso na temperatura visto que a refletância está aumentando, assim iniciando com uma temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$  e com um descenso de  $8,2^{\circ}\text{C}$ , a temperatura esperada seria de  $16^{\circ}\text{C}$  aproximadamente, valor de temperatura que não coincide com a temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$  reportada pôr o termômetro.

Observa-se que existe uma discordância entre o valor calculado da temperatura e o valor medido pelo termômetro, que não corresponde ao comportamento mostrado pela curva, o que nos leva a sugerir que o aumento do sinal de refletância pode estar associado a outros fatores como uma possível instabilidade nas fontes de alimentação, laser, fotodetectores etc., hipóteses que não foi testada no presente trabalho e se sugere para pesquisas posteriores.

## 5. Conclusões

Neste trabalho foi integrado um reflectômetro automatizado operando no infravermelho com um módulo de infusão, sendo projetado a possíveis aplicações no desenvolvimento de sensores biomoleculares baseados em ressonância de plásmon de superfície para a monitoração de múltiplas reações biomoleculares. Os experimentos e testes desenvolvidos mostraram que o sistema RPS responde ante a variação da concentração da amostra em estudo.

Foi verificado experimentalmente a metodologia de posicionamento do feixe laser, garantindo que ele incida na área do metal que fica em contato direto com amostra em estudo, metodologia que permitiu realizar este procedimento de maneira rápida.

Foi implementada uma metodologia do alinhamento óptico do espectrômetro para a utilização do prisma equilátero com vidro SF2, esta metodologia abrange: o acondicionamento do laser, e o alinhamento do prisma que a sua vez compreende a incidência do laser na face superior do prisma e o giro em sua incentro.

Obteve-se uma curva de calibração para o sistema integrado reflectômetro automatizado com um módulo de infusão, se verifico que para concentrações embaixo de 0,02 mg/ml a curva afasta-se da linearidade, mostrando que este comportamento é coerente com a resolução angular do reflectômetro que alcança 0,005 graus (80 $\mu$ rad).

A partir das curvas de refletância obtidas com o reflectômetro integrado na configuração de refletância total (ATR), foi possível determinar o ângulo crítico para uma serie de amostras com concentrações salinas diferentes, permitindo com ajuda do índice de refração do prisma, calcular o índice de refração das amostras. O anterior mostra o amplo campo de aplicação, posto que o reflectômetro integrado pode ser utilizado para determinar índices de refração sem precisar estritamente do efeito de plásmon de superfície.

A partir das curvas de RPS obtidas para diferentes concentrações salinas, se determino um comportamento lineal entre as variações do ângulo de ressonância e os índices de refração, calculados a partir dos parâmetros extraídos das mesmas curvas.

O sistema integrado SPR foi usado para determinar o índice de refração em amostras líquidas nas quais varia a concentração de NaCl, que permitiu calcular uma sensibilidade de  $5.3 \times 10^{-4}$ , valor que se considera apropriado e suficiente para o desenvolvimento de sensores biomoleculares.

Para evitar saturação do sinal para aplicações em monitoração de múltiplas reações biomoleculares, pretende-se adaptar o sistema para operar de tal forma a manter o nível de sinal constante, sempre no ponto de máxima declividade da curva de RPS, de forma a se pode registrar a variação temporal do ângulo de incidência do feixe.

As curvas RPS tanto em regime estático como dinâmico realizadas baixo as mesmas condições de temperatura, vazão e concentração, não apresentam diferença significativas no valor de refletância, conclui-se que as medições da refletância podem ser realizadas em qualquer regime sem ter variações que comprometam seu comportamento.

Foi possível determinar uma relação que mostra como varia a refletância do sensor RPS em função da temperatura, que permitiu analisar se as flutuações de refletância em função do tempo presentes em um sensograma são o resultado de uma reação térmica esperada ou de variações térmicas causadas por outras fontes.

O reflectômetro automatizado com sistema de infusão integrado relatado neste trabalho pode ser utilizado na caracterização de reações biomoleculares. Trabalhos estão sendo dirigidos no momento para uso do sistema em sistemas biomoleculares bem caracterizados, com o emprego de protocolos de funcionalização bem estabelecidos da superfície de ouro.

Os testes realizados no presente trabalho ainda não fizeram uso de filmes de ouro otimizados para máximo fator de qualidade, visando o melhoramento da resposta do sensor RPS, sugere a utilização desses filmes em trabalhos futuros.

### **Anexo I: Formulação para determinar o Índice de refração a partir das curvas RPS**

$$n = n - j\kappa \quad (3.2)$$

em que  $j$  é o número imaginário puro e  $n$  e  $\kappa$  são ambos positivos, representando o índice de refração e coeficiente de extinção do metal, respectivamente [8 artigo]. Para metais nobres na região do infravermelho próximo  $n \ll \kappa$ . Por exemplo, no comprimento de onda  $\lambda = 975,1$  nm utilizado neste trabalho,  $n \approx 0,09$  e  $\kappa \approx 6,1$  para o caso do ouro [8 artigo]. A espessura do metal que maximiza a sensibilidade do efeito nesse comprimento de onda é de aproximadamente 67 nm para o caso de um prisma de vidro SF2, do tipo utilizado neste trabalho [8 artigo].

### **Formulação para determinar o Índice de refração a partir das curvas RPS**

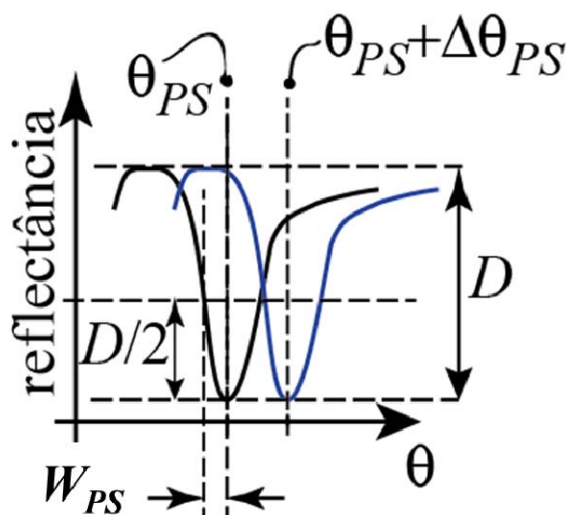


Fig.54 Caracterização dos espectros RPS para a determinação do índice de refração.

A caracterização do efeito de RPS é feita pela medição da intensidade de luz refletida no fotodetector ilustrado na Fig.3.17. O efeito ressonante é observado em uma estreita faixa angular dentro daquela em que ocorreria reflexão interna total na ausência do filme metálico [8 artigo], i.e.,

$$\theta > \theta_C = \text{sen}^{-1}(n_S/n_P) . \quad (3.3)$$

Processos dinâmicos ocorrendo na vizinhança da superfície metálica, provenientes, por exemplo, de reações biomoleculares, causam flutuações no índice de refração que causam deslocamento na curva de ressonância, conforme ilustrado na Fig.3.17. A medição do descolamento angular  $\Delta\theta_{PS}$  do ângulo de ressonância  $\theta_{PS}$  permite inferir o grau de variação do índice de refração. Se a variação for causada, por exemplo, pela imobilização de biomoléculas na superfície, a concentração de biomoléculas em solução pode então ser quantificada.

Para ter uma estimativa da sensibilidade do ângulo de ressonância relativamente ao índice de refração, pode-se utilizar a aproximação para a condição de ressonância obtida para o caso de interface metal-dielétrico, ambos considerados semi-infinitos. Assumindo válida a hipótese de um metal nobre de baixas perdas, satisfazendo a  $\kappa^2 \gg n^2, n_s^2$ , para pequenas variações  $\Delta n_s$  no índice de refração da solução [8 artigo], a variação do ângulo de ressonância pode ser posta na forma

$$\Delta\theta_{PS} \approx \text{tg}\theta_{PS}(\Delta n_s/n_s) . \quad (3.4)$$

A sensibilidade da técnica depende de quão pequena seja a meia largura à meia altura  $W_{PS}$  da curva de ressonância, ilustrada na Fig.3.17. A magnitude da declividade da função reflectância  $R$  à meia altura, conforme indicado na Fig.3.17, é aproximadamente [8 artigo]

$$\Delta R/\Delta\theta \approx D/(2W) , \quad (3.5)$$

em que  $D$  é a faixa dinâmica, indicada na figura. Para uma variação  $\Delta\theta = \Delta\theta_{PS}$ , (3.4) e (3.5) fornecem

$$\Delta R = Q_{PS}(\Delta n_s/n_s) , \quad (3.6)$$

em que

$$Q_{PS} = \frac{D}{2W} \text{tg}\theta_{PS} , \quad (3.7)$$



é definido como o fator de qualidade da curva de RPS. A expressão (3.6) mostra que para uma dada variação relativa do índice de refração da região vizinha à superfície metálica, a variação de sinal será tanto maior quanto maior for o fator de qualidade. Com base nos dados da ref.[8 artigo], para  $\lambda = 975,1 \text{ nm}$ , no caso de filme de ouro e prisma de vidro SF2, assumindo o valor tabulado do índice de refração da água destilada em  $T = 300 \text{ K}$ , de aproximadamente  $n_s \approx 1,333$ , tem-se  $\theta_{PS} \approx 56$  graus,  $w \approx 1,7 \text{ mrad}$  e (3.7) fornece  $Q_{PS} \approx 440$ , para  $D=1$ . Assumindo, por exemplo, uma relação sinal ruído típica de 1000, estima-se, com o uso de (3.6) um limite de detecção de  $\Delta n_s / n_s \approx 2 \times 10^{-6}$ .

### ***Anexo II: Aproximação de Cauchy que permite determinar o índice de refração em Função da Temperatura***

Para saber teoricamente como varia o índice de refração da água com relação à temperatura, foi aplicada a equação de Cauchy que permitiu determinar uma aproximação do índice de refração a partir do comprimento de onda e dos coeficientes dependentes da temperatura. A equação utilizada foi

$$n(\lambda, T) = A(T) + \frac{B(T)}{\lambda^2} + \frac{C(T)}{\lambda^4} + \frac{D(T)}{\lambda^6}, \quad (4.1)$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda nm;  $A(T)$ ,  $B(T)$ ,  $C(T)$  e  $D(T)$  são os coeficientes de Cauchy que dependem da temperatura; T a temperatura em °C [Water refractive index in dependence on temperature and wavelength: a simple approximation]. A Fig.4.7 mostra para uma faixa de temperatura entre 20 e 30 °C a representação teórica da variação do índice de refração em função da temperatura para um comprimento de onda de 975,1 nm, podendo determinar que  $dn/dT = -100 \text{ E-}4$ , o que significa que para o  $\Delta T = 3,7$  °C indicado anteriormente, obtém-se um aumento de  $\Delta n = 0,0004$  aproximadamente.

$$\begin{aligned}
 A0 &:= 0.244257733 & A4 &:= 1.58920570 \cdot 10^{-3} \\
 A1 &:= 9.74634476 \cdot 10^{-3} & A5 &:= 2.45934259 \cdot 10^{-3} \\
 A2 &:= -3.73234996 \cdot 10^{-3} & A6 &:= 0.900704920 \\
 A3 &:= 2.68678472 \cdot 10^{-4} & A7 &:= -1.66626219 \cdot 10^{-2} \\
 \lambda u &:= 229.202 & \lambda i &:= 5432.937 \\
 \lambda 0 &:= 589 & T_i &:= 300.85 \\
 T0 &:= 273.15 & x &:= 975.1
 \end{aligned}$$

$$\text{kk}(T, x) := A0 + A1 + A2 \frac{T}{T0} + A3 \frac{T}{T0} \left( \frac{x}{\lambda 0} \right)^2 + A4 \left( \frac{x}{\lambda 0} \right)^{-2} + \frac{A5}{\left( \frac{x}{\lambda 0} \right)^2 - \left( \frac{\lambda u}{1000} \right)^2} + \frac{A6}{\left( \frac{x}{\lambda 0} \right)^2 - \left( \frac{\lambda i}{1000} \right)^2} + A7$$

$$\text{kk}(T, x) = 0.2018979$$

$$\text{nw}(x) := \sqrt{\frac{1 + 2 \cdot \text{kk}(T, x)}{1 - \text{kk}(T, x)}}$$

$$\text{nw}(x) = 1.326242$$

$$\begin{aligned}
 A0 &:= 0.244257733 & A4 &:= 1.58920570 \cdot 10^{-3} \\
 A1 &:= 9.74634476 \cdot 10^{-3} & A5 &:= 2.45934259 \cdot 10^{-3} \\
 A2 &:= -3.73234996 \cdot 10^{-3} & A6 &:= 0.900704920 \\
 A3 &:= 2.68678472 \cdot 10^{-4} & A7 &:= -1.66626219 \cdot 10^{-2} \\
 \lambda u &:= 229.202 & \lambda i &:= 5432.937 \\
 \lambda 0 &:= 589 & T_i &:= 300.85 \\
 T0 &:= 273.15 & x &:= 975.1
 \end{aligned}$$

$$\text{kk}(T, x) := A0 + A1 + A2 \frac{T}{T0} + A3 \frac{T}{T0} \left( \frac{x}{\lambda 0} \right)^2 + A4 \left( \frac{x}{\lambda 0} \right)^{-2} + \frac{A5}{\left( \frac{x}{\lambda 0} \right)^2 - \left( \frac{\lambda u}{1000} \right)^2} + \frac{A6}{\left( \frac{x}{\lambda 0} \right)^2 - \left( \frac{\lambda i}{1000} \right)^2} + A7$$

$$\text{kk}(T, x) = 0.2018979$$

$$\text{nw}(x) := \sqrt{\frac{1 + 2 \cdot \text{kk}(T, x)}{1 - \text{kk}(T, x)}}$$

$$\text{nw}(x) = 1.326242$$

$$\varepsilon_w(x) := \text{nw}(x)^2$$

Função Permissividade para a água.

## *Referências*

- [1] R. W. Wood, “On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum”, Proc. Phys. Soc. London 18, 269-275 (1902).
- [2] Kretschmann, “Die bestimmung optischer konstanten von metallen durch anregung von oberflächenplasmaschwingungen“, Z. Physik, Vol. 241, pp. 313-324, 1971.
- [3] Kretschmann, “Die bestimmung optischer konstanten von metallen durch anregung von oberflächenplasmaschwingungen“, Z. Physik, Vol. 241, pp. 313-324, 1971.
- [4] Kretschmann, “Die bestimmung optischer konstanten von metallen durch anregung von oberflächenplasmaschwingungen“, Z. Physik, Vol. 241, pp. 313-324, 1971.
- [5] B. Rothenhäusler and W. Knoll, “Surface-plasmon microscopy”, Nature, Vol. 332, pp 615-617,1988.
- [6] E. Fontana and R. H. Pantell, “Characterization of multilayer rough surfaces by use of surface-plasmon spectroscopy”, Phys. Rev. B 37(7), pp. 3164-3182, 1988.
- [7] S. H. Zaidi, M. Yousaf and S. R. J. Brueck, “Grating coupling to surface plasma waves. I. First-order coupling”, J. Opt. Soc. Am. 8(4), pp. 770-779, 1991.
- [8] C. Kittel, “Introduction to Solid State Physics”, Chapter 14, 8th Edition, Wiley, 2005.
- [9] W. P. Chen and J. M. Chen, “Use of surface plasma waves for determination of the thickness and optical constants of thin metallic films”, J. Opt. Soc. Am. 71(2), pp. 189-191, 1981.
- [10] E. Fontana, R. H. Pantell and S. Strober, “Surface plasmon immunoassay”, Appl. Optics 29(31), pp. 4694-4704, 1990.
- [11] S. Sjolander and C. Urbaniczky, “Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis”, Anal. Chem. 63(20), pp. 2336-2345, 1991.
- [12] R. C. Jorgenson and S. S. Yee, “A fiber-optic sensor based on surface plasmon resonance”, Sensors and Actuators B 12(3), pp. 213-220, 1993.
- [13] Eduardo Fontana, “Thickness Optimization of Metal Films for the Development of Surface Plasmon Based Sensors”, Applied Optics, Vol 45, No. 29, pp. 7632-7642, 2006.
- [14] Gustavo O. Cavalcanti, Marcus A. Luna and Eduardo Fontana, “Automated Reflectometer for Surface Plasmon Resonance Studies in the Infrared and Its Application for the Characterization of Pd Films”, In: 2007 SBMO/IEEE MTT-S

International Microwave & Optoelectronics Conference, 2007, Salvador. IEEE Press, 2007. v. 1. p. 698-701.

- [15] W. P. Chen and J. M. Chen, "Use of surface plasma waves for determination of the thickness and optical constants of thin metallic films", J. Opt. Soc. Am. 71(2), 189-191 (1981).
- [16] Loibman J. R. "Sistema de Infucao de Liquidos Controlado por Arduino" [TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2013.