UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JOSÉ FRANCISCO MIRAS DOMENEGUETI

Sensor óptico para a análise da dinâmica de reações químicas

São Carlos
2019

JOSÉ FRANCISCO MIRAS DOMENEGUETI

Sensor óptico para a análise da dinâmica de reações químicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Carlos Zílio

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Domenegueti, José Francisco Miras
Sensor óptico para a análise da dinâmica de reações químicas / José Francisco Miras Domenegueti; orientador Sérgio Carlos Zilio - versão corrigida -- São Carlos, 2019.
94 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Refratômetro. 2. Afinidade química. 3. Detecção biomolecular. I. Zilio, Sérgio Carlos, orient. II. Título.

Aos meus pais José Eurípedes e Maria Francisca, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, sem dúvida alguma a coisa mais importante na minha vida. O meu porto seguro pra onde posso retornar sempre nas horas mais complicadas. Não há maneiras de transcrever em palavras o quanto sou grato aos meus pais José Eurípedes e Maria Francisca por tudo o que fizeram, e ainda têm feito por mim. Acredito que jamais terei condições de retribuir todo o carinho recebido, além dos sacrifícios realizados para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço a minha irmã Liliane, por todo o apoio ao longo desses anos. Agradeço ao meu irmão, João Paulo, pela dedicação em cuidar dos nossos pais enquanto estou distante e por toda a ajuda que sempre recebo.

Sou extremamente grato à Millena Lograd, minha nova família que está começando agora. Nesses últimos dois anos, vivenciei os momentos mais delicados da minha vida e passei por toda a turbulência graças ao seu apoio, que teve início em uma forte amizade e agora caminha para nosso casamento. Biiiijo!

Agradeço aos tios e primos que de alguma forma me ajudaram nesses anos fora de casa. Em especial ao meu padrinho Nivaldo que é um segundo pai para mim.

Aos meus amigos de Franca, dos quais me distanciei para poder estudar e permanecem ao meu lado até hoje apesar da minha ausência. São eles: Amanda, Marcos Vinicius, Murilo, Luciene, Marcelo, Vanessa, Geovanni, Rafael Laporte, Rafael (Arantes), Vinicius, Elvis.

Quando terminei minha primeira graduação, somente consegui realizar o sonho de ingressar no curso de física por causa da ajuda de quatro pessoas muito especiais, as quais tive a honra de conhecer e não poderia deixar de expressar minha gratidão a elas. Carlinhos, Fabinho, Cidinha e Negrinho, muito obrigado por terem confiado em mim!

Sou muito grato aos amigos de São Carlos, que conheci por causa dos estudos e sempre contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional: Jessica (Velma), Epson, Luiz Henrique, Artur, Jéssica (Benzão), Iberê, Mateus, Carolina, Diogo, Lincoln, Gilberto, Mariana, Caio. Ao pessoal do grupo de fotônica: Leonardo (Tchê), Marcos (Marcão), André, Daniel, Lino, Otuka, Gustavo, Nathália, Emerson, Anderson, Tiago e Renato.

Sou grato aos meus professores de graduação e pós-graduação, em particular aos professores Cléber Mendonça, Leonardo Maia e Lidério Ioriatti pelas incontáveis vezes que interromperam sua rotina de trabalho para conversarem comigo sobre os mais variados assuntos.

Meus agradecimentos ao Prof. Dr. Nirton Cristi e à Profª. Drª. Juliana Cancino Bernardi pelo apoio, sem dúvidas, vital para esse trabalho e ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pelo espaço cedido no GNano.

Ao pessoal do Departamento de Física da UFSCar, minha nova casa, pelo apoio e pelos diversos galhos quebrados para me ajudar com o desenvolvimento do trabalho nos últimos dois anos, em especial ao Pro. Dr. Márcio Daldin Teodoro e ao pessoal do GNS.

Ao pessoal da biblioteca, em especial para a Neusa, que sempre me salvou na conformação da dissertação e da tese.

Agradeço ao meu orientador, o professor Sérgio Carlos Zilio, com quem tenho a honra de trabalhar desde o meu segundo ano de graduação. Sempre foi (muito) paciente com minhas dificuldades e dedicado a esclarecer todas as minhas dúvidas, me ajudando até mesmo em questões pessoais.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

” Practice has a logic which is not that of the logician”

Pierre Bourdieu

RESUMO

DOMENEGUETI, J. F. M. **Sensor óptico para a análise da dinâmica de reações químicas.** 2019. 94 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Um biossensor de afinidade química baseado no fenômeno da reflexão total interna é apresentado. Nesse, as propriedades particulares apresentadas pelas componentes ortogonais de polarização do campo elétrico da luz permitem que ambas se cancelem na vizinhança do ângulo crítico da reflexão interna, proporcionando um meio para sua determinação unívoca, permitindo monitorar o mesmo como função do índice de refração de uma amostra de interesse. Um estudo acerca dos principais aspectos teóricos envolvidos no fenômeno da reflexão total interna foi realizado, a fim de explorar e justificar os fenômenos observados. A montagem experimental utilizada nos experimentos consiste de um laser de HeNe emitindo em $633\ nm$, um polarizador, uma lente semicilíndrica de alto índice de refração, produzida com um vidro denso do tipo *flint*, um filme produzido com um anticorpo, que é depositado sobre essa lente, um analisador paralelamente orientado com relação ao eixo de transmissão do polarizador, um dispositivo transdutor, que converte um sinal luminoso em sinais elétricos, uma solução aquosa do antígeno específico e de um computador, onde as informações coletadas pelo transdutor são tratadas por meio de um programa de aquisição de dados desenvolvido em uma plataforma gráfica de programação. O programa empregado permite o acompanhamento das variações do perfil luminoso, devido à interação do filme de anticorpos com a solução de antígenos, coletado pelo transdutor em tempo real, ou seja, é possível acompanhar toda evolução da reação química entre um par de espécies químicas em tempo real. Para confirmação da efetividade da técnica, foram comparadas medidas obtidas com um refratômetro comercial, onde foi constatado que o sistema possui sensibilidade suficiente para acompanhar mudanças da ordem de 10^{-5} unidades do índice de refração.

Palavras-chave: Refratômetro. Afinidade química. Detecção biomolecular.

ABSTRACT

DOMENEGUETI, J. F. M. **Optical sensor for chemical reactions dynamics analysis.** 2019. 94 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A chemical affinity biosensor based on the phenomenon of total internal reflection is presented. In it, the particular properties exhibited by the orthogonal polarization components of the electric field of light allow them to cancel in the vicinity of the critical angle of the internal reflection, providing means for its univocal determination, allowing its monitoring as a function of the refractive index of a sample of interest. A study about the theoretical aspects involved in the total internal reflection phenomenon was carried out in order to explore and justify the observed phenomena. The experimental set up consists of a HeNe laser emitting at $633\ nm$; a polarizer; a high refractive index semi-cylindrical lens, produced with a dense *flint* type glass; a film produced with an antibody, which is deposited over the aforementioned lens; an analyzer oriented parallel to the transmission axis of the polarizer; a transducer device, which converts a light signal into electric signals; an aqueous solution of the specific antigen and a computer, where the information collected by the transducer is treated with a data acquisition software developed in a graphical programming platform. The software allows one to monitor changes in the light profile due to interaction of the antibody with the antigen solution, collected by the transducer in real time, i.e. it's possible to follow the evolution of the chemical reaction between a couple of chemical species in real time. To confirm the effectiveness of the technique a comparison with measurements obtained with a commercial refractometer was carried out, where it was verified enough sensitivity to follow changes of the order of 10^{-5} refractive index units.

Keywords: Refractometer. Chemical affinity. Biomolecular sensing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Dispersão da luz viajando no ar ($\epsilon a = 1$) e num meio denso ($\epsilon > 1$) comparado à curva de dispersão dos plasmons. 24

Figura 2.2 – Excitação de plasmons na configuração de Otto. 24

Figura 2.3 – Configuração de Kretschmann para a excitação de plasmons. 26

Figura 2.4 – Deslocamento ressoante no espectro de refletância (a) devido a adsorção de analitos (b). 27

Figura 2.5 – Excitação de plasmons em metais periodicamente distorcidos. 28

Figura 2.6 – Configuração de Kretschmann modificada com uma camada de grafeno. 28

Figura 2.7 – (a)Confinamento do campo elétrico na vizinhança de nanopartículas de ouro e (b) comparação entre os campos evanescentes para SPR e LSPR. 29

Figura 3.1 - Refração em uma interface plana. 33

Figura 3.2 - Incidência (a) abaixo e (b) acima do ângulo crítico. 34

Figura 3.3 - Onda incidente com polarização (a) s e (b) p com suas respectivas ondas transmitida e refletida. 36

Figura 3.4 - Coeficientes de reflexão externa e interna para uma interface SF10/água. 39

Figura 3.5 – Campo evanescente na interface SF10/água para (a) $\theta i = 50{,}68°$ e (b) $\theta i = 50{,}79°$ 40

Figura 3.6 – Distância de penetração do campo evanescente para uma interface SF10/água acima do ângulo crítico. 41

Figura 3.7 - Diferença de fase entre as componentes *s* e *p* (a) a partir do ângulo de Brewster para $n = 0{,}774$ e (b) acima do ângulo crítico para alguns valores de n. 42

Figura 3.8 – Máxima diferença de fase na reflexão interna em função do índice de refração relativo. 43

Figura 3.9 – (a) A refletividade para as componentes *s* e *p*, (b) a diferença de fase e (c) o perfil de intensidade resultante da interferência dessas duas ondas para todo o intervalo angular. A linha tracejada é um guia para os olhos. 45

Figura 3.10 - Perfil de intensidade na vizinhança do ângulo crítico para alguns valores de IR do substrato. 46

Figura 4.1 – Fórmula molecular do APTES. 54

Figura 4.2 – Fórmula molecular do glutaraldeído. 54

Figura 4.3 – Fórmula molecular da glicina. 55

Figura 4.4 – Morfologia dos filmes compostos por SAM. 55

Figura 4.5 – Camada de imobilização obtida com APTES/glutaraldeído. 56

Figura 4.6 – Filmes de APTES/glutaraldeído oxidados. 56

Figura 4.7 – Eppendorf contendo APTES e glutaraldeído. 57

Figura 4.8 – Fórmula molecular da EDC (a) e da NHS (b). 57

Figura 4.9 – Mecanismo de atuação do EDC. 58

Figura 4.10 – Estrutura molecular do filme de EDC. 59

Figura 4.11 – Suporte utilizada para permitir o fluxo da fase de contato pela base da lente semicilíndrica. 60

Figura 4.12 - CCD linear Sony ILX 554B e sua placa de controle. 61

Figura 4.13 – Efeito do filtro de frequência (a direita) no sinal sem filtro (esquerda) obtido pelo CCD. 62

Figura 4.14 – Ajuste quadrático empregado para determinar a posição do mínimo de intensidade no CCD. 63

Figura 4.15 – Interface do *software* de análise de dados com destaque para algumas funcionalidades. 64

Figura 4.16 – Padrão luminoso característico definindo o ângulo crítico. 65

Figura 5.1 – Comparação entre o sistema empregado neste trabalho e um refratômetro comercial para soluções de DMSO. A linha vermelha é uma curva de ajuste cujo coeficiente linear é $1{,}002 \pm 0{,}006$. 68

Figura 5.2 - Comparação entre o sistema empregado neste trabalho e um refratômetro comercial para soluções de etanol. A linha vermelha é uma curva de ajuste cujo coeficiente linear é $1{,}02 \pm 0{,}01$. 68

Figura 5.3 – Evolução temporal do ângulo crítico com lente semicilíndrica em contato com PBS aquecem até atingir temperatura ambiente. 69

Figura 5.4 – Simulação do índice de refração do ar como função da temperatura para umidade relativa mantida em 45% e pressão atmosférica 101,325 kPa. A linha vermelha é apenas um guia para os olhos. 70

Figura 5.5 – Simulação do índice de refração do ar como função da umidade relativa para temperatura mantida em 22 ºC e pressão atmosférica 101,325 kPa. A linha vermelha é apenas um guia para os olhos. 71

Figura 5.6 – Simulação do índice de refração do ar como função da pressão atmosférica para temperatura mantida em 22 ºC e umidade relativa em 45 %. A linha vermelha é apenas um guia para os olhos. 71

Figura 5.7 – Índice de refração da água em função da temperatura. A curva vermelha é apenas um guia para os olhos. 72

Figura 5.8 – Evolução temporal da posição do ângulo crítico para solução contendo $0{,}1\ mg/ml$ de anti-BSA em contato com filme APTES/glutaraldeído/BSA. 74

Figura 5.9 - Evolução temporal da posição do ângulo crítico para solução contendo $15\ mg/ml$ de anti-BSA em contato com filme APTES/glutaraldeído/BSA. 74

Figura 5.10 – Sensorgrama completo obtido com uma solução de $60\ mg/ml$ de anti-BSA em PBS. 76

Figura 5.11 – Limitação por transporte de massa. 77

Figura 5.12 – Evolução temporal do ângulo crítico para soluções contendo $1\ mg/ml$, $5\ mg/ml$, $10\ mg/ml$, $15\ mg/ml$ de BSA e etapa de recuperação da camada de imobilização com PBS. 78

Figura 5.13 – Variação da posição do ângulo crítico como função da concentração para medições sucessivas em lentes distintas. 79

Figura 5.14 – Posição do ângulo crítico para uma solução de analito não-específico (anti-dengue). 80

Figura B.1 – Geometria da rotação da polarização devido às diferentes refletividades das ondas *s* e *p*. 93

Figura B.2 – Rotação da polarização de um campo elétrico refletido em uma interface SF10/água em função do ângulo de incidência. 94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 ESTADO DA ARTE 21

2.1 RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIES 21

2.1.1 Ressonância de plasmons aplicada a sensores 24

2.1.1.1 Configuração de Otto 24

2.1.1.2 Configuração de Kretschmann 25

2.1.1.3 Configuração em grade de difração 27

2.1.1.4 Ressonância de plasmons localizada 29

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS 31

3.1 ÂNGULO CRÍTICO 31

3.1.1 Índice de refração 31

3.1.2 Lei de Snell 32

3.1.3 Coeficientes de Fresnel e polarização da luz 34

3.1.4 Interferência entre as componentes ortogonais de uma onda eletromagnética 43

3.2 DINÂMICA DE INTERAÇÕES QUÍMICAS 47

4 SEÇÃO EXPERIMENTAL 51

4.1 MÉTODO EXPERIMENTAL 51

4.2 PRODUÇÃO DAS CAMADAS DE IMOBILIZAÇÃO 52

4.3 SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS 60

4.3.1 Charge-coupled device (CCD) 61

4.3.2 Programa de aquisição e tratamento dos dados 62

5 RESULTADOS EXPERIMENTAIS 67

5.1 MEDIDAS DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO DE LÍQUIDOS TRANSPARENTES 67

5.2 EFEITOS DA TEMPERATURA 69

5.3 MEDIDAS DE AFINIDADE QUÍMICA 73

6 CONCLUSÕES 81

REFERÊNCIAS 83

APÊNDICE A – Condição de existência dos plasmons de superfície 89

APENDICE B – A polarização da luz e o ângulo crítico 93

1 INTRODUÇÃO

A análise de aspectos qualitativos e quantitativos da interação entre pares de espécies químicas que apresentam afinidade específica é importante para uma vasta gama de aplicações científicas e industriais. (1-3) Por esse motivo, sensores que detectam e/ou monitoram a ligação específica de uma substância em solução e um ligante imobilizado em uma superfície de detecção têm sido desenvolvidos. (4-10) Dentre os dispositivos mais amplamente empregados para essa finalidade, destacam-se aqueles baseados no fenômeno da ressonância de plasmons superficiais, que são bem estabelecidos comercialmente e comumente encontrados no mercado. (2,8) Esses biossensores de afinidade baseados na ressonância plasmônica consistem de um elemento que reconhece e é capaz de interagir com uma determinada espécie, ou um particular grupo de espécies químicas, e um transdutor, que converte eventos de ligação em um sinal de saída passível de ser tratado eletronicamente.

Apesar dos sensores fundamentados na ressonância plasmônica apresentarem alta sensibilidade às mudanças no índice de refração, a imobilização de uma camada de ligação sobre um filme metálico é de difícil realização, depende dos ligantes particulares envolvidos (11-14) e, além disso, a orientação geométrica dos ligantes no filme metálico podem afetar a interação com o reagente bioespecífico.(11) Essa e outras dificuldades relacionadas à manufatura dos sensores acabam tornando-os caros, logo, é interessante obter um dispositivo menos dispendioso capaz de atuar como sensor de afinidade química.

A grandeza física que relaciona os eventos de ligação com mudanças na condição de ressonância dos plasmons é o índice de refração, grandeza esta que carrega todas as informações da interação da luz com a matéria. Nessa classe de sensores refratométricos, propomos a utilização do método proposto por Zilio (15), cuja precisão típica se compara àquela apresentada por biossensores comerciais (16), com o intuito de desenvolver um método mais simples, barato e robusto de análise da interação bioespecífica entre pares de biomoléculas.

A técnica tira proveito da diferença de fase relativa entre as componentes de polarização de uma onda eletromagnética para produzir um sinal característico, no qual o ângulo crítico da reflexão interna é facilmente detectado e pode ser

monitorado em função das variações no índice de refração devidas a interação entre um filme de anticorpos e uma solução de antígenos específicos.

Nesse cenário, inserimos o trabalho apresentado na presente tese, que discorre a partir do capítulo 2, no qual são apresentados os principais aspectos acerca da técnica de ressonância de plasmons superficiais, suas montagens mais empregadas na realização de medições da cinética de ligações químicas.

O terceiro capítulo é dedicado à discussão dos aspectos teóricos fundamentais para o entendimento da técnica de medição empregada e dos resultados subsequentemente apresentados.

No capítulo 4, os materiais e métodos empregados para obter os resultados experimentais da técnica utilizada nesse trabalho são abordados em detalhes. Uma completa descrição dos protocolos de crescimento das camadas de imobilização utilizadas nas medições de afinidade química é fornecida, permitindo amplo entendimento no que tange as camadas de imobilização e os mecanismos de obtenção dessas em substratos vítreos.

Nos dois últimos capítulos do corpo principal da tese são apresentados os principais resultados obtidos empregando a refratometria baseada no ângulo crítico como mecanismo de investigação de eventos de ligação química ocorrendo em uma interface, bem como as conclusões acerca dos mesmos.

Por fim, é fornecido um material adicional, nos dois apêndices, a condição de existência dos plasmons de superfície e uma abordagem alternativa à apresentada no capítulo terceiro são exploradas. Essas seções complementares tem o intuito de esclarecer alguns aspectos da condição de excitação de plasmons e fornecer uma segunda perspectiva acerca dos fenômenos envolvidos na reflexão da luz em interfaces dielétricas, respectivamente.

2 ESTADO DA ARTE

Nesta seção é analisada uma das principais técnicas empregadas em análises de cinética química, a ressonância de plasmons de superfície (SPR da sigla em inglês). Iniciado a abordagem dos temas, uma pequena explanação teórica acerca dos fundamentos físicos da técnica é apresentada, seguida por uma discussão das principais montagens utilizadas experimentalmente.

2.1 RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIES

Ao interagir com cargas livres que ocupam a superfície de metais, um campo eletromagnético pode induzir nestas partículas carregadas um movimento oscilatório coletivo e coerente. A essas flutuações eletrônicas, damos o nome polaritons de plasma superficiais (*surface plasma polaritons*), ou plasmons de superfície, que apesar do nome que remete a partículas quânticas, tem sua descrição teórica originada na aproximação de plasmas ao empregar as equações de Maxwell em metais. (17-19)

Essa flutuação na densidade de carga está associada a uma onda eletromagnética confinada na superfície do metal, decaindo fortemente tanto na parte interna quanto na parte externa do mesmo. Devido ao confinamento superficial (veja Apêndice A), a onda de plasma apresenta um caráter conhecido como transversal magnético (discutido em maiores detalhes no capítulo 3), no qual o campo elétrico da onda de plasma tem vetor de propagação orientado paralelamente ao plano de incidência do campo de excitação. (20)

De acordo com a teoria clássica, a relação de dispersão do período espacial dessas ondas plasmônicas com a frequência angular ω é dada por (21):

$$k_{ps} = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\epsilon_m n_a^2}{\epsilon_m + n_a^2}} \tag{2.1}$$

Onde ϵ_m é a permissividade elétrica do metal, n_a é o índice de refração do meio adjacente ao metal, que em geral é um dielétrico, e c é a velocidade da luz no vácuo. A eq. 2.1 pode ser escrita em função da permissividade elétrica do meio

adjacente, assumindo a relação $n_a = \sqrt{\epsilon_a}$. Uma vez que a permissividade dos metais é uma grandeza escalar complexa (22), a relação de dispersão possui uma parte real e uma imaginária, que determinam, respectivamente, o comprimento de onda dos plasmons e a profundidade de penetração dos mesmos. (23) Devido à grande diferença entre os valores de permissividade entre dielétricos e metais, a onda evanescente em ambos os meios é altamente assimétrica, decaindo mais rapidamente na região metálica, e penetrando majoritariamente no dielétrico. Devido a esse maior alcance no meio em contato com o metal, a parte real da relação de dispersão dos plasmons é sensível a mudanças no índice de refração do dielétrico e o campo evanescente pode ser usado como sonda de eventos próximos à interface. (24-27)

O nicho de aplicação no qual os plasmons superficiais obtiveram maior êxito emprega a capacidade de monitorar eventos em interfaces no contexto da análise de eventos de ligações químicas. Para tal, são produzidos filmes com ligantes específicos em um filme fino, de ouro em geral, que interagem com um reagente em solução. Essa camada de ligação atua como um transdutor de eventos de ligação em variações do índice de refração da vizinhança do filme de ouro que, conforme a eq. 2.1, se reflete, por sua vez, em variações no vetor de onda dos plasmons.

Antes de adentrar nos detalhes acerca das montagens específicas utilizadas no estudo de interações químicas, vamos tratar da excitação das ondas plasmônicas, que não ocorrem naturalmente em um condutor em equilíbrio eletrostático. Para que as oscilações coletivas de densidade de carga sejam induzidas nos elétrons livres que existem na superfície de metais, um campo eletromagnético externo deve interagir com uma superfície metálica em condições específicas para que ocorra transferência de energia e momento para os plasmons. Essa condição de casamento ocorre quando o vetor de onda do campo eletromagnético externo coincide com aquele dos plasmons na superfície do metal, dado pela eq. 2.1, que possuem tipicamente a magnitude daqueles da luz visível (20). Vale reforçar que, conforme demonstrado no apêndice A, a natureza TM das ondas plasmônicas impõe que o campo externo incidente também possua a mesma orientação para que exista uma componente do vetor de onda paralela à interface.

Na prática, no entanto, o casamento dos vetores de onda não ocorre para luz viajando no ar, pois, a dispersão do vetor de onda da luz nesse meio, apresentado na eq. 2.2, não coincide com a dos plasmons.

$$k = \frac{\omega}{c} \tag{2.2}$$

A realização prática da ressonância dos plasmons se faz, então, com mecanismos que atuem reduzindo a inclinação da reta $\omega \times k$ da luz no ar. Na figura 2.1, é ilustrado o efeito necessário para que a curva de dispersão da luz no ar intercepte em um único ponto, definindo univocamente a frequência de casamento, a curva de dispersão dos plasmons superficiais, nela, três situações são apresentadas: a primeira na qual a luz, viajando no ar ($\epsilon_a = 1$), incide em uma superfície metálica sob um ângulo menor que noventa graus, não coincidindo em nenhum ponto com a curva dos plasmons; na segunda onde a incidência ainda se dá através do ar, porém num ângulo rasante, o que torna a solução indefinida pois existe uma infinidade de soluções, não ocorrendo a excitação das oscilações de carga; e finalmente, a condição onde a incidência ocorre através de um dielétrico com maior densidade óptica sob um ângulo menor que o reto, interseccionando a curva de plasmons em uma frequência univocamente definida. Nas primeiras demonstrações experimentais desse fenômeno, atribuídas a Otto e Kretschmann (17,28), foi empregado um prisma como acoplador óptico, garantindo a condição de ressonância.

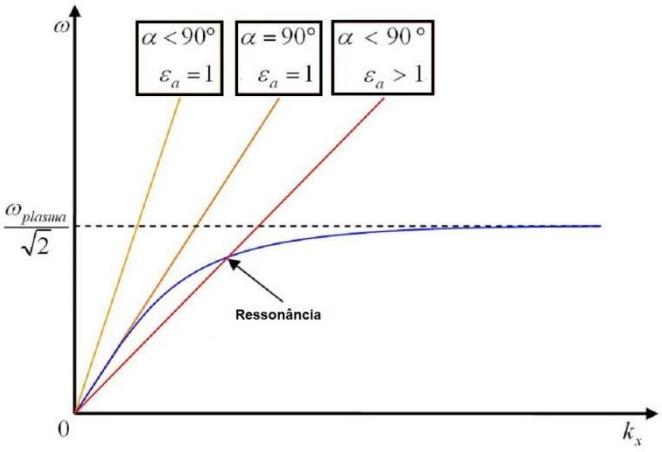

Figura 2.1 – Dispersão da luz viajando no ar ($\epsilon_a = 1$) e num meio denso ($\epsilon > 1$) comparado à curva de dispersão dos plasmons.
Fonte: Elaborada pelo autor.

De posse das condições necessárias para o acoplamento de luz nos modos dos plasmons, passaremos agora a discutir as principais montagens experimentais e condições específicas de casamento dos vetores de onda.

2.1.1 Ressonância de plasmons aplicada a sensores

2.1.1.1 Configuração de Otto

Na montagem proposta por Otto (17), ilustrado na figura 2.2, um prisma é posicionado próximo a uma camada de ouro.

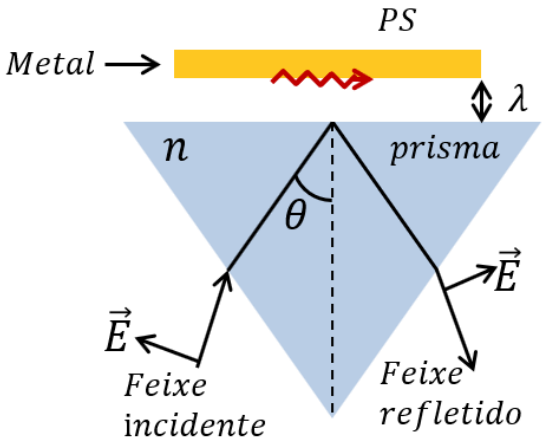

Figura 2.2 – Excitação de plasmons na configuração de Otto.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nessa configuração, a curva de dispersão da luz tem sua inclinação reduzida por um fator $n\,sen\theta$, onde n é o índice de refração do prisma e θ o ângulo de incidência. A ressonância ocorre quando a luz polarizada paralelamente ao plano de incidência atinge a base do prisma de tal forma que os vetores de onda do campo incidente e dos plasmons se igualam, de acordo com a eq. 2.3.

$$\frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\epsilon_m n_a^2}{\epsilon_m + n_a^2}} = \frac{\omega}{c}\, n_p sen\theta_{res} \tag{2.3}$$

Na qual o lado direito da representa a componente do vetor de onda do campo incidente ao longo da direção dos plasmons e θ_{res} é o particular ângulo no qual a igualdade se verifica.

Note que não existe contato direto entre o filme metálico e o prisma, sendo, então, os plasmons excitados por meio de tunelamento fotônico na condição de reflexão total interna (discutida no capítulo 3). O campo evanescente que surge na base do prisma decai rapidamente e, por essa razão, a camada de ouro deve ficar a uma distância de cerca de $1\ \mu m$ para que o acoplamento óptico ocorra. Com efeito, é possível estimar a penetração do campo evanescente gerado pela onda plasmônica obtendo $0{,}28\ \mu m$ de penetração em uma interface ouro/ar com excitação em $\lambda = 600\ nm$ (20). Como os plasmons são excitados na interface entre a lâmina metálica e o prisma, é neste espaço que os plasmons são sensíveis às mudanças no valor de n_a, razão pela qual esta configuração não é muito explorada em sensoriamento, pois a amostra analisada deve ser inserida nesse espaço, o que aumenta muito a complexidade técnica dessa montagem.

2.1.1.2 Configuração de Kretschmann

Na geometria proposta por Kretschmann (28), a lâmina metálica é depositada diretamente na base do prisma, eliminando assim a camada de ar entre os mesmos, conforme apresentado na figura 2.3.

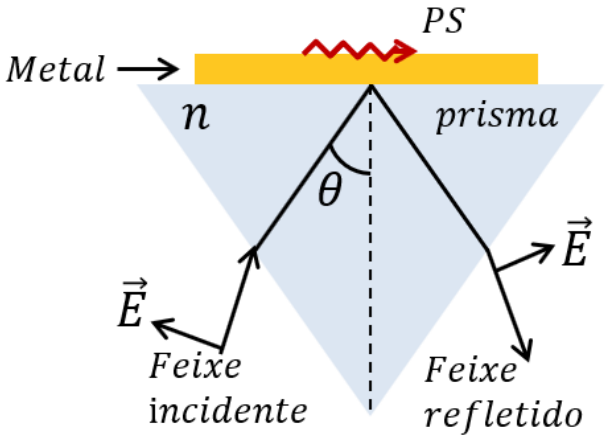

Figura 2.3 – Configuração de Kretschmann para a excitação de plasmons.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A lâmina metálica é extremamente fina, possuindo poucas dezenas de nanômetros de espessura, o que permite a excitação de plasmons na superfície livre da mesma. Nessas condições, o campo evanescente associado à onda plasmônica pode atuar como uma ponta de prova na região adjacente ao filme metálico. A condição de acoplamento do campo externo com as oscilações de carga, também dada pela eq. 2.3, fornece condições para se obter medidas do índice de refração de uma amostra em contato com o filme metálico. Esta configuração é a mais amplamente empregada em equipamentos comerciais (19,29-31) e seu funcionamento consiste na análise do perfil de intensidade refletido da base do acoplador óptico.

Na condição de ressonância, a energia transferida para os plasmons se apresenta como uma mudança na refletividade, que pode ser monitorada em tempo real. As mudanças na condição de acoplamento devido a variações no índice de refração da amostra podem ser avaliadas de diversas formas; sendo as mais comuns a varredura angular (26,32-34), na qual uma fonte de luz monocromática é utilizada e a posição angular do mínimo de refletividade á monitorado; e a varredura espectral (35-36) onde uma fonte de luz banda larga ilumina o acoplador óptico e o comprimento de onda ressonante é monitorado à medida que o índice de refração da amostra sofre alterações. Na figura 2.4 está ilustrado o princípio da aplicação desta configuração no contexto de análises bioquímicas.

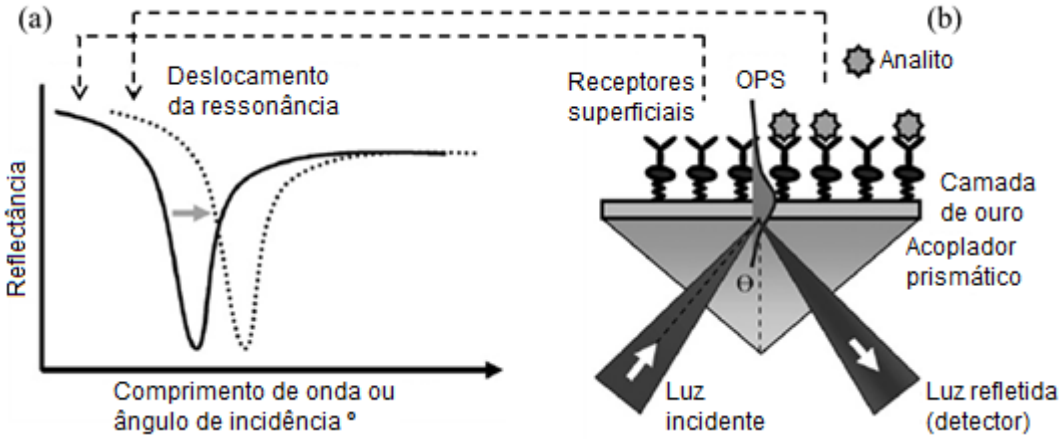

Figura 2.4 – Deslocamento ressoante no espectro de refletância (a) devido a interação dos analitos com os receptores na superfície do ouro (b).
Fonte: Adaptada de HOA; KIRK ;TABRIZIAN. (37)

2.1.1.3 Configuração em grade de difração

Uma configuração extremamente interessante que permite o casamento das relações de dispersão emprega uma estrutura metálica periodicamente distorcida (38-40). Ao interagir com uma grade que possui periodicidade espacial Λ, o vetor de onda do campo de excitação sofre um incremento de $2\pi m/\Lambda$ (38), com m inteiro, e a relação de acoplamento fica:

$$\frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\epsilon_m n_a^2}{\epsilon_m + n_a^2}} = \frac{\omega}{c}\, n_a sen\theta_{res} + m\frac{2\pi}{\Lambda} \tag{2.4}$$

Note que, diferentemente do que se observa na eq. 2.3, o primeiro termo à direita da eq. 2.4 é proporcional ao índice de refração da amostra, isto ocorre, pois, a excitação se dá pela face distorcida da lâmina metálica, que fica em contato com a amostra. O esquema geral dessa montagem é ilustrado na figura 2.5.

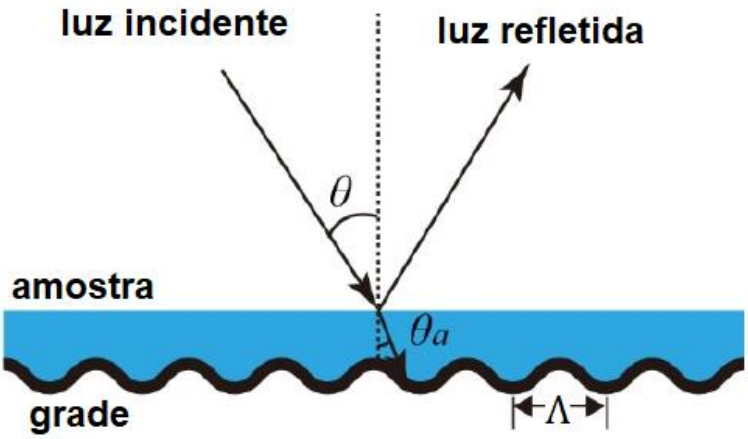

Figura 2.5 – Excitação de plasmons em metais periodicamente distorcidos.
Fonte: Adaptada de CAO et al. (21)

A rugosidade da grade metálica afeta a qualidade do sinal observado na condição de ressonância (40), além disso, o fato de a iluminação ocorrer através da amostra representa uma grande desvantagem dessa geometria, pois, leva a erros de medida associados a distorções do feixe ao se propagar pela solução estudada e somente amostras transparentes são passíveis de análise.

Trabalhos mais recentes, que empregam as geometrias apresentadas até aqui, exploram propriedades do grafeno que, atuando como ponte entre a lâmina metálica e a camada de ligação, demonstrou potencial para aumentar a sensibilidade da ressonância plasmônica a variações do índice de refração, bem como da afinidade química entre as espécies analisadas. (41-45) Na figura 2.6, encontra-se uma ilustração da configuração de Kretschmann modificada pelo uso de uma camada de grafeno.

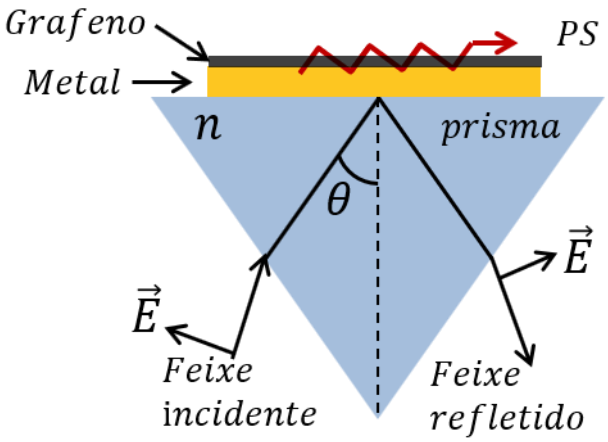

Figura 2.6 – Configuração de Kretschmann modificada com uma camada de grafeno.
Fonte: Elaborada pelo autor.

2.1.1.4 Ressonância de plasmons localizada

O crescente interesse pelo estudo de estruturas nanométricas e pela miniaturização de dispositivos sensores também se manifestou na ressonância de plasmons, levando ao desenvolvimento da LSPR (*Localized Surface Plasmon Resonance*). Nesta configuração, o filme metálico (contínuo) é substituído por uma camada de nanopartículas metálicas, com dimensões de algumas dezenas de nanometros, o que altera drasticamente o comportamento das ondas de plasmons quando comparadas ao que ocorre na configuração tradicional. Devido à quebra de simetria imposta pelo tamanho reduzido das nanopartículas metálicas, que possuem dimensões menores que o comprimento de penetração e propagação da onda e plasmons, o campo elétrico experimenta um confinamento muito mais acentuado (46). Esse comportamento está ilustrado na figura 2.7, onde uma simulação mostra o confinamento do campo na vizinhança de nanodiscos de ouro:

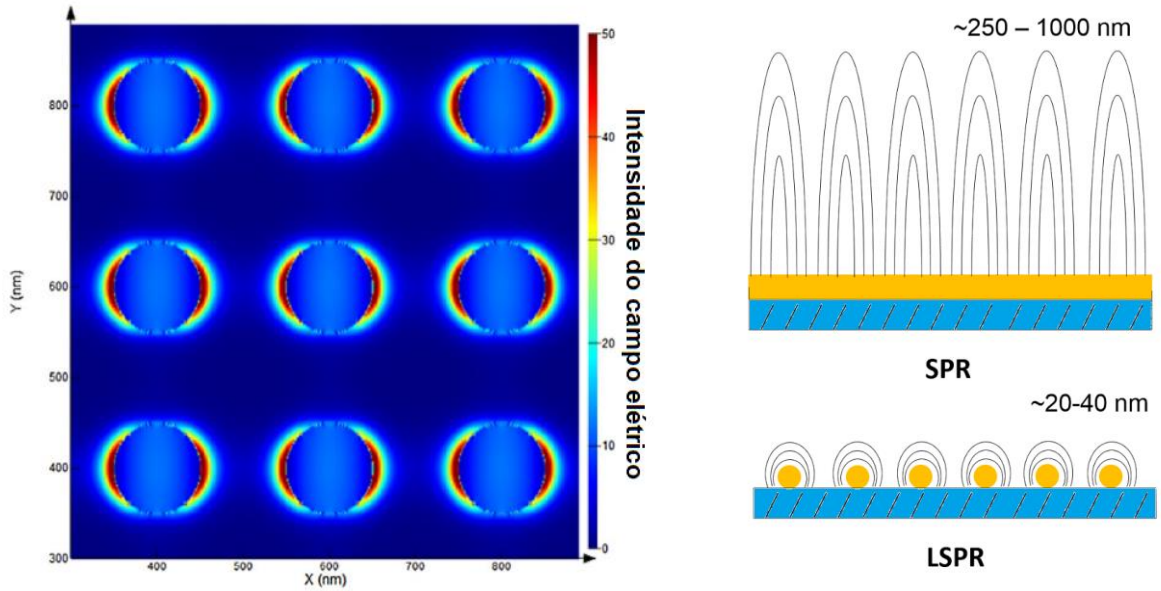

Figura 2.7 – (a) Confinamento do campo elétrico na vizinhança de nanopartículas de ouro e (b)comparação entre os campos evanescentes para SPR e LSPR.
Fonte: Adaptada de KHAN et al. (46)

Observe que o campo se concentra à distância de uma dezena de nanometros da fronteira das nanopartículas, o que reduz drasticamente a percepção espacial, reduzindo a influência de efeitos volumétricos da amostra e tornando os resultados muito mais fiéis aos eventos imediatamente próximos à camada de ligação.

A sensibilidade da ressonância dos plasmons localizados depende da composição, tamanho e forma das nanopartículas (47), que se apresentam comumente como esferas (48-49), discos (46,50) e bastões (51-52), e são empregados na geometria convencional (sobre lâminas de vidro) ou, de maneira mais interessante, na ponta de fibras ópticas garantindo extrema flexibilização quanto ao manejo da região de prova. (49,53)

3 Fundamentos teóricos

Nesta seção serão abordados aspectos teóricos fundamentais acerca da técnica utilizada para a medição do ângulo crítico. A abordagem teórica tem como objetivo esclarecer o comportamento observado na realização dos experimentos. Será definido o índice de refração de uma substância e, em seguida, iniciaremos a descrição mais simples do comportamento da luz ao atravessar interfaces planas, abordaremos os coeficientes de Fresnel e a interferência das duas componentes ortogonais do campo elétrico. Findada a explanação acerca dos fenômenos ópticos relevantes para o presente trabalho, serão abordados os fundamentos da dinâmica da interação entre duas espécies químicas e, por fim, como o índice de refração e a formação de produtos entre dois reagentes são conectadas para o desenvolvimento de uma técnica que permite o acompanhamento da evolução da interação entre essas substâncias.

3.1 ÂNGULO CRÍTICO

3.1.1 Índice de refração

Ao viajar por um meio dielétrico transparente, podemos, em uma abordagem simplificada, caracterizar a luz por meio de três grandezas: sua velocidade (v); sua frequência (ν) e seu comprimento de onda (λ). Essas grandezas estão relacionadas entre si, de tal sorte que se duas delas são conhecidas a terceira fica univocamente determinada de acordo com a seguinte relação:

$$v = \lambda\nu \tag{3.1}$$

A frequência da luz é um parâmetro fixo, definido no processo de geração da mesma, já a velocidade, e consequentemente o comprimento de onda, não. A velocidade da luz depende do meio onde ela se propaga e essa é máxima quando a luz se propaga no vácuo. Por ser uma constante universal, a velocidade da luz no vácuo é empregada como padrão de referência, de modo que representamos a velocidade da luz por meio da fração de sua velocidade no vácuo:

$$n = \frac{c}{v} \tag{3.2}$$

onde n, que é uma característica do meio que a luz atravessa, é chamado de índice de refração.

Discutiremos na próxima seção como o índice de refração se apresenta no tratamento geométrico do comportamento da luz, bem como algumas consequências da mudança na velocidade de propagação da luz ao atravessar uma interface que separa dois meios adjacentes.

3.1.2 Lei de Snell

No contexto da óptica geométrica, a trajetória da luz é descrita por meio de raios. Quando um raio viaja de um meio transparente para outro, o que observamos, em geral, é um desvio na direção de propagação desse raio incidente, fenômeno chamado de refração, devido à mudança na velocidade de propagação da luz ao atravessar a interface que separa esses dois meios. Em óptica, a relação matemática mais simples que relaciona o caminho percorrido pelo raio luminoso ao atravessar a fronteira entre dois meios é conhecida como Lei de Snell, ou Lei de Snell-Descartes, (devido ao astrônomo holandês Willebrord Snellius e ao filósofo, físico e matemático francês René Descartes). Para apresentá-la vamos considerar um raio incidente em uma interface separando dois meios semi-infinitos, que serão discriminados por meio 1, o de incidência, e meio 2 o de transmissão. A interface considerada é plana, mas o resultado é valido para superfícies curvas que admitam a existência de um plano tangente, bem definido, no ponto onde o raio incide. Para um raio incidente que forma um ângulo θ_1 com a reta normal à superfície, a direção da luz refratada é determinada pela Lei de Snell:

$$n_1 \sin\theta_1 = n_2 \sin\theta_2 \tag{3.3}$$

na qual θ_2 é o ângulo da direção de propagação da luz, formado pelo raio refratado com a normal à superfície, e $n_{1,2}$ o índice de refração do respectivo meio, conforme ilustrado na figura 3.1.

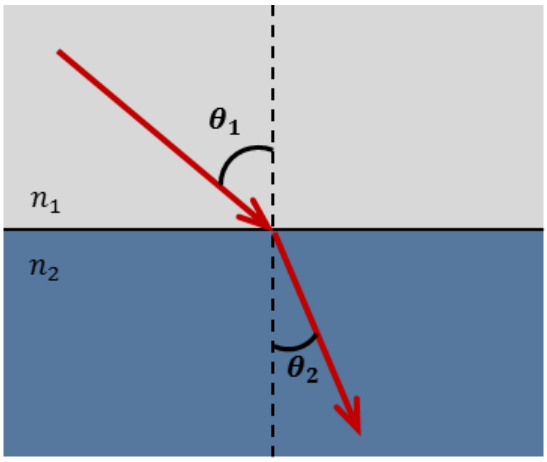

Figura 3.1 - Refração em uma interface plana.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na situação ilustrada acima, podem ocorrer apenas duas relações entre os índices de refração dos meios 1 e 2, considerados distintos a princípio. Podemos observar $n_2 > n_1$ ou $n_1 > n_2$. Na primeira delas a refração sempre ocorre, para qualquer ângulo de incidência, entretanto na segunda, um fenômeno particularmente interessante pode ocorrer, no qual a luz incidente é totalmente refletida para o meio 1 ao atingir a interface. Da equação 3.3, podemos escrever:

$$\frac{n_1}{n_2}\sin\theta_1 = \sin\theta_2 \tag{3.4}$$

Para valores de θ_2 pertencentes ao conjunto dos números reais, a função seno está definida no intervalo $0 \leq \sin\theta_2 \leq 1$. Como neste caso $n_1 > n_2$, pode ocorrer que o lado esquerdo da eq. (3.4), assuma valores maiores que a unidade e, com isso, não há refração. No valor limite no qual $\sin\theta_2$ assume valor unitário, temos:

$$\sin\theta_c = \frac{n_2}{n_1} \tag{3.5}$$

em que o ângulo de incidência para o qual a igualdade anterior é obtida é chamado *ângulo crítico*, representado doravante por θ_c. Acima do ângulo crítico temos o fenômeno da *reflexão total interna*, no qual a totalidade da luz incidente é refletida de volta para o meio de incidência. Para a incidência ocorrendo exatamente em θ_c, a

refração é de 90°, de acordo com a equação 3.4, e o feixe emerge paralelamente à interface entre os dois meios. As duas outras possibilidades, acima e abaixo do ângulo crítico, estão ilustradas na figura 3.2.

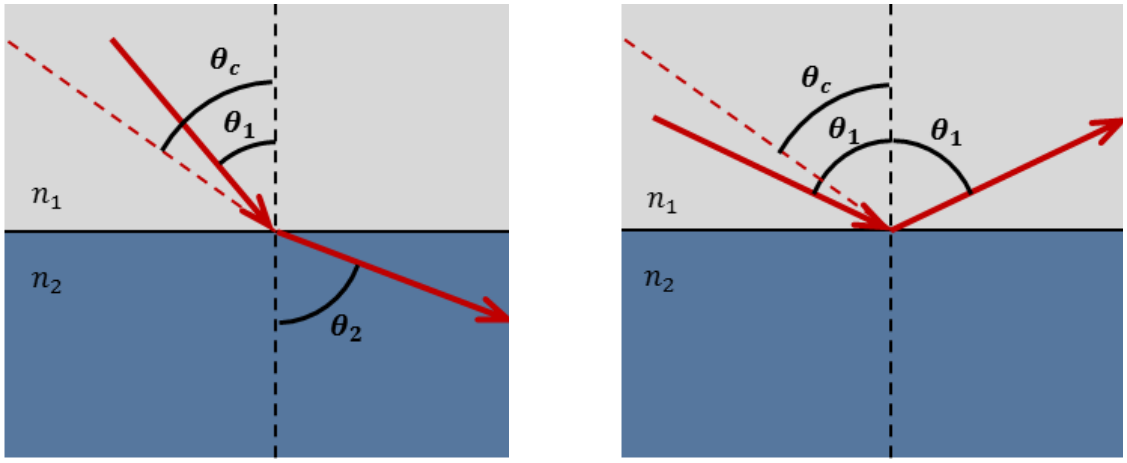

Figura 3.2 - Incidência (a) abaixo e (b) acima do ângulo crítico.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O ferramental matemático proposto por Snell permite uma descrição correta para o comportamento da luz quanto à trajetória de um feixe luminoso, representado pelo seu vetor de onda, quando atravessa uma interface, que seja uma curva suave, limitando dois meios lineares isotrópicos e homogêneos. Existem, no entanto, diversos parâmetros físicos que caracterizam um raio luminoso, como sua intensidade, por exemplo, bem como observações experimentais indicando que parcela da luz é refletida mesmo abaixo da condição de reflexão interna. Essas deficiências na lei de Snell são contempladas em uma teoria mais sofisticada, descrita a seguir.

3.1.3 Coeficientes de Fresnel e polarização da luz

O formalismo da óptica de raios, conforme descrito anteriormente, foi apresentado por volta do início do século XVII com seu desenvolvimento ocorrendo cerca de duzentos anos mais tarde. Somente no século XIX, com trabalhos como o de Augustin Jean Fresnel, que dentre outros tratou das parcelas de luz refletidas e refratadas em interfaces, James Clerk Maxwell, que mostrou que a luz é uma onda eletromagnética, a óptica ondulatória ressurgiu trazendo informações sobre estruturas da luz não contempladas na teoria corpuscular. Em particular, uma

propriedade de grande importância para este trabalho, que não é diretamente percebida pelo olho humano, foi descoberta nesse período, trata-se da polarização da luz. Os principais trabalhos acerca dessa propriedade se devem aos escoceses David Brewster e Willian Nicol, este último tendo criado um método para obter luz polarizada por demanda através do hoje conhecido prisma de Nicol. (54) Atualmente temos várias maneiras de obter luz polarizada e serão brevemente citadas adiante.

Em resumo, podemos dizer que o estado de polarização da luz é caracterizado pela forma geométrica descrita pelo vetor campo elétrico desta em um dado plano, ao longo do tempo, e pode se apresentar basicamente em 3 consições: não-polarizado, linearmente polarizado e elipticamente polarizado (consideramos aqui que a polarização circular é um caso particular da eliptica), que serão formulados matematicamente no decorrer desta seção.

Os trabalhos de Fresnel, citados anteriormente, nos levaram a obter expressões matemáticas descrevendo precisamente o comportamento de cada componente de polarização da luz ao atravessar uma interface, localmente plana, entre dois meios transparentes. Essas componentes de polarização são definidas de acordo com sua orientação em relação ao plano de incidência da luz nesta região de transição entre os dois meios e são referidas como TE (ou onda *s*) para a componente na qual o campo elétrico oscila perpendicularmente ao plano de incidência e TM (ou onda *p*) para o caso onde o campo elétrico oscila paralelamente ao plano de incidência. Consideremos, além disso, que cada uma dessas ondas eletromagnéticas apresentem frente de onda plana (solução particular das equações de Maxwell), sejam caracterizadas pelo seu vetor de onda $\vec{k}$ e frequência angular ω e incidam sobre uma interface, localmente plana, entre dois meios transparentes que apresentam índices de refração n_1, para o meio de incidência, e n_2, para o meio de transmissão, bem como as ondas refletida e transmitida associadas a elas. Deste pondo em diante os índices "i", "r" e "t" serão utilizados para discriminar as grandezas que se referem, respectivamente, aos campos incidente, refletido e transmitido. A geometria associada às duas polarizações possíveis está representada na figura 4.3.

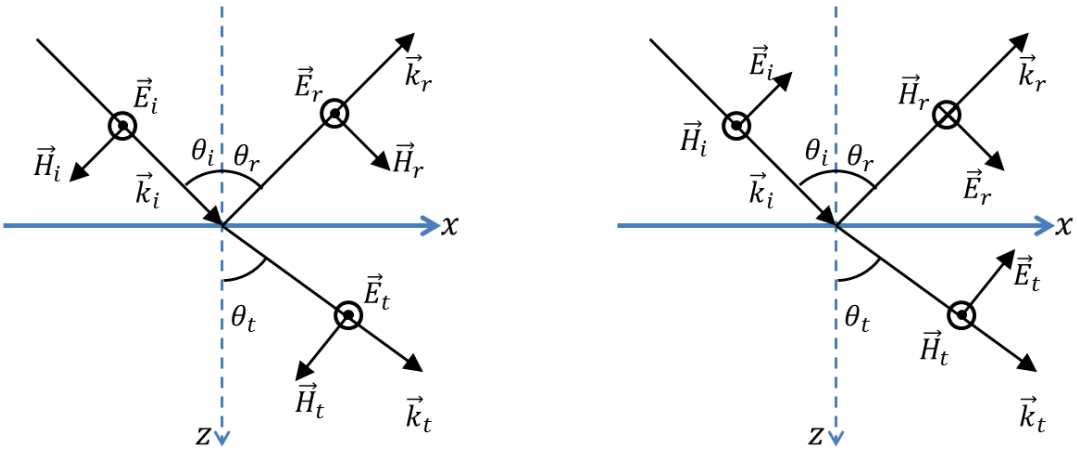

Figura 3.3 - Onda incidente com polarização (a) s e (b) p com suas respectivas ondas transmitida e refletida.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na aproximação de ondas planas, e considerando meios não-magnéticos, podemos obter as seguintes relações entre os campos elétrico e magnético da luz, independentemente de seu estado de polarização:

$$\overrightarrow{H_i} = \frac{1}{\mu_0 \omega} \overrightarrow{k_i} \times \overrightarrow{E_i} \tag{3.6}$$

$$\overrightarrow{H_r} = \frac{1}{\mu_0 \omega} \overrightarrow{k_r} \times \overrightarrow{E_r} \tag{3.7}$$

$$\overrightarrow{H_t} = \frac{1}{\mu_0 \omega} \overrightarrow{k_t} \times \overrightarrow{E_t} \tag{3.8}$$

em que, $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7}\ H/m$. Por tratarmos de sistemas não-magnéticos, aproximamos a permeabilidade magnética dos dois meios pelo seu valor no vácuo.

A natureza vetorial dos campos eletromagnéticos impõem condições de contorno aos mesmos em regiões de fronteira entre meios adjacentes. Para os campos $\vec{E}$ e $\vec{H}$ devemos impor que suas componentes tangenciais à interface sejam contínuas ao cruzarmos a fronteira que limita os dois dielétricos. Com o auxílio da geometria apresentada na figura 3.3 (a) obtemos para a polarização *s* uma relação para o campo elétrico tangencial à interface:

$$E_i + E_r = E_t \tag{3.9}$$

aplicando as relações (3.6) a (3.8) para o campo magnético e considerando a decomposição do vetor $\vec{H}$ ao longo do eixo horizontal obtemos:

$$-\mathrm{H_i}\cos\theta_i + \mathrm{H_r}\cos\theta_i = -\mathrm{H_t}\cos\theta_t \tag{3.10}$$

$$-k_i E_i \cos\theta_i + k_r E_r \cos\theta_i = -k_t E_t \cos\theta_t \tag{3.11}$$

Da mesma forma, a polarização *p* nos leva às seguintes equações para continuidade dos campos:

$$k_i E_i + k_r E_r = k_t E_t \tag{3.12}$$

$$E_i \cos\theta_i + E_r \cos\theta_i = E_t \cos\theta_t \tag{3.13}$$

na qual adotamos a seguinte notação para os módulos dos vetores: $E = |\vec{E}|$, $H = |\vec{H}|$ e $k = |\vec{k}|$.

De posse das relações (3.9) à (3.13), definimos os coeficientes de reflexão como a razão entre as amplitudes dos campos elétricos incidente e refletido, para cada estado de polarização, de acordo com:

$$r_s = \left[\frac{E_r}{E_i}\right]_s = \frac{\cos\theta_i - n\cos\theta_t}{\cos\theta_i + n\cos\theta_t} \tag{3.14}$$

$$r_p = \left[\frac{E_r}{E_i}\right]_p = \frac{-n\cos\theta_i + \cos\theta_t}{n\cos\theta_i + \cos\theta_t} \tag{3.15}$$

onde definimos $n = n_2/n_1$ como o índice de refração relativo e $n_m = c\,k_m/\omega$ como o índice de refração absoluto do *m*-ésimo meio.

De maneira análoga, os coeficientes de transmissão podem ser definidos a partir das amplitudes refratadas:

$$t_s = \left[\frac{E_t}{E_i}\right]_s = \frac{2\cos\theta_i}{\cos\theta_i + n\cos\theta_t} \tag{3.16}$$

$$t_p = \left[\frac{E_t}{E_i}\right]_p = \frac{2\cos\theta_i}{n\cos\theta_i + \cos\theta_t} \tag{3.17}$$

Uma representação mais conveniente dos coeficientes pode ser obtida eliminando sua dependência explicita com o ângulo de refração. Aplicando a Lei de Snell-Descartes nas eq. (3.14) e (3.15), obtemos uma configuração que facilitará a análise posterior:

$$r_s = \frac{cos\theta_i - \sqrt{n^2 - sen^2\theta_i}}{cos\theta_i + \sqrt{n^2 - sen^2\theta_i}} \tag{3.18}$$

$$r_p = \frac{-n^2 cos\theta_i + \sqrt{n^2 - sen^2\theta_i}}{n^2 cos\theta_i + \sqrt{n^2 - sen^2\theta_i}} \tag{3.19}$$

Nas figuras 3.4 (a) e (b) estão ilustrados os comportamentos das funções eq. (3.18) e (3.19) para uma interface vidro/água, onde notadamente é possível observar a diferença na fração refletida por cada componente de polarização. Às razões definidas nas eq. (3.14) à (3.17) são conhecidas como coeficientes de Fresnel.

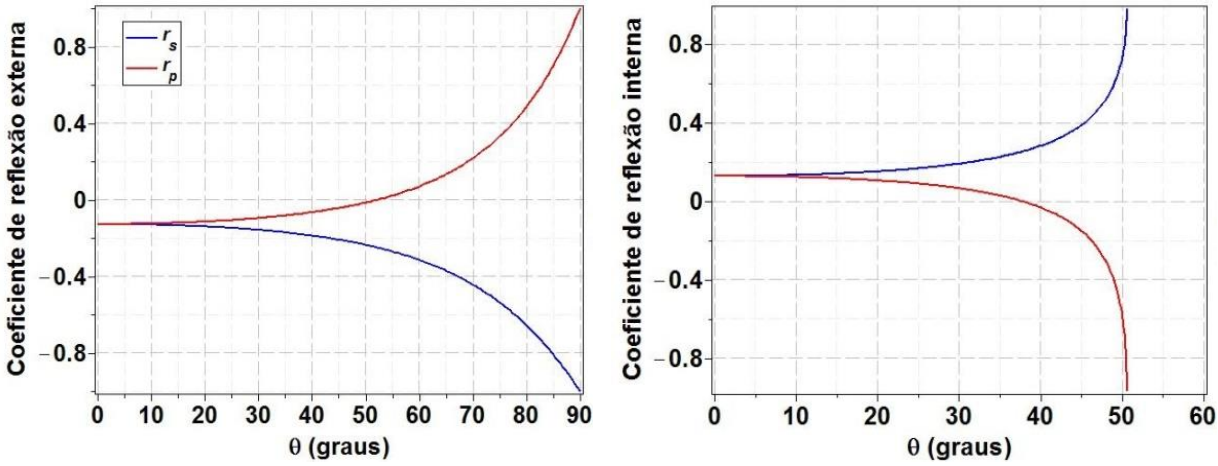

Figura 3.4 - Coeficientes de reflexão externa e interna para uma interface SF10/água.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir desta figura, estão definidas a reflexão externa, como aquela que ocorre quando a luz atravessa do meio com menor índice de refração para um meio com maior índice de refração; e a reflexão interna, que ocorre na condição oposta.

Como citado anteriormente, a Lei de Snell prevê a existência da reflexão total interna para $\sin\theta_c = n$. Substituindo a eq. (3.5) nas eq. (3.18) e (3.19) obtemos:

$$r_s = \frac{cos\theta_i - \sqrt{n^2 - n^2}}{cos\theta_i + \sqrt{n^2 - n^2}} = 1 \tag{3.20}$$

$$r_p = \frac{-n^2 cos\theta_i + \sqrt{n^2 - n^2}}{n^2 cos\theta_i + \sqrt{n^2 - n^2}} = -1 \tag{3.21}$$

O sinal negativo em r_s ocorre acima do chamado ângulo Brewster, a partir do qual a onda *p* ganha uma fase de π. (55)

É importante observar que, apesar de ser totalmente refletida para $\theta > \theta_C$, a luz penetra no meio de menor densidade óptica, conforme é demonstrado a seguir. Seja o campo transmitido em uma interface dado por:

$$E_t = E_{0t} \exp\left[j\left(\overrightarrow{k_t} \cdot \vec{r} - \omega t\right)\right] \tag{3.22}$$

onde $j = \sqrt{-1}$, é a unidade imaginária. Da figura 3.3 podemos escrever:

$$E_t = \exp\left[j\left(xk_0 n_1 \sin\theta_i + zk_0 n_1\sqrt{n^2 - \sin^2\theta_i} - \omega t\right)\right] \tag{3.23}$$

na qual k_0 é o vetor de onda no vácuo e tomamos $E_{0t} = 1$ por simplicidade. Como acima do ângulo crítico $\sin\theta_i > n$ o radical presente no argumento da exponencial acima é um número imaginário puro, dessa forma temos:

$$E_t = \exp\left[j\left(xk_0 n_1 \sin\theta_i + zk_0 n_1 j\sqrt{\sin^2\theta - n^2} - \omega t\right)\right] \tag{3.24}$$

que pode ser reescrito como:

$$E_t = \exp(-\alpha z)\,\exp[j(xk_0 n_1 \sin\theta_i - \omega t)] \tag{3.25}$$

em que definimos $\alpha = k_0 n_1\sqrt{\sin^2\theta_i - n^2}$. O comportamento deste campo é ilustrado na figura abaixo para dois ângulos de incidência distintos, na condição de reflexão total interna. A incidência ocorre na região $y < 0$ e a interface é o plano $y = 0$.

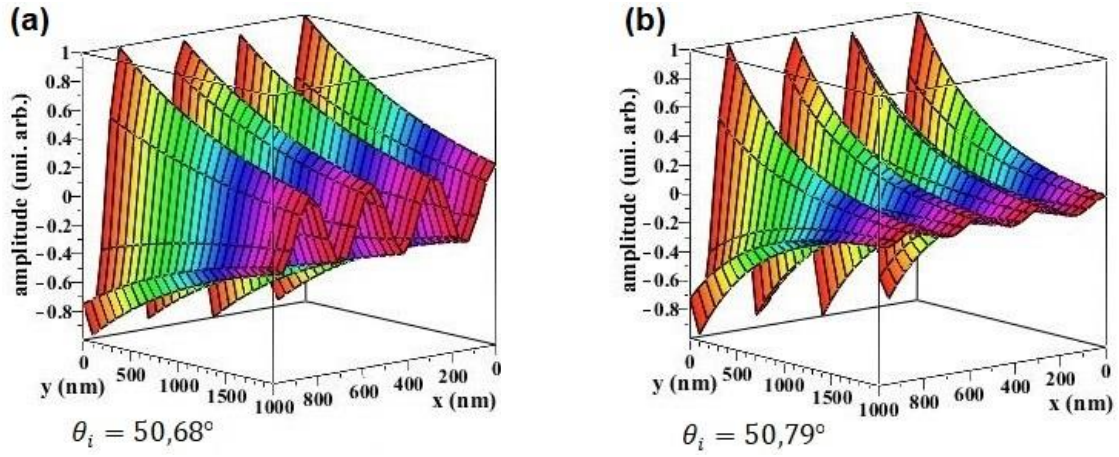

Figura 3.5 – Campo evanescente na interface SF10/água para (a) $\theta_i = 50{,}68°$ e (b) $\theta_i = 50{,}79°$.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Vale notar que uma onda oscilante se propaga na direção paralela à interface, no entanto, na direção perpendicular o campo decai exponencialmente com o fator α. A distância de penetração depende do comprimento de onda da luz e muda rapidamente à medida que nos afastamos do ângulo crítico, conforme ilustrado na figura 3.6, para luz vermelha $(\lambda = 633\ nm)$ incidindo em uma interface SF10/água.

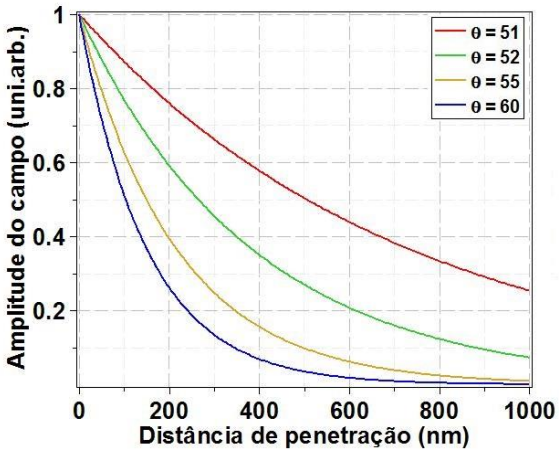

Figura 3.6 – Distância de penetração do campo evanescente para uma interface SF10/água acima do ângulo crítico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A existência desse campo evanescente é essencial para as técnicas baseadas no ângulo crítico, pois, esse atua como "ponta de prova" ao interagir com as amostras. É importante notar que os fenômenos observados ocorrem em distâncias da ordem do comprimento de onda da luz utilizada, onde se concentra a maior parte da amplitude do campo evanescente.

Acima do ângulo crítico os coeficientes de Fresnel podem ser representados em notação complexa polar, conforme segue:

$$r_s = \frac{cos\theta_i - j\sqrt{sen^2\theta_i - n^2}}{cos\theta_i + j\sqrt{sen^2\theta_i - n^2}} = \frac{ae^{-j\alpha}}{ae^{j\alpha}} = e^{-j\delta_s} \tag{3.26}$$

$$r_p = \frac{-n^2 cos\theta_i + j\sqrt{sen^2\theta_i - n^2}}{n^2 cos\theta_i + j\sqrt{sen^2\theta_i - n^2}} = -\frac{be^{-j\beta}}{be^{j\beta}} = -e^{-j\delta_p} \tag{3.27}$$

em que $\delta_s = 2\alpha = Arg[r_s]$, $\delta_p = 2\beta = Arg[r_p]$, $a = \left|cos\theta - j\sqrt{sen^2\theta - n^2}\right|$ e $b = \left|-n^2 cos\theta_i + j\sqrt{sen^2\theta - n^2}\right|$.

As equações (3.26) e (3.27) nos permitem obter uma relação para a diferença de fase entre as ondas *s* e *p* como segue:

$$\delta = 2\tan^{-1}\left(\frac{\cos\theta\sqrt{\sin^2\theta - n^2}}{\sin^2\theta}\right) \tag{3.28}$$

com $\delta = \delta_s - \delta_p$. A figura 3.7 (a) mostra a diferença de fase δ como função do ângulo de incidência para a reflexão total interna em uma interface vidro (SF10) ($n_1 = 1{,}7213$) /água ($n_2 = 1{,}3328$), cujo ângulo crítico é $\theta_c = 50{,}62°$, a partir do ângulo de Brewster ($\theta_B = 37{,}70°$); já na figura 3.7 (b) temos a diferença de fase a partir do ângulo crítico para alguns valores de n.

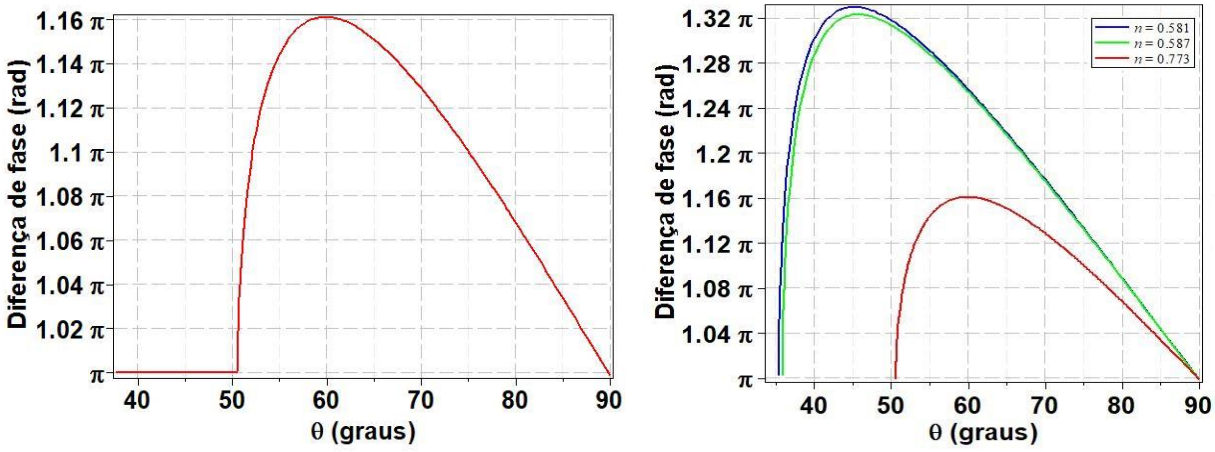

Figura 3.7 - Diferença de fase entre as componentes *s* e *p* (a) a partir do ângulo de Brewster para $n = 0{,}774$ e (b) acima do ângulo crítico para alguns valores de n.
Fonte: Elaborada pelo autor.

É interessante observar que existe uma expressão analítica para a máxima diferença de fase entre as componentes *s* e *p* e pode ser obtido diretamente da eq. (3.8), sua expressão matemática é:

$$\delta_{max} = 2\tan^{-1}\left(\frac{1-n^2}{2n}\right) \tag{3.29}$$

O comportamento de δ_{max} em função de n é ilustrado na figura 3.8

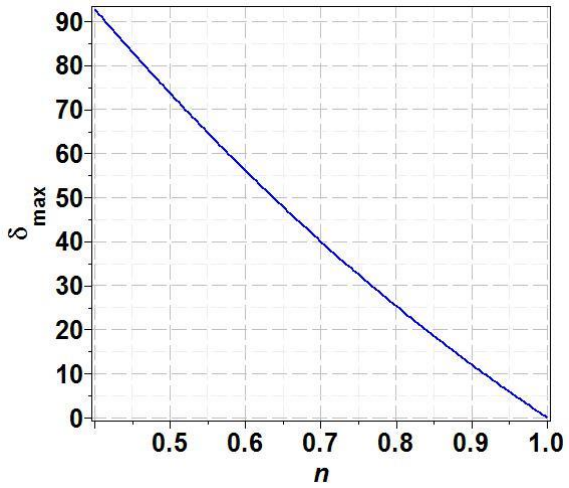

Figura 3.8 – Máxima diferença de fase na reflexão interna em função do índice de refração relativo.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Note que o máximo global da defasagem depende apenas do índice de refração relativo e que, devido a esta propriedade, é possível obter polarizadores por reflexão, tais como o Romboedro de Fresnel.

3.1.4 Interferência entre as componentes ortogonais de uma onda eletromagnética

Até este ponto foram discutidos aspectos gerais da teoria que descreve o comportamento da luz sujeita ao fenômeno da reflexão, tanto sob o ponto de vista geométrico quanto pelo da teoria ondulatória. Vamos agora discutir como empregamos essas propriedades para realizar medições diferenciais do índice de refração, expressas, neste trabalho, em termos da dinâmica de interação entre duas espécies químicas.

Considere um feixe de luz monocromática polarizada a $45°$ com relação à normal ao plano de incidência, desse modo, ambas as suas componentes possuem a mesma amplitude e a mesma fase. Esse feixe incide sobre uma interface plana entre dois meios dielétricos transparentes lineares, isotrópicos e homogêneos. Nessa situação, conforme discutido, toda a informação sobre as amplitudes e fases das componentes dessa onda estão contidos nos coeficientes de Fresnel, por isso, vamos tomar os campos refletidos como:

$$\overrightarrow{E_p} = \overrightarrow{E_{0p}}|r_p|e^{i\varphi_p} \tag{3.30}$$

$$\overrightarrow{E_s} = \overrightarrow{E_{0s}}|r_s|e^{i\varphi_s} \tag{3.31}$$

onde $\left|\overrightarrow{E_{0s}}\right| = \left|\overrightarrow{E_{op}}\right| = E_0/\sqrt{2}$.

Vamos agora projetar essas ondas numa direção tal que as componentes de $\overrightarrow{E_{0s}}$ e $\overrightarrow{E_{0p}}$ nessa direção tenham a mesma amplitude, ou seja, vamos projetá-las a $45°$ com a normal ao plano de incidência (a mesma direção do campo antes de ser refletido). A amplitude do campo resultante fica:

$$E = \frac{E_0}{2}\left(\left|r_p\right|e^{i\varphi_p} + |r_s|e^{i\varphi_s}\right) \tag{3.32}$$

aqui foi desprezado o caráter vetorial do campo elétrico, pois, o mesmo está sobre uma única direção.

Com isso, a intensidade do campo resultante é dada por:

$$I = I_0\left(\left|r_p\right|^2 + |r_s|^2 + 2\left|r_p\right||r_s|\cos\varphi\right) \tag{3.33}$$

sendo

$$\varphi = \varphi_s - \varphi_p = \begin{cases} 0 & \text{caso } \theta \leq \theta_B \\ \pi & \text{caso } \theta_B < \theta < \theta_c \\ \pi + \delta & \text{caso } \theta \geq \theta_c \end{cases} \tag{3.34}$$

em que δ é dado pela eq. (3.28).

Na figura 3.9, representamos o comportamento completo do ponto de vista da refletividade, diferença de fase e do perfil de intensidade para todos os possíveis ângulos de incidência com o intuito de facilitar a visualização desses três objetos ao longo de todo o intervalo angular, com particular destaque para o ângulo crítico. Os dados se referem à uma interface SF10/água.

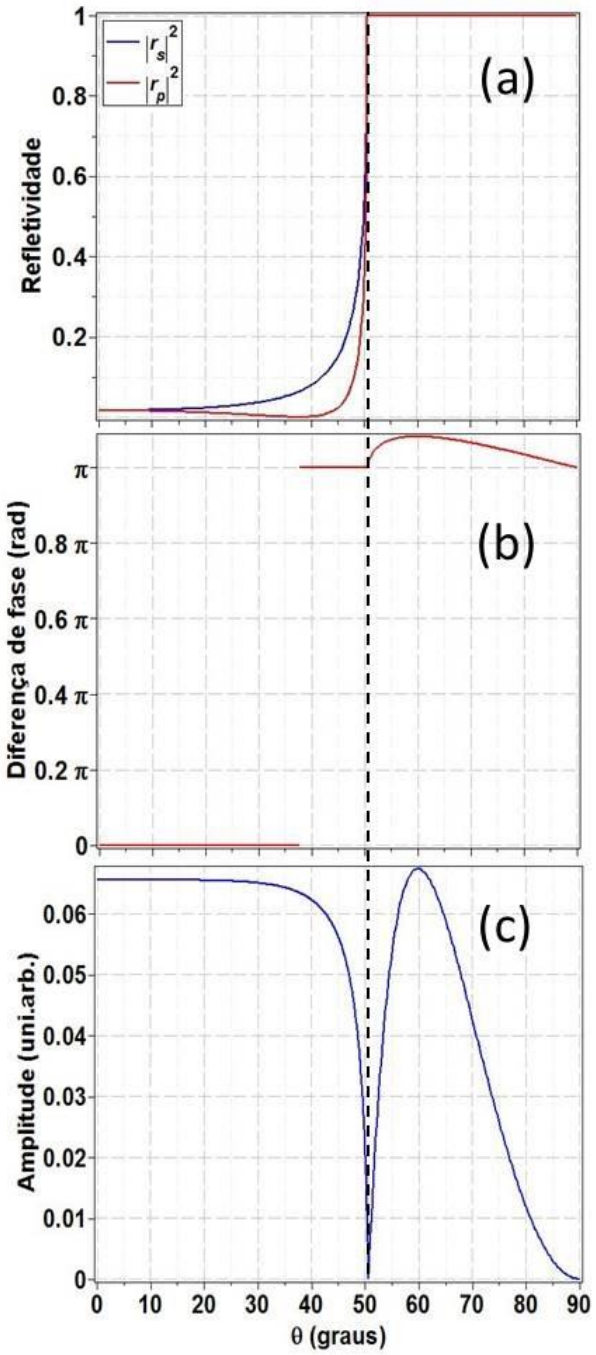

Figura 3.9 – (a) A refletividade para as componentes *s* e *p*, (b) a diferença de fase e (c) o perfil de intensidade resultante da interferência dessas duas ondas para todo o intervalo angular. A linha tracejada é um guia para os olhos.
Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível notar que a amplitude do perfil de interferência vai a zero exatamente na posição angular correspondente ao ângulo crítico, isso ocorre, pois, na situação limite onde a incidência ocorre em θ_c as componentes *s* e *p* refletidas internamente possuem a mesma amplitude mas defasadas de π, interferindo destrutivamente entre si. A partir de θ_c, a diferença de fase adicional produzida pela

reflexão total interna faz com que a intensidade a interferência não seja totalmente destrutiva, mesmo que ambas as componentes ainda possuam a mesma amplitude. Apresentamos na figura 3.10 como a posição do ângulo crítico, para uma interface SF10/amostra, varia à medida que o índice de refração da amostra é alterado de $n_2 = 1{,}3320$ até $n_2 = 1{,}3388$ em passos de $\Delta n_2 = 0{,}0017$.

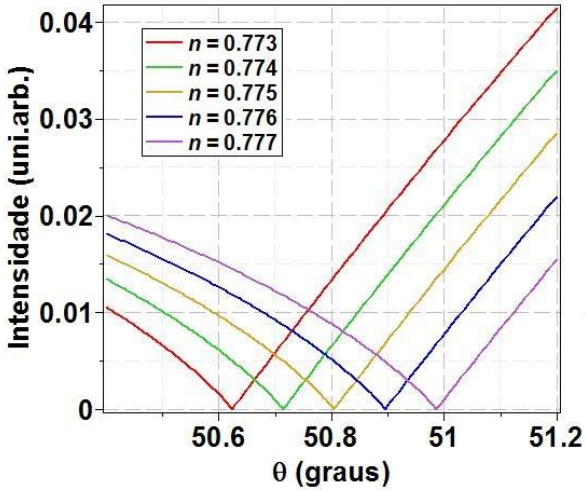

Figura 3.10 - Perfil de intensidade na vizinhança do ângulo crítico para alguns valores de IR do substrato.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir da figura anterior, é possível notar que a posição do mínimo se desloca seguindo uma tendência linear, para essas pequenas variações do índice de refração do substrato. De fato é possível demonstrar que $d\theta_c \propto dn_2$ a partir da lei de Snell-Descartes, como segue:

$$\sin\theta_1 = \frac{n_2}{n_1}\sin\theta_2 \tag{3.35}$$

Tomando a diferencial de ambos os membros da eq. (3.35), temos:

$$\cos\theta_1\,\mathrm{d}\theta_1 = \frac{dn_2}{n_1}\sin\theta_2 \tag{3.36}$$

Tomando $\theta_1 = \theta_c$, a eq. (3.36) se reduz a:

$$d\theta_c = \frac{1}{n_1\cos\theta_c}dn_2 \tag{3.37}$$

Esta relação linear entre variações na posição angular do mínimo do perfil de intensidade e o índice de refração é extremamente interessante, pois, facilita a leitura de uma medida refratométrica. Um nicho de aplicação para uma técnica refratométrica baseada no ângulo crítico e proposta a seguir, onde o objeto de análise é a reação entre um par de espécies químicas.

3.2 DINÂMICA DE INTERAÇÕES QUÍMICAS

Estudos cinéticos são realizados, em geral, em duas etapas sequenciais: associação e dissociação. Na etapa de associação, um analito, A, é posto em contato com um ligante, comumente imobilizado em uma superfície, B, formando um complexo AB. Na etapa seguinte, somente uma solução tampão interagem com o complexo AB quebrando a ligação química e regenerando o sistema. A regeneração do sistema não ocorre para qualquer par A/B, mas como neste trabalho todas as interações são do tipo anticorpo-antígeno, essa situação é válida. Para a análise realizada a seguir, são consideradas somente interações que são, ou que possam ser tomadas, como de primeira ordem.

Considere um sistema composto por uma molécula B, imobilizada em uma superfície, e uma segunda espécie química A, que interage especificamente com B, em solução. A reação de associação destas duas espécies é representada pela equação de equilíbrio: (56)

$$A + B \rightleftarrows AB \tag{3.38}$$

e tem constante de associação k_a e de dissociação k_d. A constante de equilíbrio para esta reação é definida por $K_A = k_a/k_d$. Da equação acima, e de posse das constantes de ligação e dissociação, podemos escrever a seguinte equação de taxa:

$$\frac{d[AB]}{dt} = \mathrm{k_a[A][B] - k_d[AB]} \tag{3.39}$$

em que $[AB]$, $[A]$ e $[B]$ representam as concentrações do complexo AB, do analito A e do ligante B respectivamente. As informações relevantes para a compreensão

da interação química representada pela eq. (3.38) se resumem à determinação de k_a e k_b, que podem ser obtidos através da solução da equação de taxa (3.39). Para resolvê-la, vamos considerar uma condição onde a concentração de A é mantida constante, o que pode ser realizado mantendo um fluxo constante de solução na superfície contendo B. Desse modo, $[A] = [A]_0$, e podemos escrever:

$$[B]_0 = [B] + [AB] \tag{3.40}$$

em que $[B]_0$ é a concentração total de B na superfície de imobilização e $[B]$ é a concentração de B não ligado ao analito. Resolvendo a equação (3.40) para $[AB]$, temos:

$$[AB] = [B]_0 - [B] \tag{3.41}$$

que na equação de taxa (3.39) leva a:

$$\frac{d([B]_0 - [B])}{dt} = k_a[A][B] - k_d([B]_0 - [B]) \tag{3.42}$$

Simplificando a expressão anterior, podemos chegar à equação de taxa em função da concentração de sítios livres:

$$-\frac{d[B]}{dt} = (k_a[A]_0 + k_d)[B] - k_d[B]_0 \tag{3.43}$$

A partir deste ponto, faremos algumas colocações, de ordem particular dos pares químicos estudados nesse trabalho. Como veremos adiante, escolhemos pares de ligantes específicos que possuem alta afinidade química, o que, matematicamente, pode ser traduzido como $k_d \ll k_a$. Dessa forma, o último termo da eq. (3.43) pode ser desprezado e teremos:

$$-\frac{d[B]}{dt} = k_{obs}[B] \tag{3.44}$$

onde as constantes que acompanham $[B]$ foram comprimidas em uma única constante, que entenderemos como uma taxa efetiva de primeira ordem, dada por $k_{obs} = (k_a[A]_0 + k_d)$. Essa última equação de taxa com coeficiente constante pode facilmente ser integrada e o resultado nos dá o decaimento de primeira ordem da concentração do ligante, B:

$$[B] = [B]_0 e^{-k_{obs}t} \tag{3.45}$$

Substituindo na eq. (3.41) obtemos uma expressão para o crescimento da concentração do produto da reação:

$$[AB] = [B]_0(1 - e^{-k_{obs}t}) \tag{3.46}$$

Resta agora analisar a etapa de dissociação, que segue um processo análogo, e, lembrando que se trata de uma etapa onde apenas a solução tampão flui ao longo da superfície onde agora temos o complexo AB, podemos escrever a sua respectiva equação de taxa como:

$$\frac{d[AB]}{dt} = -k_d[AB] \tag{3.47}$$

que, novamente, se trata de um processo simples de primeira ordem, cuja solução leva ao seguinte decaimento exponencial:

$$[AB] = [AB]_0 e^{-k_d t} \tag{3.48}$$

onde $[AB]_0$ é a concentração do produto da reação ao final da etapa de associação.

Maiores detalhes sobre os procedimentos adotados para determinar a constante de equilíbrio, $K_A = k_a/k_d$, são fornecidos na seção de resultados. Passarei agora aos detalhes da conexão entre a dinâmica química e o ângulo crítico, cujo método de obtenção foi descrito anteriormente neste mesmo capítulo.

Considere que o ligante B foi imobilizado na superfície de um vidro com índice de refração conhecido e uma solução de A, com concentração constante,

preenchendo o meio adjacente ao vidro. Caso a camada de B seja suficientemente espessa, à medida que ocorre a formação do complexo AB o índice de refração percebido por um campo evanescente que interage nessa interface muda de tal sorte que $\Delta n \propto \Delta[AB]$ e assim podemos reescrever a eq. (3.46) como:

$$n = n_0(1 - e^{-k_{obs}\,t}) \tag{3.49}$$

desse modo, uma técnica refratométrica capaz de realizar medições dinâmicas é capaz de obter toda a evolução da reação descrita anteriormente.

A seguir discutiremos o arranjo experimental necessário para tirar vantagem das propriedades apresentadas nessa seção para a realização de medições da dinâmica de reações químicas empregando refratometria baseada no ângulo crítico da reflexão interna.

4 SEÇÃO EXPERIMENTAL

Apresentarei nesta seção os materiais utilizados e a metodologia experimental empregados nas diversas séries de medições realizadas com o objetivo de avaliar a dinâmica de interação química entre pares de espécies químicas. Esses pares, bem como as razões para sua utilização, são explicitados ao longo deste capítulo, juntamente com os protocolos seguidos na produção das camadas de imobilização e da fase de contato. Explico como a interferência entre as duas componentes ortogonais de um único campo eletromagnético é obtida experimentalmente e, ao final, como os dados são obtidos em tempo real.

4.1 MÉTODO EXPERIMENTAL

Conforme discutido no capítulo anterior, devido à diferença de fase adquirida pelas ondas *s* e *p* do campo elétrico da luz, quando sujeito ao fenômeno da reflexão interna, é possível gerar um padrão de interferência com um mínimo de intensidade na posição correspondente ao ângulo crítico. Para que tal efeito possa ocorrer, é necessário projetar as componentes de polarização ortogonais sobre uma direção tal que a interferência seja possível, pois, como é sabido (57-58), campos ortogonais não interferem entre si, com efeito, basta notar que o produto escalar entre dois vetores ortogonais é sempre nulo. Na prática, isso é realizável com um polarizador posicionado na saída da lente, pois, a existência de um eixo de transmissão preferencial, faz com que este atue como um projetor, permitindo que as componentes paralela e perpendicular sejam somadas, fazendo com que, na posição angular referente ao ângulo crítico, exista um mínimo de intensidade, que apresenta amplitude nula caso a luz incidente seja previamente polarizada em 45 °.

Nas medições foram utilizadas lentes semicilíndricas fabricadas com vidro denso tipo *flint*, mais especificamente o SF10 adquirido da Schott (59), que possui índice de refração $n_g = 1{,}7231$, para $\lambda = 632{,}8\,nm$, que corresponde ao comprimento de onda do laser de He-Ne, utilizado como fonte de luz em todos os resultados apresentados neste trabalho. Uma vez que o laser emite um feixe de luz colimado, se faz necessário um elemento focalizador, de modo a produzir uma gama de ângulos de incidência, razão pela qual são empregadas lentes com a geometria

citada anteriormente. Com isso, o posicionamento do laser na face de entrada é escolhido de tal sorte que o ângulo crítico da reflexão interna pertença a esse intervalo, permitindo o monitoramento da posição do mesmo que, conforme descrito na seção anterior, se apresenta como uma faixa escura no perfil de intensidade produzido após a reflexão interna na interface lente/amostra. Outro detalhe a ser notado é a escolha do vidro, pois, quanto maior o índice de refração da lente, maior a variedade de amostras que podem ser analisadas, visto que o índice de refração da lente deve ser maior que o da substância analisada para que o ângulo crítico ocorra.

Com os mecanismos necessários para gerar o padrão de interferência, a realização das medições de dinâmica química se segue a partir da produção dos filmes de anticorpos e das soluções contendo antígenos específicos, passando pela aquisição e análise de dados conforme descrito a seguir.

4.2 PRODUÇÃO DAS CAMADAS DE IMOBILIZAÇÃO

Nos estudos da dinâmica química, as amostras analisadas consistiam de um filme composto por um anticorpo, ao qual chamamos camada de imobilização, e por uma solução contendo o antígeno específico, denominada fase de contato.

As fases de contato utilizadas consistiram de soluções individuais de BSA (*Bovine Serum Albumine*) diluido, em algumas concentrações distintas, em PBS (*Phosphate-buffered saline*). O PBS é uma solução que simula o PH e as condições de salinidade das células humanas (isotônica), sendo, por essa razão, utilizado para solubilizar os antígenos componentes da fase de contato em ensaios de imunologia.

A BSA é uma proteína monomérica, globular, relativamente pequena, com peso molecular de aproximadamente 66,5 kDa. Possuindo boa solubilidade em água e alta estabilidade, responde por aproximadamente 60 % do volume proteico do plasma sanguíneo. Devido a esta alta estabilidade em solução, é comumente empregada como estabilizador para outras proteínas. Essas características, sua abundância e estabilidade, fazem da BSA um importante veículo para a distribuição de drogas via corrente sanguínea, portanto, conhecimento sobre sua imobilização e imunorreação é de fundamental importância na validação de qualquer, em particular deste apresentado no presente trabalho, ensaio de afinidade química.(48)

Para a fase de contato contendo BSA, foram produzidas camadas de imobilização com o anti-BSA, anticorpo específico da BSA. Para verificar que os dados obtidos são decorrentes da interação entre o antígeno e seu anticorpo específico, eliminando assim a possibilidade de sinais errôneos produzidos por outros ligantes, realizamos um teste com um segundo anticorpo, conforme apresentado ao longo deste capítulo.

Em um primeiro momento, foram produzidos filmes em monocamadas automontadas seguindo um protocolo semelhante ao proposto em. (60) Todos os reagentes empregados no procedimento descrito a seguir têm graduação analítica e foram adquiridos do catálogo SIGMA-ALDRICH. (61) Os procedimentos foram realizados junto ao Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano), dirigido pelo Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, com a colaboração e supervisão da Dra. Juliana Cancino Bernardi e Dr. Nirton Cristi seguindo as seguintes etapas:

i) Limpeza: As lentes são higienizadas com etanol para a retirada de resíduos inorgânicos passíveis de remoção por abrasão. Posteriormente, as mesmas são colocadas em um banho de permanganato de potássio por pelo menos 12h e, em seguida, em uma solução de peróxido de hidrogênio por um intervalo de 2h, garantindo então a remoção dos resíduos orgânicos. As lentes são lavadas com água deionizada para a retirada do H_2O_2 e tem início a etapa de silanização.

ii) Silanização: O preparo da superfície plana das lentes para que estas recebam a camada de anti-BSA passa por um processo de silanização. Os silanos se ligam covalentemente ao vidro (lente) e permitem a produção de filmes que não são facilmente removidos, com efeito, para produção de novos filmes a limpeza da camada de silanos é realizada por meio de abrasão com óxido de cério em uma base de piche. Nesta etapa utilizamos o 3-aminopropiltrietoxilano (APTES), cuja fórmula molecular é apresentada na figura 4.1, em solução alcoólica, com concentração de 20% em volume, em etanol, que foi gotejada sobre a face plana das lentes e deixada em repouso por 20 minutos. O excesso é removido em dois banhos de etanol, um banho de água deionizada e finalmente um banho em PBS, nessa ordem, permitindo então a deposição de uma camada de ligantes.

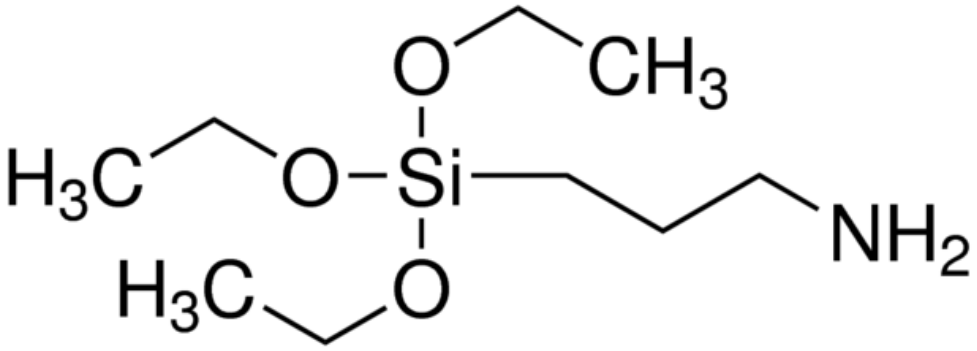

Figura 4.1 – Fórmula molecular do APTES.
Fonte: MERCK. (61)

iii) Camada de ligantes: Esta camada atua como uma ponte entre o APTS e o anti-BSA. O ligante utilizado, com estrutura molecular ilustrada na figura 4.2, o glutaraldeído (GA) em solução aquosa, de 2,5% em volume, é gotejado sobre o filme de APTS, permanecendo em contato com este por 30 minutos. Ao final desse período, o excesso de GA é removido em um banho em água deionizada e outro em PBS. Nesta etapa o GA se liga em uma de suas extremidades ao filme de APTS, ficando com o outro extremo livre para se ligar ao anti-BSA.

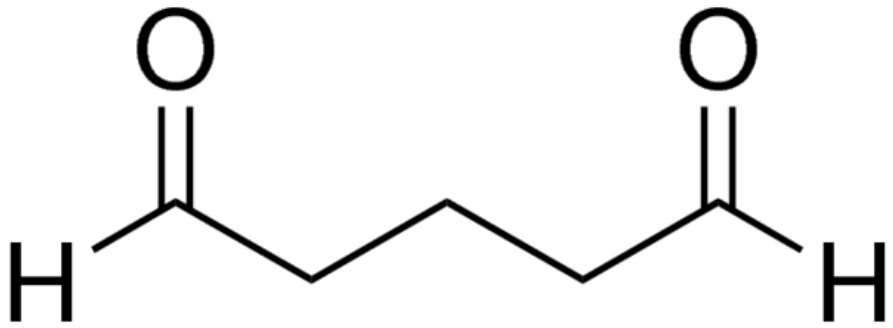

Figura 4.2 – Fórmula molecular do glutaraldeído.
Fonte: MERCK. (61)

iv) Camada de anti-BSA: Com a camada de ligantes preparada, cada lente recebe 200 μL de uma solução, contendo 2 mg/mL de anti-BSA em PBS e são deixadas reagindo por 2 horas, sendo lavadas em dois banhos de PBS para que então os ligantes que não se associaram a anti-BSA sejam bloqueados.

v) Bloqueio da camada de ligantes: Como nem todos os sítios de ligação formados pelo GA são ocupados pela anti-BSA, esta etapa é necessária para que este não se ligue aos antígenos presentes na fase de contato, o que produziria sinais enganosos da interação entre as espécies de interesse. O bloqueio é realizado pelo gotejamento de uma solução de glicina, apresentada na figura 4.3, em PBS, em concentração de 50 mM, por cerca de uma hora. Após os sessenta minutos as lentes são lavadas em PBS, o que finaliza o processo de produção da camada de imobilização.

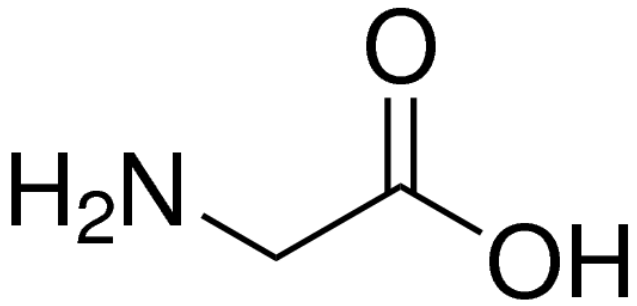

Figura 4.3 – Fórmula molecular da glicina.
Fonte: MERCK. (61)

Com as camadas de imobilização devidamente preparadas, as lentes possuem filmes com a estrutura ilustrada na figura 4.4. Está morfologia é típica de filmes compostos por monocamadas automontadas (SAM – *self assembled monolayers*). (62)

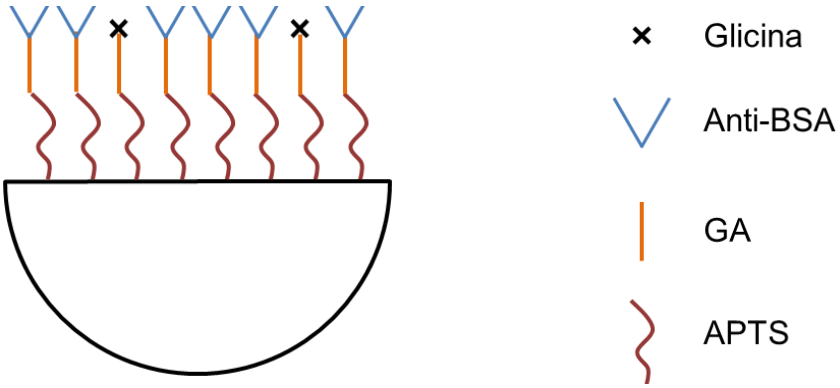

Figura 4.4 – Morfologia dos filmes compostos por SAM.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 4.5, abaixo, podemos notar a estrutura molecular completa de uma das constituintes da camada de imobilização, onde o anti-BAS é representado em verde na extremidade nitrogenada: (63)

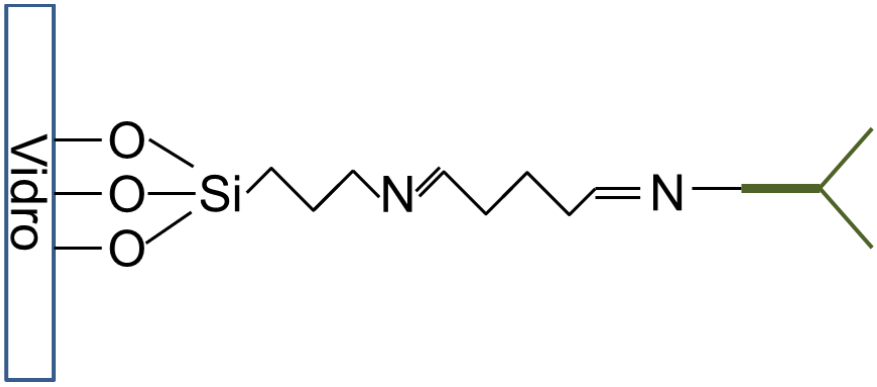

Figura 4.5 – Camada de imobilização obtida com APTES/glutaraldeído.
Fonte: Elaborada pelo autor.

As lentes funcionalizadas segundo o protocolo descrito acima apresentaram bons resultados (grande variação do sinal observado), conforme será apresentado na seção seguinte, porém, os resultados não se reproduziam em sucessivas medições e, além disso, os filmes apresentaram vida-útil muito curta, oxidando rapidamente, conforme ilustrado na figura 4.6:

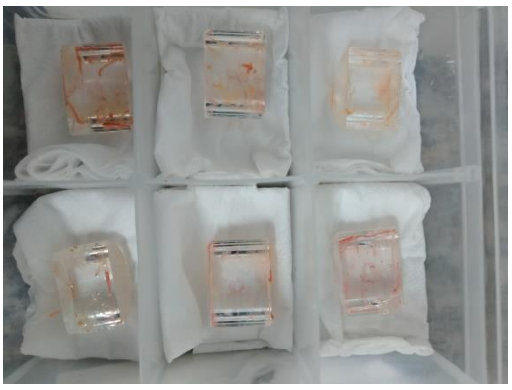

Figura 4.6 – Filmes de APTES/glutaraldeído oxidados.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A não-reprodutibilidade observada em medições consecutivas se deve provavelmente à esta oxidação.

Com o intuito de tentar contornar este inconveniente, foram realizadas diversas alterações, não simultâneas, em algumas etapas da produção dos filmes. Dentre essas alterações cito a mudança na quantidade de banhos realizados entre

as etapas, substituição do PBS por água deionizada em todas as etapas de lavagem e mudança nas concentrações dos reagentes, no entanto, a oxidação ocorria de tal maneira que os filmes se tornavam inutilizados em menos de 48 horas. Isolando as reações químicas que fazem parte da produção das camadas de imobilização em eppendorfs, foi possível notar que a oxidação se dava pela reação entre o APTES e o glutaraldeído, conforme ilustrado na figura 4.7, onde apenas estas duas substâncias estão presentes dentro do eppendorf, nas concentrações de 20 % em volume de etanol e 2.5 % de volume em água, respectivamente.

Figura 4.7 – Eppendorf contendo APTES e glutaraldeído.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a persistência desse efeito, foi adotada uma nova estratégia para a produção das camadas de imobilização, baseada na interação entre a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e a N-hidroxisuccinimida (NHS), cujas fórmulas moleculares são ilustradas nas figuras 4.8 (a) e (b), respectivamente.

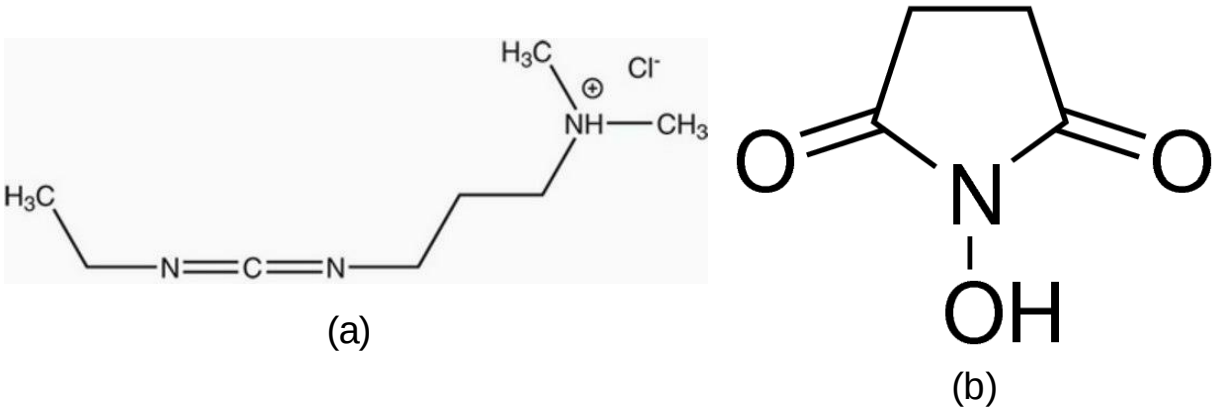

Figura 4.8 – Fórmula molecular da EDC (a) e da NHS (b).
Fonte: MERCK. (61)

A EDC reage com grupos carboxila, componentes da região constante da cadeia pesada de anticorpos, (61) formando um intermediário ativo que, por sua vez, reage facilmente com aminas primárias, como aquela presente nas moléculas de APTES. Na reação desta espécie intermediária com a amina primária do APTES, forma-se como produto uma ureia e uma molécula resultado da ligação direta entre a carboxila e a amina, ou seja, o EDC atua como um intermediário da ligação entre o anticorpo e o silano, sendo o NHS um agente que melhora o rendimento da reação. (64-66) O mecanismo de atuação do EDC na ligação entre o anticorpo e o silano é ilustrado na figura 4.9, abaixo:

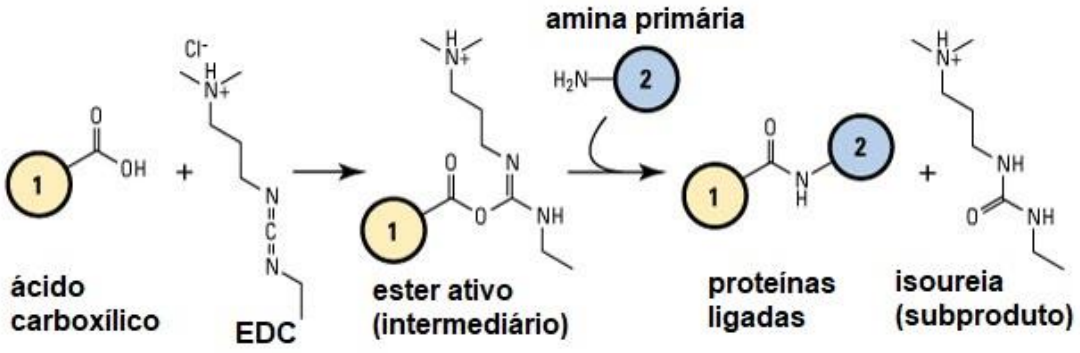

Figura 4.9 – Mecanismo de atuação do EDC.
Fonte: Adaptada de THERMO-FISHER. (66)

O protocolo utilizado na produção destas camadas com EDC/NHS é descrito a seguir.

i) Limpeza: A etapa de limpeza é idêntica à aquela empregada na produção de filmes de APTES/glutaraldeído, descrita anteriormente.

ii) Silanização: A silanização das lentes foi realizada pelo gotejamento de 200 μL de APTES em concentração de 2 % em volume em etanol por uma hora. Após este período, as lentes são lavadas com água deionizada e estão prontas para receber a camada de ligantes.

iii) Camada de anti-BSA: Para produzir a camada de ligantes, uma solução contendo EDC, NHS e anti-BSA em concentrações de 8 nM, 5 nM e 60 $\mu g/mL$, respectivamente, que permaneceu reagindo por 2 h em PBS é gotejada na superfície plana das lentes cilíndricas onde repousa por 1 h. Nesta etapa, o anti-BSA ligado ao EDC na solução de

PBS se liga ao grupo amina do APTES, já ligado ao óxido de silício presente nas lentes. A lavagem da ureia que surge como subproduto desta reação e feita em três banhos em PBS, restando agora apenas o bloqueio dos sítios não ocupados pelo anti-BSA.

iv) Bloqueio da camada de ligantes: De maneira semelhante, o bloqueio é realizado com uma solução de 50 mM de glicina em PBS por cerca de trinta minutos, sendo então as lentes lavadas em PBS, findando assim a produção das camadas de imobilização.

A camada de imobilização produzida através deste último método apresenta a estrutura ilustrada na figura 4.10, abaixo:

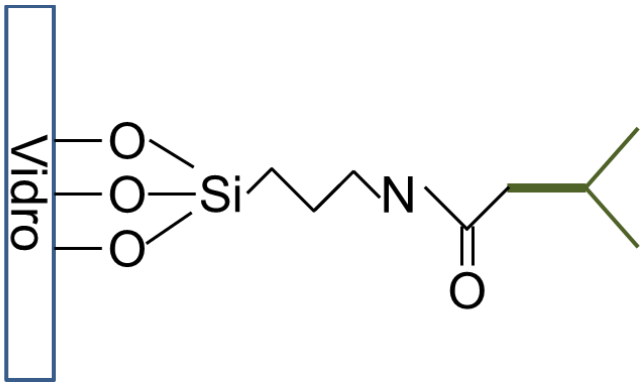

Figura 4.10 – Estrutura molecular do filme de EDC.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Este procedimento resultou em filmes que não apresentam a rápida oxidação observada nos filmes com glutaraldeído e de excelente qualidade óptica, o que melhorou a qualidade dos dados obtidos.

Foi desenvolvido um suporte para que as lentes funcionalizadas com as camadas de imobilização fossem colocadas em contato com a solução de antígenos, conforme ilustrado na figura 4.11, a seguir:

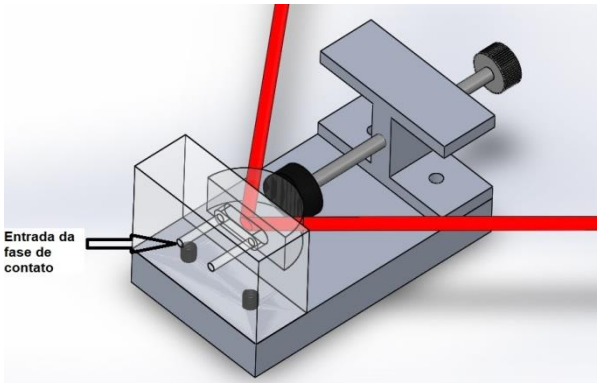

Figura 4.11 – Suporte utilizada para permitir o fluxo da fase de contato pela base da lente semicilíndrica.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com esse suporte, as lentes são pressionadas mecanicamente contra uma base de acrílico, que possui canais por onde a fase de contato circula interagindo assim com a camada de imobilização. O controle da vazão da fase de contato foi realizado com um aparelho comercial adaptado. O sistema possui um motor de passo acoplado a uma “rosca sem fim”, que possibilita pressionar o êmbolo de uma seringa em velocidades controladas.

4.3 SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS

Na montagem experimental empregada nas medições de interação química, direcionamos, em primeiro lugar, o feixe de luz emitido pelo laser de He-Ne em direção a um polarizador com eixo de transmissão orientado a 45 ° com a horizontal, garantindo que ambas as componentes de polarização transmitidas possuam a mesma amplitude. Após atravessar o polarizador o feixe é focalizado pela lente semicilíndrica e, depois de ser refletido pela base plana desta, onde interage com a amostra, passa por um analisador orientado paralelamente ao polarizador de entrada. A luz transmitida pelo analisador é coletada por um dispositivo que possui um arranjo linear de elementos fotossensíveis (pixels), que produz um sinal elétrico proporcional à intensidade luminosa que atinge cada pixel. Por meio de um cabo USB o sinal elétrico é enviado para um computador onde podemos realizar análises deste por meio de um programa de aquisição e tratamento de dados.

4.3.1 Charge-coupled device (CCD)

O dispositivo de carga acoplada, ou CCD, empregado, é o ILX554B produzido pela Sony e consiste de um arranjo linear de 2048 elementos fotossensíveis, cada um com dimensões de 14 μm x 56 μm, separados por 14 μm que possui baixo consumo e trabalha em frequência de até 2 MHz. (67) A conexão do CCD com o computador se dá por intermédio de uma placa controladora, que permite o ajuste do tempo de integração dessa, possibilitando a melhoria do contraste e a redução do ruído presente no sinal transmitido para o computador.

A base do prisma é colocada a uma distância de 10 cm do CCD e, dadas as amplitudes típicas de variação do sinal monitorado, as variações angulares da posição do ângulo crítico com a evolução das ligações químicas na camada de imobilização, que são da ordem de 50 pixels, podem ser tomadas como pequenos segmentos de reta ao longo do CCD, sem a necessidade de correções na leitura do sinal. Na figura 4.12 é apresentado o CCD utilizado, acoplada ao conector ao qual se conecta à placa de controle e a placa de controle da mesma.

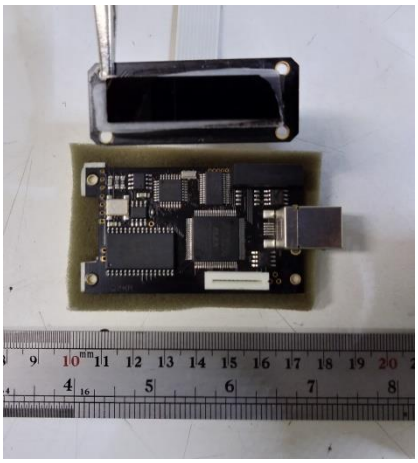

Figura 4.12 - CCD linear Sony ILX 554B e sua placa de controle.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O CCD e a placa de controle constituem a parte física do sistema de aquisição de dados, composto ainda pelo *software* de análise descrito a seguir em detalhes.

4.3.2 Programa de aquisição e tratamento dos dados

O sinal elétrico enviado pelo CCD é interpretado pelo programa como uma matriz linear, endereçando cada amplitude ao seu respectivo pixel. Como se trata de um sensor linear, a matriz de amplitudes nada mais é do que um perfil de intensidade do padrão de interferência refletido pela lente semicilíndrica coletado pela parte sensível do CCD.

Esta matriz é submetida a alguns tratamentos matemáticos de modo a reduzir o ruído presente no sinal, melhorando a qualidade das medidas obtidas. A placa de controle recebe do *software* a janela de integração e envia o sinal correspondente á luz coletada nesse tempo de integração para que o mesmo possa ser agrupado e uma média de diversas matrizes de intensidade possa ser obtida. A matriz de médias passa por um filtro de frequência, que pode estar, a critério do usuário, ativado ou desativado, para que seja possível obter uma supressão ativa do ruído presente nessa matriz, conforme ilustrado na figura 4.13. Após o filtro de frequência, é possível realizar uma correção da amplitude do sinal obtido levando o mínimo de amplitude para o valor zero, ou seja, trata-se de uma remoção do *background* do sinal, finalizando a etapa de tratamento do sinal.

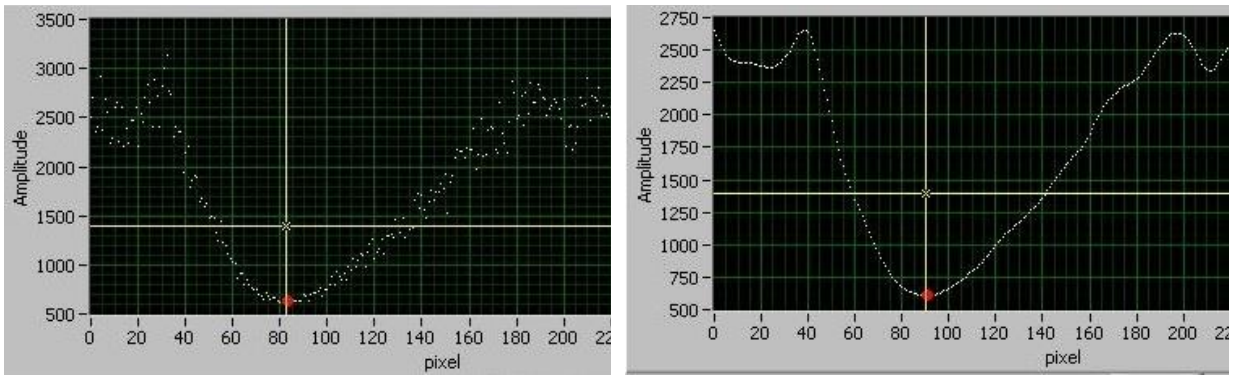

Figura 4.13 – Efeito do filtro de frequência (a direita) no sinal sem filtro (esquerda) obtido pelo CCD.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise consiste basicamente de duas etapas, a obtenção da posição da amplitude mínima do perfil de intensidade e a calibração desta posição em função de alguma grandeza física conveniente, por exemplo, do índice de refração. A posição do mínimo é calculada por meio de um ajuste quadrático em um intervalo de dados cuja largura é definida pelo usuário. O ajuste polinomial é utilizado devido à

necessidade de se obter um valor intermediário que não consta nos dados experimentais, que são discretos, pelo fato de o elemento sensível do CCD não ser contínuo. Com isso é possível obter valores fracionários para as posições dos mínimos. Um exemplo deste procedimento é apresentado na figura 4.14 abaixo, onde é possível notar que o vértice da parábola não coincide com os pontos experimentais de menor amplitude. Os pontos utilizados no ajuste estão limitados pela linha horizontal.

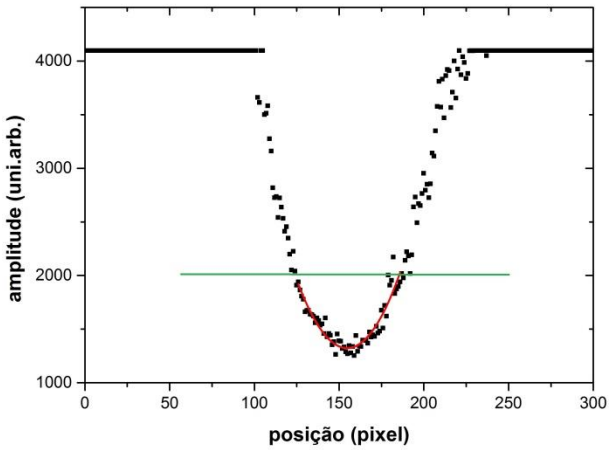

Figura 4.14 – Ajuste quadrático empregado para determinar a posição do mínimo de intensidade no CCD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Relacionando as posições ocupadas pelos mínimos com o tempo de execução do programa, medido a partir do *clock* do processador, conseguimos realizar um acompanhamento dinâmico, que possibilita o monitoramento em tempo real da modificação do índice de refração da amostra analisada. Na figura 4.15 apresentamos a interface do programa utilizado onde destacamos suas principais funcionalidades.

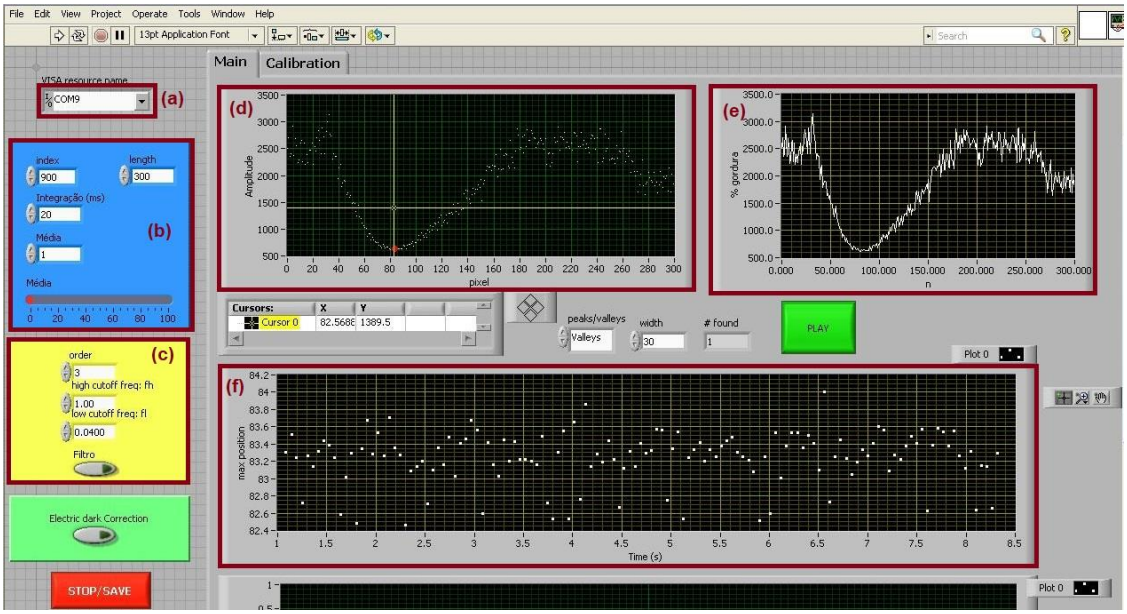

Figura 4.15 – Interface do *software* de análise de dados com destaque para algumas funcionalidades. Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 4.15, destacamos as seguintes funcionalidades: (a) endereço da porta de comunicação da qual se coleta os dados, ou seja, a porta na qual o CCD está conectado; (b) controle do intervalo de pixels a ser representado no gráfico, do tempo de integração do CCD e do número de matrizes utilizadas no cálculo da matriz de médias; (c) botão liga/desliga e ajuste de parâmetros do filtro de frequência; (d) gráfico da matriz de médias apresentado como amplitude x posição; (e) gráfico da matriz de médias calibrado com correspondência para alguma grandeza física de interesse, no exemplo, para o índice de refração; (f) gráfico da posição do mínimo de amplitude em função do tempo. Vale ressaltar que todos esses gráficos são obtidos dinamicamente, em tempo real.

Um exemplo do padrão luminoso incidente no CCD está ilustrado na figura 4.16.

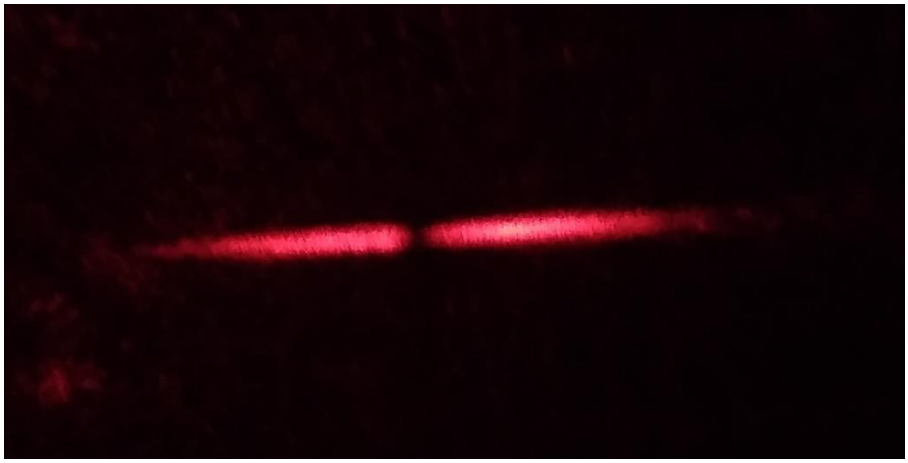

Figura 4.16 – Padrão luminoso característico definindo o ângulo crítico.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Observe que a posição do ângulo crítico fica claramente definida como uma faixa escura no perfil do laser, permitindo uma fácil detecção do mesmo pelo software de análise de dados.

5 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo serão apresentados os principais resultados experimentais obtidos. Discutiremos os detalhes da produção das camadas de imobilização de antígenos e das soluções contendo anticorpos específicos. Buscaremos validar a aplicabilidade da técnica por meio de uma abordagem qualitativa acerca dos resultados experimentais obtidos até então.

5.1 MEDIDAS DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO DE LÍQUIDOS TRANSPARENTES

A técnica empregada neste trabalho se fundamenta em variações do índice de refração para produzir um sinal associado a interações químicas, ou seja, trata-se de uma técnica refratométrica. Se faz relevante, portanto, apresentar o desempenho do sistema e dos métodos do ponto de vista da metrologia do índice de refração. Para realizar esta validação foram empregadas diversas soluções aquosas de DMSO e etanol, separadamente, cujos índices de refração foram determinados em um aparelho comercial, o ATAGO RX-5000α, e comparados com os valores obtidos a partir de uma prévia calibração do presente sistema. A temperatura ambiente, de aproximadamente $22\,°$, se manteve estável (menos de $0{,}5\,°$ de flutuação térmica), fato importante e que será abordado em maiores detalhes adiante. Nos dois casos as medições são estáticas e uma média com centenas de pontos é realizada antes que o valor final seja coletado para comparação.

Para realizar a calibração, duas amostras eram selecionadas e medidas em ambos os sistemas, no comercial e no proposto no presente trabalho. O valor de índice de refração obtido no aparelho comercial para a primeira das amostras era associado à respectiva posição do mínimo de intensidade determinada no proposto método e o mesmo para a segunda amostra. Desse modo uma lei de conversão entre número do pixel e o valor do índice de refração era definida por meio de uma reta de ajuste, possibilitando a medida direta do índice de refração das demais amostras. Se a calibração é válida, a relação entre os valores de índice de refração obtidos por ambos os métodos devem, ao serem representados em um gráfico, apresentarem relação linear e a reta de ajuste desses pontos deve apresentar coeficiente angular unitário. Os resultados obtidos com a solução de DMSO estão

apresentados na figura 5.1 e com etanol, na figura 5.2, onde em ambos os casos os valores obtidos pelo método proposto são apresentados no eixo vertical e os obtidos através do refratômetro comercial no eixo horizontal.

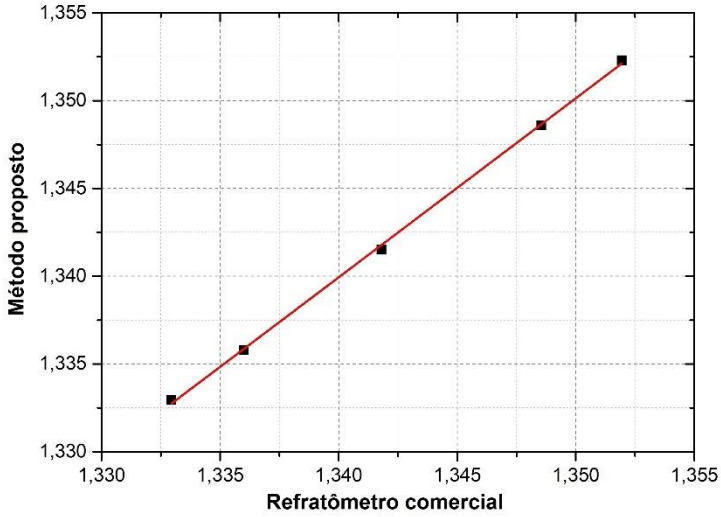

Figura 5.1 – Comparação entre o sistema empregado neste trabalho e um refratômetro comercial para soluções de DMSO. A linha vermelha é uma curva de ajuste cujo coeficiente linear é $1{,}002 \pm 0{,}006$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

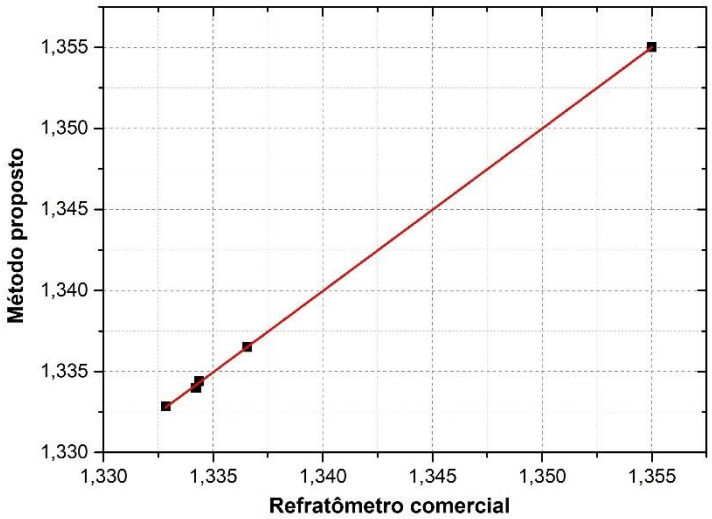

Figura 5.2 - Comparação entre o sistema empregado neste trabalho e um refratômetro comercial para soluções de etanol. A linha vermelha é uma curva de ajuste cujo coeficiente linear é $1{,}02 \pm 0{,}01$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Note que em ambos os casos o intervalo de índices de refração das amostras é da ordem de 10^{-2}, que é uma grande variação, porém os resultados coincidem em frações desse intervalo e atingem coincidência em uma parte em 10^{-5} unidades de

índice de refração. Os desvios do coeficiente angular das retas de ajuste são de $0{,}6\ \%$ para as soluções de DMSO e $1\ \%$ para a de etanol, em torno do valor unitário, ou seja, os valores obtidos pelo método empregado neste trabalho concordam em cerca de $1\ \%$ com aqueles obtidos pelo aparelho comercial que apresenta precisão da ordem de uma parte 10^{-5}.

5.2 EFEITOS DA TEMPERATURA

Apesar da possibilidade de fornecer resultados com precisão de uma parte em 10^5 no índice de refração, alcançar a estabilidade necessária para que isso ocorra depende de diversos fatores externos, dentre os quais a temperatura é o mais relevante. Os efeitos térmicos afetam o desempenho do sistema, causando alterações físicas em todos os componentes, desde o laser até o ar que envolve a montagem experimental. Com efeito, a figura 5.3 mostra a evolução temporal da posição do ângulo crítico devido apenas à termalização do sistema (lente semicilíndrica em contato com PBS), partindo da temperatura de armazenamento em geladeira até atingir a temperatura do laboratório. A contribuição de cada componente foi avaliada quanto à significância desses efeitos ligados à flutuação térmica ambiente e os principais resultados são discutidos adiante.

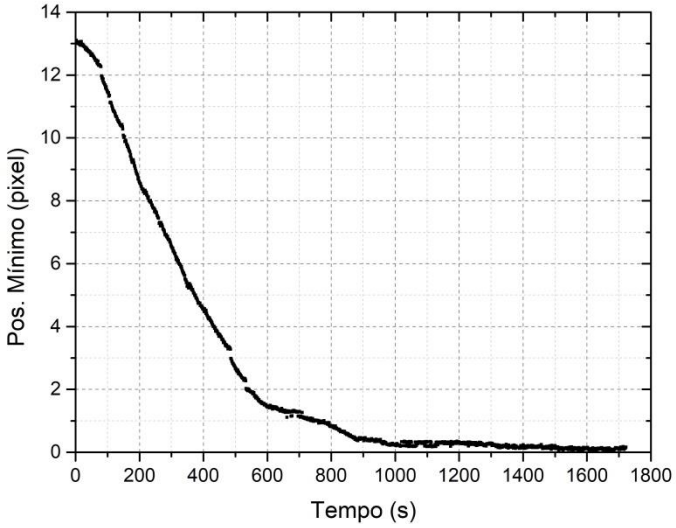

Figura 5.3 – Evolução temporal do ângulo crítico com lente semicilíndrica em contato com PBS aquecem até atingir temperatura ambiente.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Em primeiro lugar, foi avaliada a dependência do índice de refração do ar como função das variáveis: temperatura, umidade relativa e, por completeza, pressão atmosférica. Para isso foi empregado um código escrito em linguagem Python com base na equação de Ciddor e da documentação distribuída pelo NIST (*National Institute of Standards and Technology*) (68-69) para o índice de refração do ar. A cada etapa de cálculos, duas das grandezas eram mantidas constantes ao passo que apenas a dependência com um delas era avaliada. Nas figuras 5.4 e 5.5 estão os resultados simulados para o índice de refração do ar como função da temperatura e da umidade relativa do ar, respectivamente.

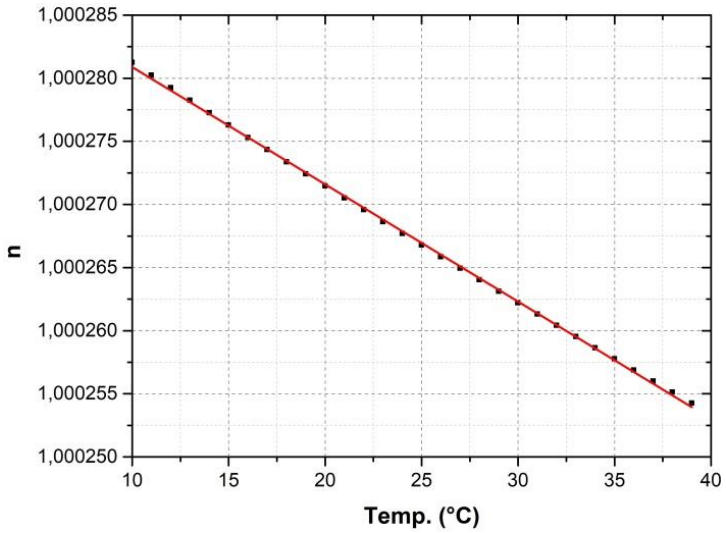

Figura 5.4 – Simulação do índice de refração do ar como função da temperatura para umidade relativa mantida em 45% e pressão atmosférica 101,325 kPa. A linha vermelha é apenas um guia para os olhos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

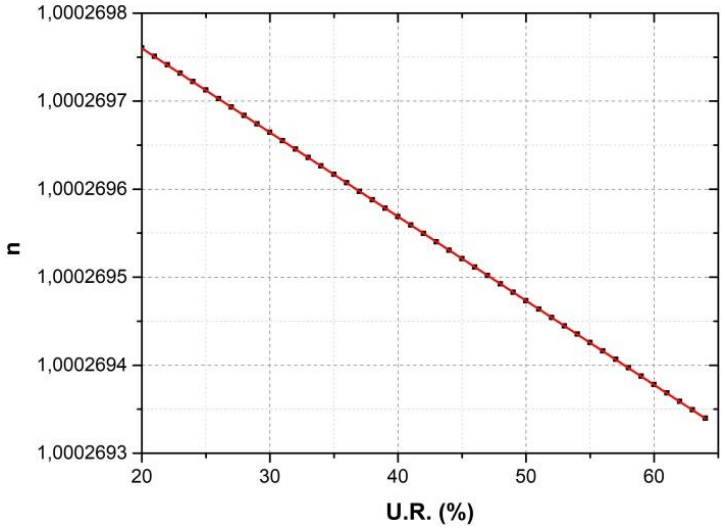

Figura 5.5 – Simulação do índice de refração do ar como função da umidade relativa para temperatura mantida em 22 ºC e pressão atmosférica 101,325 kPa. A linha vermelha é apenas um guia para os olhos.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Como podemos notar, a contribuição de pequenas variações de temperatura para o índice de refração do ar é da ordem de uma parte em um milhão, ou seja, dez vezes menor que a precisão do sistema, não sendo significativas como fontes de erro, mesmo que sejam combinadas. A equação de Ciddor também relaciona o índice de refração com a pressão ambiente, cuja dependência é ilustrada na figura 5.6.

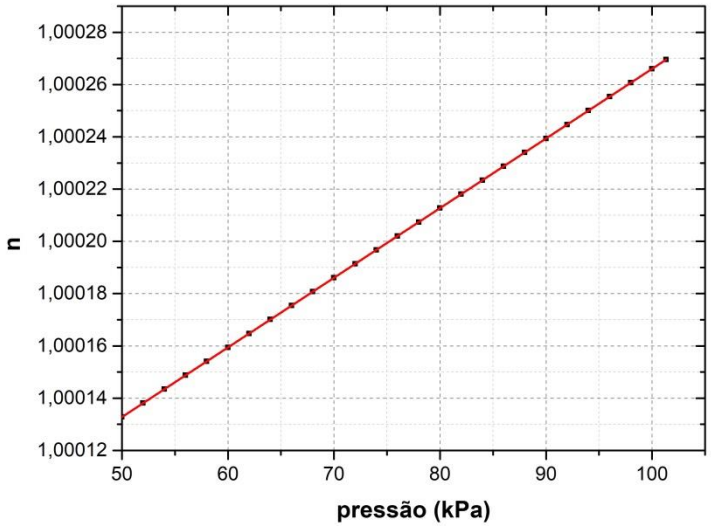

Figura 5.6 – Simulação do índice de refração do ar como função da pressão atmosférica para temperatura mantida em 22 ºC e umidade relativa em 45 %. A linha vermelha é apenas um guia para os olhos.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Observe que a dependência com a pressão é bem mais acentuada, cerca de dez vezes mais forte, porém com derivada com sinal oposto, o que contradiz com o observado na figura 5.3, onde notamos que a termalização ocorre em valores menores de índice de refração. Essa última simulação seguiu apenas a título de completeza, uma vez que todos os experimentos ocorreram em pressão atmosférica constante.

Outro ponto que apresenta dependência insignificante quanto à flutuações térmicas se deve à dilatação e ao efeito termo-óptico da lente cilíndrica. De acordo com as informações do fabricante (59) dos vidros utilizados na produção das mesmas, ambas as contribuições são da ordem de 10^{-7} para variações típicas da temperatura do laboratório.

Uma vez que tanto a lente quanto o ar não afetam significativamente a leitura do índice de refração, resta avaliar a contribuição da amostra. Uma vez que todas as soluções empregadas são predominantemente compostas por água, foram realizadas medições do índice de refração da água em função da temperatura, novamente empregando o aparelho ATAGO RX-5000α, que permite selecionar a temperatura de medição num intervalo entre $5\ °C$ e $50\ °C$. Os resultados obtidos são apresentados na figura 5.7.

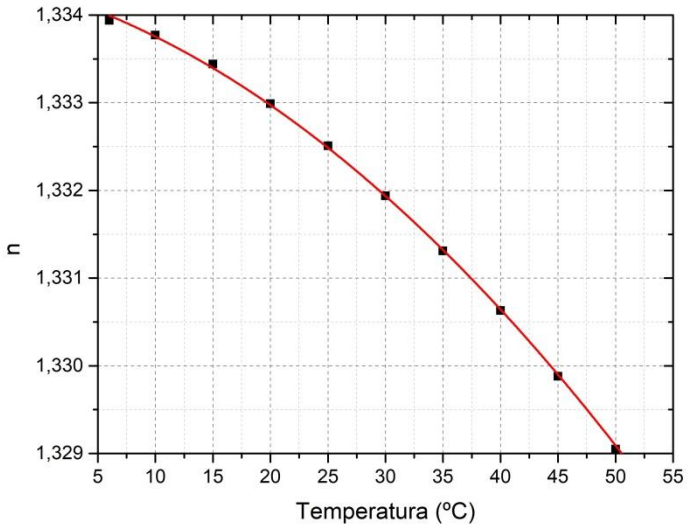

Figura 5.7 – Índice de refração da água em função da temperatura. A curva vermelha é apenas um guia para os olhos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Fica evidente que os efeitos térmicos associados à amostra são de extrema relevância para a estabilidade do sistema empregado neste trabalho. Em situações

típicas, a temperatura ambiente durante as medições é cerca de $22\,°C$, porém, flutuações da ordem de $\pm\,2\,°C$ são comuns e levam a erros nas medidas em cerca de duas partes em 10^4, que representa mais de dez vezes a precisão típica necessária para medições de afinidade química. Para driblar esse empecilho, como o sistema empregado não conta com controle de temperatura, o ambiente era monitorado e as medições eram realizadas nos intervalos onde a temperatura ambiente se mantinha mais estável, com monitoramento simultâneo da temperatura, permitindo o acompanhamento da cinética química, como apresentado a seguir.

5.3 MEDIDAS DE AFINIDADE QUÍMICA

A cinética molecular da interação entre os filmes produzidos e seus respectivos antígenos específicos foi analisada. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, que permanecia constante em cerca de $22\,°C$ com $\pm\,0{,}5\,°C$ de tolerância em torno desse valor, para cada medição. Com a bomba de injeção da fase de contato, o fluxo de analito circulando pela base da lente cilíndrica pode ser controlado e mantido constante com fluxo mínimo dependente das dimensões da seringa utilizada.

Conforme mencionado na seção experimental, foram empregados dois protocolos distintos para produção das camadas de imobilização, o primeiro deles, empregando APTES/glutaraldeído, levou aos resultados apresentados nas figuras 5.8 a 5.10. A princípio, as camadas de imobilização foram elaboradas utilizando BSA e, a fase de contato contendo anti-BSA, ordem inversa ao que foi empregado nos demais experimentos.

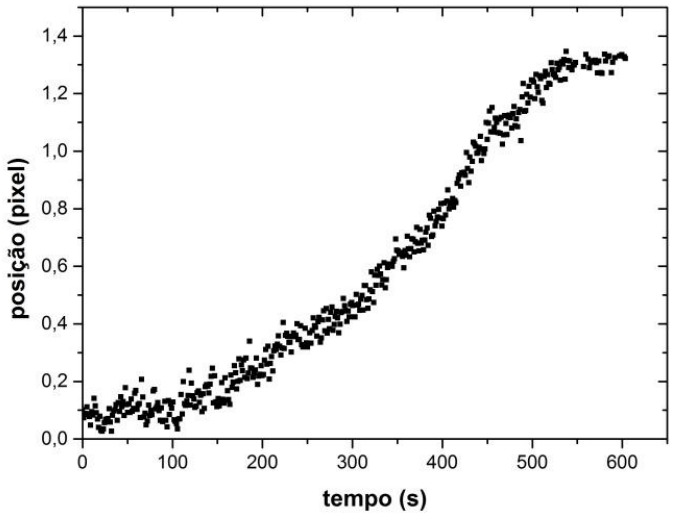

Figura 5.8 – Evolução temporal da posição do ângulo crítico para solução contendo $0{,}1\ mg/ml$ de anti-BSA em contato com filme APTES/glutaraldeído/BSA.
Fonte: Elaborada pelo autor.

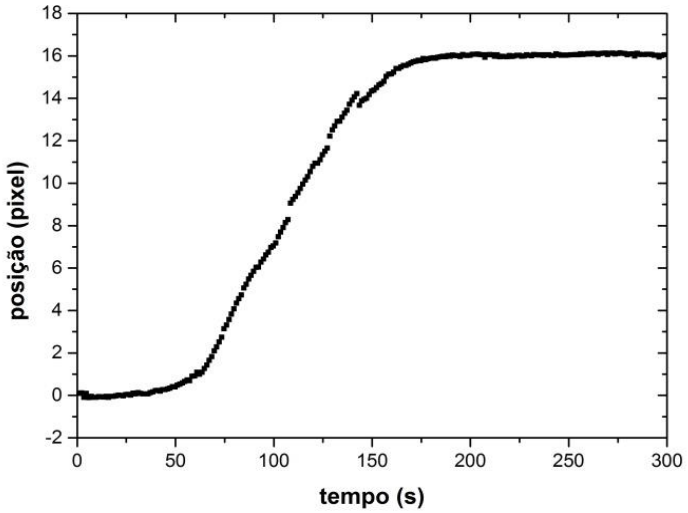

Figura 5.9 - Evolução temporal da posição do ângulo crítico para solução contendo $15\ mg/ml$ de anti-BSA em contato com filme APTES/glutaraldeído/BSA.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 5.8 apresenta a resposta do sistema quando uma solução de $0{,}1mg/mL$ de anti-BSA flui a uma taxa constante de $20\ \mu L/min$ pela base da lente cilíndrica, conforme descrito no capítulo anterior. Notamos que a posição do mínimo de intensidade desloca de aproximadamente um pixel em cerca de $500\ s$, variação esta que estimamos, com base em calibrações prévias, corresponder a $10^{-4}\ URI$ (Unidades de Índice de Refração). Já na figura 5.9, mantendo o mesmo fluxo de anti-BSA, utilizamos uma solução contendo $15\ mg/mL$, o que leva a uma perceptível mudança no sensorgrama. Notamos que não só a variação na posição

do mínimo, ou seja, a quantidade de anticorpos ligados ao filme, aumenta com o intervalo de tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido diminui. Essa redução no tempo necessário para que o equilíbrio químico seja atingido está de acordo com a eq. 3.19, onde, para $k_a = cte$, $k_d = cte$, $[B] = cte$ e $k_a \gg k_d$, a taxa de crescimento dos produtos é proporcional à concentração de analito em solução. A estabilidade do sensor pode ser verificada pelo patamar observado na condição de equilíbrio, onde a posição do mínimo detectado pelo CCD se mantém praticamente constante por cerca de 150 segundos, quando a medição é finalizada. Vale reforçar que essa estabilidade é fortemente dependente do controle da temperatura ambiente que, de acordo com a equação de Ciddor-Édlen, pode causar uma mudança de 10^{-4} UIR para uma variação de $1\,°C$ na temperatura o que representa cerca de um pixel.

Finalmente apresentamos na figura 5.10, um sensorgrama completo compreendendo as etapas de ligação, equilíbrio e remoção dos anticorpos. Para obtermos esse resultado injetamos PBS para verificar que não haveria resposta do sistema para o solvente puro e em seguida a seringa com PBS foi substituída por outra contendo uma solução de $60\,mg/mL$ de anti-BSA, que consistia da concentração da solução adquirida da SIGMA-ALDRICH, que foi novamente substituída pela solução tampão quando uma situação de equilíbrio foi atingida, conforme indicado pelas setas na figura 5.10. Alguns pontos merecem particular atenção; em primeiro lugar note que apesar de ter sido utilizada uma solução quatro vezes mais concentrada, a resposta do sensor foi apenas $15\,\%$ maior; em segundo lugar, o tempo necessário para que esta resposta fosse alcançada reduziu em quase $50\,\%$.

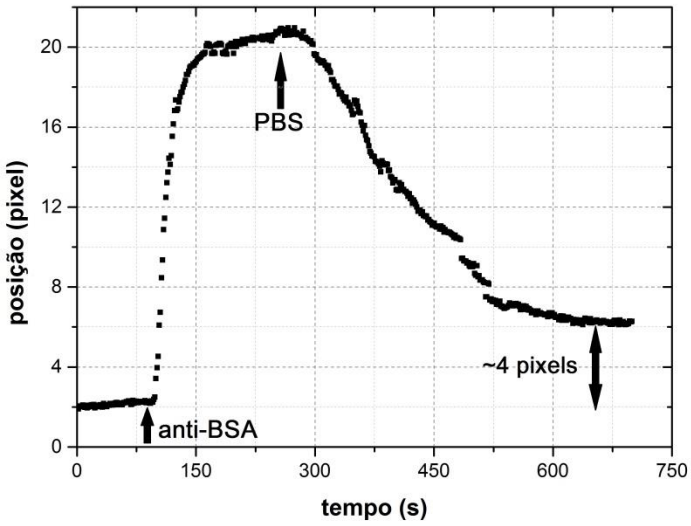

Figura 5.10 – Sensorgrama completo obtido com uma solução de $60\,mg/ml$ de anti-BSA em PBS. Fonte: Elaborada pelo autor.

Estes resultados podem ser justificados por dois efeitos: a saturação dos sítios de BSA disponíveis na camada de imobilização e pelo fenômeno conhecido como limitação do transporte de massa (MTL – *Mass Transport Limitation*). (70,71) A saturação dos sítios de ligação do filme de BSA limita a resposta máxima do sensor, uma vez que, com todos os sítios da camada de ligação ocupados, os anticorpos presentes na fase de contato não interagem com o campo evanescente e, portanto, o sensor não percebe variações no índice de refração do filme. O segundo efeito, bem mais delicado e com difícil solução, demorou quase trinta anos para ser devidamente estudado e ter seus efeitos esclarecidos. Esse efeito está relacionado com a velocidade de difusão do analito em solução até a interface com o filme.

Os eventos de ligação que ocorrem durante a interação entre ligante e analito podem ser considerados, em boa aproximação, como efeitos de interface, ou seja, a camada de ligação interage predominantemente com as moléculas que estão em contato com o filme depositado na base da lente em detrimento àquelas que se encontram mais afastadas. No caso de pares químicos com alta afinidade, como é o caso do BSA e do anti-BSA, e envolvendo soluções muito concentradas, as ligações na interface ocorrem muito mais rapidamente que a difusão das moléculas ao longo do volume da fase de contato até a vizinhança da camada de imobilização. Esse fenômeno altera significativamente a concentração de analito localmente afetando toda a cinética da reação. (70-72)

A solução para o efeito da limitação por transporte de massa envolve avaliar os resultados obtidos ao longo das medições e verificar se as constantes que caracterizam a dinâmica se alteram para diferentes concentrações de analito.

Nesta etapa, outro detalhe que vinha se mostrando cada vez mais importante começou a ser investigado, o que levou à completa reformulação do protocolo de produção dos filmes. Conforme descrito no capítulo quarto deste trabalho, a oxidação das camadas de imobilização inutilizavam as lentes em pouco tempo e esse problema foi contornado por meio da funcionalização da lentes com EDC/NHS. Juntamente com o novo protocolo de funcionalização, a camada de imobilização passou a ser produzida com anti-BSA, ao contrário do que vinha sendo feito.

Os resultados com filmes de EDC/NHS apresentavam comportamento típico ilustrado na figura 5.11, abaixo.

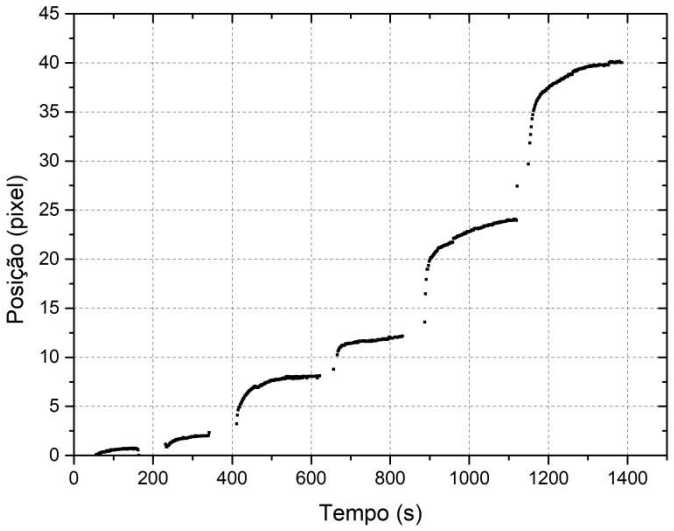

Figura 5.11 – Limitação por transporte de massa.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os cinco degraus observados na figura 5.11 correspondem à injeção de PBS, na sequência: injeção de uma solução contendo $1\ mg/ml$, em seguida $3\ mg/ml$, $5\ mg/ml$, $10\ mg/ml$ e finalmente $15\ mg/ml$ de BSA.

Uma etapa completa envolvendo adição de sucessivas soluções de BSA com etapa de remoção utilizando a solução tampão também foi realizada e o observado se encontra ilustrado na figura 5.12.

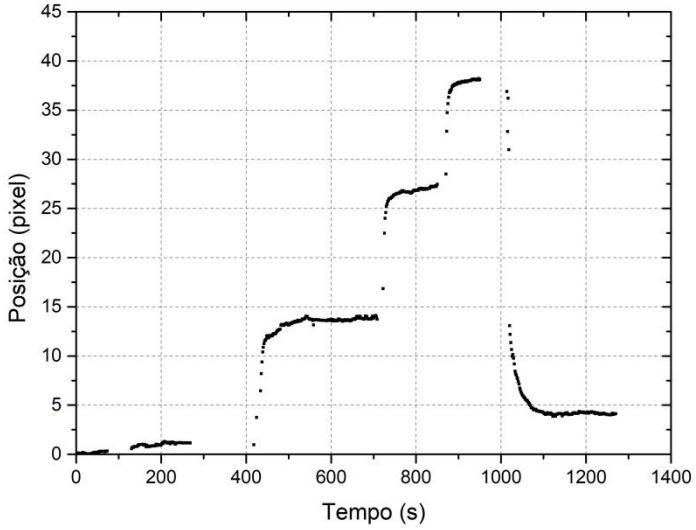

Figura 5.12 – Evolução temporal do ângulo crítico para soluções contendo $1\ mg/ml$, $5\ mg/ml$, $10\ mg/ml$, $15\ mg/ml$ de BSA e etapa de recuperação da camada de imobilização com PBS.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O comportamento observado acima foi obtido com PBS, em seguida, soluções contendo $1\ mg/ml$, $5\ mg/ml$, $10\ mg/ml$, $15\ mg/ml$ de BSA, seguido pelo PBS novamente, para a recuperação da camada de imobilização.

Note que de maneira semelhante ao que ocorreu com os filmes de APTES, a remoção completa do analito que se ligou à camada de imobilização não ocorre, que pode ser observado pela diferença na posição ocupada pelo ângulo crítico no início e no final da medição.

Com relação aos resultados apresentados até o momento, uma importante observação quanto às concentrações utilizadas deve ser feita. Como mencionado anteriormente a concentração de anti-BSA utilizada na produção das camadas de imobilização era de $2\ mg/mL$ isso limita a quantidade de ligações específicas possíveis de serem realizadas pelas moléculas de BSA em solução. Como consequência, interações não-específicas devidas ao excesso de analito passam a ser mais relevantes na resposta do biossensor. Dentre as várias interações não-específicas, a mais relevante no caso do presente trabalho é a adsorção física das moléculas na camada de ligação. Considerando que podemos ter cerca de três sítios de ligação para interações específicas do par BSA/anti-BSA, os efeitos de adsorção devem ser muito relevantes para as concentrações que superam essa proporção entre número de ligantes e de moléculas na fase de contato. (73)

Um importante requisito a ser atendido em qualquer método de medição é a reprodutibilidade, que como pode ser visto na figura 5.13, ocorre de maneira muito satisfatória.

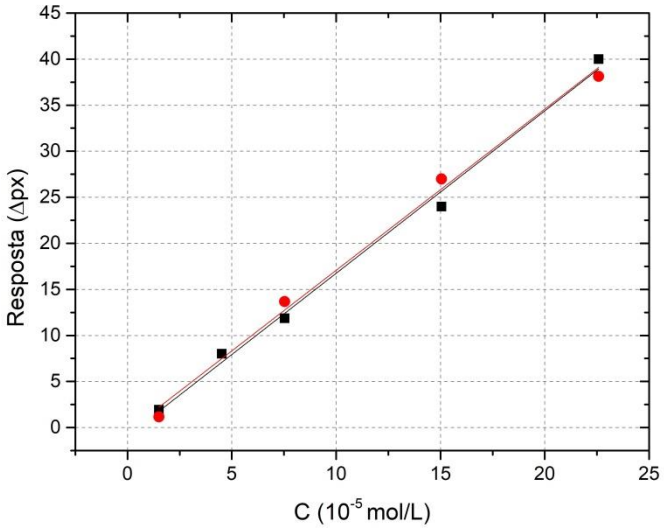

Figura 5.13 – Variação da posição do ângulo crítico como função da concentração para medições sucessivas em lentes distintas.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 5.13, foram coletadas as posições ocupadas pelo ângulo crítico quando o equilíbrio era atingido para cada concentração da fase de contato. Note que as inclinações das retas de ajuste são semelhantes, o que significa que a variação da posição do ângulo crítico em função do acréscimo de analito é o mesmo para medições distintas, o que atesta a reprodutibilidade do sistema. Esses pontos foram coletados em medições consecutivas com prismas distintos.

Uma última e importante análise realizada se refere à especificidade dos pares empregados e a falsos positivos que possivelmente surgiriam num sensorgrama. Caso a fase de contato estivesse contaminada com alguma outra espécie química, a resposta do sensor não seria alterada significativamente, conforme ilustrado na figura 5.14, onde a camada de imobilização de BSA foi submetida ao anticorpo específico do vírus da dengue, em solução na fase de contato. Nessas medições a concentração empregada de anti-dengue foi de $2\ mg/ml$, minimizando assim efeitos de interações não específicas.

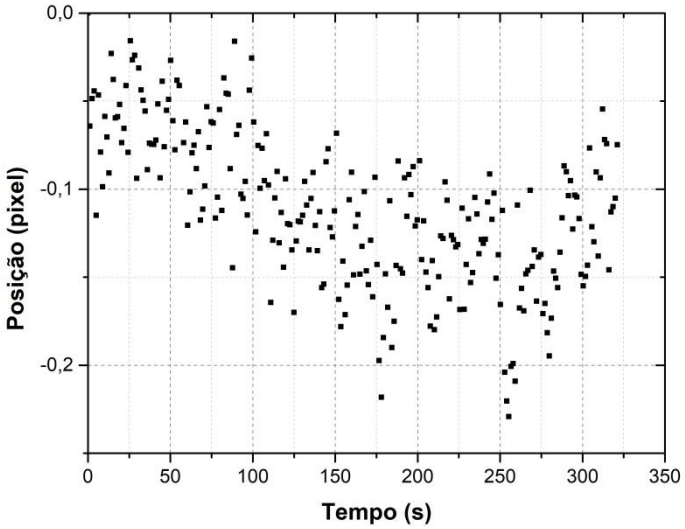

Figura 5.14 – Posição do ângulo crítico para uma solução de analito não-específico (anti-dengue).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Observe que em cerca de cinco minutos de reação, não houve nenhuma alteração na posição do ângulo crítico referente a qualquer variação do índice de refração. A flutuação observada, além de ocorrer no sentido da diminuição do índice de refração, é da ordem da imprecisão devida à flutuações térmicas, indicando, portanto, a seletividade na ocorrência das reações.

6 CONCLUSÕES

Um método refratométrico para a análise da cinética de interação entre uma fase de contato e uma camada de imobilização compostas por biomoléculas foi proposto. A técnica se baseia na determinação do ângulo crítico da reflexão interna em uma interface entre uma lente semicilíndrica e uma amostra, que depende do índice de refração de ambos, para acompanhar, em tempo real, a evolução temporal da reação química entre ligantes específicos. A produção das camadas de imobilização seguiu um protocolo semelhante ao empregado no crescimento de monocamadas automontadas descrito na literatura, para desenvolver camadas de anticorpos, de fácil produção quando comparados aos chips convencionais utilizados em ressonância plasmônica de superfícies, depositadas em substratos vítreos.

O desempenho do sistema, realizando medidas do índice de refração de amostras líquidas, foi comparado aos valores produzidos por um refratômetro comercial e os resultados obtidos foram coincidentes em cerca de 10^{-5} unidades, se mostrando, portanto, um ótimo método para aplicação no sensoriamento da interação entre biomoléculas.

Uma vez que o sistema se apresentou suficientemente sensível às variações de índice de refração desejáveis de um biossensor, foram realizadas medições de afinidade química. Pares que apresentam afinidade específica foram empregados e os resultados obtidos foram extremamente satisfatórios. Apesar das dificuldades em se obter uma camada de imobilização de boa qualidade, os resultados finais se mostraram mais simples e baratos que as alternativas comerciais. Outro fator importante que ainda necessita atenção, se refere ao efeito das interações não-específicas que afetam significativamente a resposta do sensor, levando a valores enganosos sobre a dinâmica química.

Obtivemos boa reprodutibilidade em medições consecutivas, característica desejável em um sensor. Os sensorgramas obtidos mostram que o método proposto é equiparável aos sistemas comercializados e, mesmo com resultados ainda qualitativos, o sistema se mostra uma boa alternativa aos dispositivos comerciais.

REFERÊNCIAS

1 SHANKARAN, D. R.; GOBI, K. V.; MIURA, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. **Sensors and Actuators B**: chemical, v. 121, n. 1, p. 158-177, 2007.

2 OWEN, V. Real-time optical immunosensors — a commercial reality. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 12, n. 1, p. i-ii, 1997. doi: 10.1016/0956-5663(96)89090-7.

3 SON, J. R. et al. Binding interaction studies of the immobilized Salmonella typhimurium with extracellular matrix and muscle proteins, and polysaccharides. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 63-72, 2004.

4 MOREIRA, L. et al. Label-free optical biosensor for direct complex DNA detection using Vitis vinifera L. **Sensors and Actuators B**: chemical, v. 234, n. 1, p. 92-97, 2016.

5 HUSHEGYI, A. et al. Ultrasensitive detection of influenza viruses with a glycan-based impedimetric biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, n. 1, p. 644-649, 2016.

6 INDYK, H. E.; GILL, B. D.; WOOLLARD, D. C. An optical biosensor-based immunoassay for the determination of bovine serum albumin in milk and milk products. **International Dairy Journal**, v. 47, n. 1, p. 72-78, 2015.

7 NGUYEN, L. V. et al. Interferometric-type optical biosensor based on exposed core microstructured optical fiber. **Sensors and Actuators B**: chemical, v. 221, n. 1, p. 320-327, 2015.

8 MYSZKA, D. G. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 50-57, 1997.

9 HU, Y. et al. Label-free electrochemical impedance sensing of DNA hybridization based on functionalized graphene sheets. **Chemical Communications,** v. 47, n. 1, p. 1743-1745, 2011.

10 KATZ, E. Y. A chemically modified electrode capable of a spontaneous immobilization of amino compounds due to its functionalization with succinimidyl groups. **Journal of Electroanalytical Chemistry,** v. 291, n. 1, p. 257-260, 1990.

11 KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A. et al. Comparative study of Random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 15, p. 6401-6408, 2010.

12 WANG, R. et al. Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 5, p. 967-974, 2004.

13 JOHNSSON, B.; LÖFÅS, S.; LINDQUIST, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. **Analytical Biochemistry**, v. 198, n. 2, p. 268-277, 1991.

14 LÖFÅS, S. et al. Methods for site controlled coupling to carboxymethyldextran surfaces in surface plasmon resonance sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, n. 9, p. 813-822, 1995.

15 ZILIO, S. C. A simple method to measure critical angles for high-sensitivity differential refractometry. **Optics Express**, v. 20, n. 2, p. 1862-1867, 2012.

16 DOMENEGUETI, J. F. M.; ZILIO, S. C. Humidity and pressure sensor based on internal reflection. **Applied Optics**, v. 53, n. 8, p. 1591-1596, 2014.

17 OTTO, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. **Zeitschrift für Physik**, v. 216, n. 4, p. 398-410, 1968.

18 HOMOLA, J.; YEE, S. S. GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators B**: chemical, v. 54, n. 1–2, p. 3-15, 1999.

19 DIFFERENT configurations to achieve surface plasmon excitation by light. Finlândia, 2016. Disponível em: <http://www.bionavis.com/>. Acesso em: 28 out. 2016.

20 RAETHER, H. Surface plasmons on smooth surfaces. In: RAETHER, H. (Ed.) **Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings.** Berlin: Springer, 1988. p. 4-39.

21 CAO, J. et al. The sensitivity of grating-based SPR sensors with wavelength interrogation. **Sensors**, v. 19, n. 2, p. 405-414, 2019.

22 BORN, M. et al. **Principles of optics:** electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

23 DAGHESTANI, H. N.; DAY, B. W. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. **Sensors,** v. 10, n. 11, p. 9630-9646, 2010.

24 VOISIN, V. et al. Interrogation technique for TFBG-SPR refractometers based on differential orthogonal light states. **Applied Optics**, v. 50, n. 22, p. 4257-4261, 2011.

25 HERNÁEZ, M., *et al.* Optical fiber humidity sensor based on surface plasmon resonance in the infra-red region. **Journal of Physics**: conference series, v. 178, n. 1, p. 12-19, 2009.

26 LIANG, H. et al. Surface plasmon resonance instrument as a refractometer for liquids and ultrathin films. **Sensors and Actuators B**: chemical, v. 149, n. 1, p. 212-220, 2010.

27 PATTNAIK, P. Surface plasmon resonance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 126, n. 2, p. 79-92, 2005.

28 KRETSCHMANN, E.; RAETHER, H. Notizen: radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. **Zeitschrift für Naturforschung A**, v. 23, n. 12, p. 2135-2136, 1968.

29 BRUNKER SPR. Massachusetts, 2019. Disponível em: <https://www.bruker.com >. Acesso em: 03 jan. 2019.

30 CARTERRA SPR. Salt Lake City, 2019. Disponível em: <https://carterra-bio.com >. Acesso em: 03 jan. 2019.

31 PRINCIPLES of SPR. Uppsala, 2019. Disponível em: <https://www.biacore.com >. Acesso em: 03 jan. 2019.

32 LIEDBERG, B.; NYLANDER, C.; LUNSTRÖM, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. **Sensors and Actuators**, v. 4, n. 1, p. 299-304, 1983.

33 NGUYEN, B.; TANIOUS, F. A.; WILSON, W. D. Biosensor-surface plasmon resonance: quantitative analysis of small molecule–nucleic acid interactions. **Methods**, v. 42, n. 2, p. 150-161, 2007.

34 DOMINIQUE, B. et al. Combined SPR and SERS: Otto and Kretschmann configurations. **Journal of Optics**, v. 17, n. 11, p. 1-10, 2015.

35 ZHANG, L. M.; UTTAMCHANDANI, D. Optical chemical sensing employing surface plasmon resonance. **Electronics Letters**, v. 24, n. 23, p. 1469-1470, 1988.

36 YUAN, D. et al. Design of a high-performance micro integrated surface plasmon resonance sensor based on silicon-on-insulator rib waveguide array. **Sensors**, v. 15, n. 7, p. 17313-17328, 2015.

37 HOA, X. D.; KIRK, A. G.; TABRIZIAN, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 2, p. 151-160, 2007.

38 SABATYAN, A. JAVAHERI, N. A detailed study of metallic surface-relief grating. **Optik**, v. 124, n. 20, p. 4412-4415, 2013.

39 DAI, Y. et al. Experimental demonstration of high sensitivity for silver rectangular grating-coupled surface plasmon resonance (SPR) sensing. **Optics Communications**, v. 416, n. 1, p. 66-70, 2018.

40 SHIBATA, T. et al. Optimization of metal quality for grating coupled surface plasmon resonance. **Physics Procedia**, v. 48, n. 1, p. 179-183, 2013.

41 RYU, Y. et al. Effect of coupled graphene oxide on the sensitivity of surface plasmon resonance detection. **Applied Optics**, v. 53, n. 7, p. 1419-1426, 2014.

42 WU, L. et al. Highly sensitive graphene biosensors based on surface plasmon resonance. **Optics Express**, v. 18, n. 14, p. 14395-14400, 2010.

43 ZHANG, H. et al. A novel graphene oxide-based surface plasmon resonance biosensor for immunoassay. **Small**, v. 9, n. 15, p. 2537-2540, 2013.

44 CHIU, N. F.; HUANG, T. Y. Sensitivity and kinetic analysis of graphene oxide-based surface plasmon resonance biosensors. **Sensors and Actuators B**: chemical, v. 197, n. 1, p. 35-42, 2014.

45 KUMAR, R. et al. Enhancement in sensitivity of graphene-based zinc oxide assisted bimetallic surface plasmon resonance (SPR) biosensor**. Applied Physics A**, v. 124, n. 1, p. 235-245, 2018.

46 KHAN, Y. et al. Gold nano disks arrays for localized surface plasmon resonance based detection of PSA cancer marker. **Sensors and Actuators B:** chemical, v. 255, n. 1, p. 1298-1307, 2018.

47 LEE, K.-S.; EL-SAYED, M. A. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 39, p. 19220-19225, 2006.

48 FUJIWARA, K. et al. Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 3, p. 639-644, 2006.

49 CAMARA, A. R. et al. Dengue immunoassay with an LSPR fiber optic sensor. **Optics Express**, v. 21, n. 22, p. 27023-27031, 2013.

50 CHANG, C.-Y. et al. Flexible localized surface plasmon resonance sensor with metal–insulator–metal nanodisks on PDMS substrate. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

51 ASHADUZZAMAN, M. et al. On/off-switchable LSPR nano-immunoassay for troponin-T. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

52 XU, X.; YING, Y.; LI, Y. Gold nanorods based LSPR biosensor for label-free detection of alpha-fetoprotein. **Procedia Engineering**, v. 25, n.1, p. 67-70, 2011.

53 TAMBE, A. et al. LSPR based fiber optic sensor for fluoride impurity sensing in potable water. **Journal of Physics:** conference series, v. 755, n.1, p. 012058, 2016.

54 19TH century optical instruments. Reino Unido, 2009. Disponível em: <https://homepages.abdn.ac.uk/npmuseum/index.shtml >. Acesso em: 03 jan. 2019.

55 FOWLES, G. R. **Introduction to modern optics**. 2nd ed. New York: Dover Publications, 1989.

56 ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química:** questionanado a vida moderna e o meio ambiente. 5a ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

57 NUSSENZVEIG, H. M. **Curso de física básica:** ótica, relatividade, física quântica. Rio de Janeiro: Edgar Blücher, 1998.

58 WANGSNESS, R. K. **Electromagnetic fields**. New Jersey: Wiley, 1986.

59 SF10 DATA SHEET. Alemanha, 2014. Disponível em: <http://www.schott.com/advanced_optics/english/abbe_datasheets/schott-datasheet-sf10.pdf?highlighted_text=sf10 >. Acesso em: 11 abr. 2014.

60 JANG, L.-S.; LIU, H.-J. Fabrication of protein chips based on 3-aminopropyltriethoxysilane as a monolayer. **Biomedical Microdevices**, v. 11, n. 2, p. 331-338, 2009.

61 SIGMA-ALDRICH. Estados Unidos, 2018. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html >. Acesso em: 10 out. 2018.

62 ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**. v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.

63 WU, C. C. et al. Label-free detection of prostate specific antigen using a silicon nanobelt field-effect transistor. **International Journal of Electrochemical Science,** v. 7, n. 5, p. 4432-4442, 2012.

64 LEE, K.-H. et al. Microfluidic systems integrated with two-dimensional surface plasmon resonance phase imaging systems for microarray immunoassay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 4, p. 466-472, 2007.

65 VASHIST, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide based strategies to crosslink antibodies on amine-functionalized platforms for immunodiagnostic applications. **Diagnostics**, v. 2, n. 3, p. 23-33, 2012.

66 CARBODIIMIDE Crosslinker Chemistry. Estados Unidos, 2016. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html >. Acesso em: 26 nov. 2018.

67 SONY ILX554B datasheet. Tokyo, 2014. Disponível em: <http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=ILX554B >. Acesso em: 10 abr. 2014.

68 CIDDOR, P. E. Refractive index of air: new equations for the visible and near infrared. **Applied Optics**, v. 35, n. 9, p. 1566-1573, 1996.

69 ENGINEERING metrology toolbox. Gaithersburg, 2016. Disponível em: <http://emtoolbox.nist.gov/Main/Main.asp >. Acesso em: 09 out. 2016.

70 SCHUCK, P. Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I. a computer simulation of

the influence of mass transport. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 3, p. 1230-1249, 1996.

71 SCHUCK, P.; MINTON, A. P. Analysis of mass transport-limited binding kinetics in evanescent wave biosensors. **Analytical Biochemistry**, v. 240, n. 2, p. 262-272, 1996.

72 SCHUCK, P.; ZHAO, H. **The role of mass transport limitation and surface heterogeneity in the biophysical characterization of macromolecular binding processes by SPR biosensing**. Totowa: Humana Press, 2010.

73 LICHTENBERG, J. Y.; Ling, Y.; Kim, S. Non-specific adsorption reduction methods in biosensing. **Sensors**, v. 19, n. 11, p. 2488-2504, 2019.

74 KAY, D. **Schaum's outline of tensor calculus**. New York: McGraw-Hill, 1988.

75 OLMON, R. L. et al. Optical dielectric function of gold. **Physical Review B**. v. 86, n. 23, p. 235147, 2012.

76 YANG, H. U. et al. Optical dielectric function of silver. **Physical Review B,** v. 91, n. 23, p. 235137-1-235137-9, 2015.

77 FLORY, F. R. **Thin films for optical systems**. Oxfordshire: Taylor & Francis, 1995.

APÊNDICE A

CONDIÇÃO DE EXISTÊNCIA DOS PLASMONS DE SUPERFÍCIE

Na seção 2 foi discutido que os plasmons são ondas do tipo TM. Será abordado neste apêndice, a razão pela qual os mesmos somente se apresentam com essa característica.

Para essa análise, considere uma interface entre dois meios com constantes dielétricas distintas ϵ_1 e ϵ_2. Seja a interface orientada ao longo da direção $\hat{x}$ com normal $\hat{z}$, sendo ϵ_1 o meio correspondente a $z > 0$, serão avaliadas duas situações distintas de campos eletromagnéticos interagindo nessa interface; uma no qual o campo elétrico se propaga ao longo da direção $\hat{x}$, oscilando ao longo da direção $\hat{y}$ (modo TE); e outra na qual o campo magnético é transversal (modo TM).

Para a região $z > 0$, considere o seguinte campo elétrico:

$$\overrightarrow{E_1} = E_1 e^{j(k_x x - \omega t)} e^{-\alpha_1 z} \hat{y} \tag{A.1}$$

Analogamente, para a região $z < 0$ temos:

$$\overrightarrow{E_2} = E_2 e^{j(k_x x - \omega t)} e^{\alpha_2 z} \hat{y} \tag{A.2}$$

Com $\alpha_1, \alpha_2 > 0$ definidos na seção 3.

O objetivo agora é determinar o campo magnético na interface e aplicar as condições de continuidade aos campos paralelos à mesma, para isso, tomaremos o rotacional do campo elétrico como segue:

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \tag{A.3}$$

Assumindo que os campos elétrico e magnético possuem a mesma dependência temporal, a derivada parcial no segundo termo da eq. A.3 fica:

$$\mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} = \mu_0 j\omega \vec{H} \tag{A.4}$$

Combinando as equações A.3 e A.4 temos:

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = \mu_0 j\omega \vec{H} \tag{A.5}$$

Que pode ser resolvida para cada uma das componentes dessa igualdade vetorial, como segue:

$$\left[\vec{\nabla} \times \vec{E}\right]_\zeta = \mu_0 j\omega \left[\vec{H}\right]_\zeta \tag{A.6}$$

Com $\zeta = x, y, z$. Como o campo elétrico oscila apenas na direção $\hat{y}$, podemos escrever:

$$\epsilon_{xzy} \partial_z E_y = \mu_0 j\omega H_x \tag{A.7}$$

$$\epsilon_{zxy} \partial_x E_y = \mu_0 j\omega H_z \tag{A.8}$$

Onde ϵ_{123}, $1,2,3 = x, y, z$ é o tensor de Levi-Civita (74). Tomando a derivada espacial do campo elétrico temos, para $z > 0$:

$$\overrightarrow{H_1} = \frac{1}{\mu_0 j\omega} (\alpha_1 \hat{x} + j k_x \hat{z}) E_1 e^{j(k_x x - \omega t)} e^{-\alpha_1 z} \tag{A.9}$$

Analogamente para a região $z < 0$:

$$\overrightarrow{H_2} = \frac{1}{\mu_0 j\omega} (-\alpha_2 \hat{x} + j k_x \hat{z}) E_1 e^{j(k_x x - \omega t)} e^{\alpha_2 z} \tag{A.10}$$

Como visto anteriormente na discussão do capítulo 3, os campos paralelos à interface entre dois meios adjacentes devem ser contínuos, logo, devemos ter

$\overrightarrow{H_1}(z=0) = \overrightarrow{H_2}(z=0)$, porém, como tomamos por hipótese que $\alpha_1; \alpha_2 > 0$ essa condição nunca é satisfeita, portanto, os plasmons superficiais nunca ocorrem para ondas TE.

Devemos agora avaliar se existem modos superficiais propagantes para campos TM, para avaliar essa possibilidade, considere os seguintes campos magnéticos:

$$\overrightarrow{H_1} = H_1 e^{j(k_x x - \omega t)} e^{-\alpha_1 z} \hat{y} \tag{A.11}$$

$$\overrightarrow{H_2} = H_2 e^{j(k_x x - \omega t)} e^{\alpha_2 z} \hat{y} \tag{A.12}$$

Considerando uma superfície metálica em equilíbrio eletrodinâmico ($\vec{J} = 0$), a equação de Ampère-Maxwell fica:

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \tag{A.13}$$

que, pela sua dependência temporal nos leva a:

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = -j\omega\epsilon\vec{E} \tag{A.14}$$

Como o campo magnético possui apenas componente na direção $\hat{y}$, podemos separar apenas as componentes do rotacional que possuem derivadas em H_y:

$$\epsilon_{zxy} \partial_x H_y = -j\omega\epsilon E_z \tag{A.15}$$

$$\epsilon_{xzy} \partial_z H_y = -j\omega\epsilon E_x \tag{A.16}$$

que para a região positiva de z fica:

$$\overrightarrow{E_1} = -\frac{1}{j\omega\epsilon_1}(\alpha_1 \hat{x} + jk_x \hat{z}) H_1 e^{j(k_x x - \omega t)} e^{-\alpha_1 z} \tag{A.17}$$

E para a região negativa de z:

$$\overrightarrow{E_2} = \frac{1}{j\omega\epsilon_2}(\alpha_2\hat{x} - jk_x\hat{z})H_2 e^{j(k_x x - \omega t)} e^{\alpha_2 z} \tag{A.18}$$

No caso TM, os campos $\overrightarrow{E_1}$ e $\overrightarrow{E_2}$ são paralelos à interface e devem ser contínuos, ou seja, devemos ter $\overrightarrow{E_1}(z=0) = \overrightarrow{E_2}(z=0)$ o que nos leva à seguinte igualdade para os termos na direção $\hat{x}$:

$$-\frac{\alpha_1}{\epsilon_1} = \frac{\alpha_2}{\epsilon_2} \tag{A.19}$$

Diferentemente do que foi observado no tratamento do modo TE, onde apenas os termos de decaimento α_1 e α_2 se relacionavam para garantir a continuidade, nesse caso observamos que a permissividade elétrica também participa nas condições de contorno do modo TM. A participação da permissividade elétrica torna possível a realização da equação acima, uma vez que metais, como ouro e prata, e dielétricos possuem permissividades com sinais opostos na região do espectro visível (58,75-77).

A partir dessas considerações, podemos concluir que, uma vez que os plasmons são ondas propagantes na interface entre dois meios com permissividades elétricas distintas, os mesmos devem necessariamente se apresentar como ondas tipo TE em metais em contato com um dielétrico, obedecendo a eq. A.19. Vale reforçar que, conforme discutido no capítulo 2, algumas condições devem ser satisfeitas para que um campo externo seja capaz de excitar esses plasmons.

APENDICE B

A POLARIZAÇÃO DA LUZ E O ÂNGULO CRÍTICO

Nesta seção será discutido o efeito descrito no capítulo terceiro sob a perspectiva da polarização da luz, para tanto, considere um campo elétrico linearmente polarizado a $45°$ com a direção paralela ao plano de incidência de uma interface entre dois meios dielétricos lineares, isotrópicos e homogêneos.

Após a reflexão desse campo, cada uma das componentes de polarização será refletida com amplitude dada pelos coeficientes de Fresnel, dados pelas eq. 3.18 e 3.19. Uma vez que, até o ângulo crítico, os coeficientes r_s e r_p variam continuamente no conjunto dos números reais, não há ganho de fase entre essas componentes e o efeito disso é um novo campo refletido, composto por componentes com amplitudes diferentes daquelas do campo original, ou seja, um campo refletido rotacionado. Na figura B.1, ilustramos essa situação.

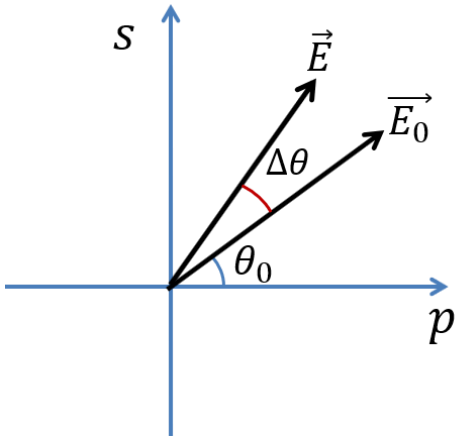

Figura B.1 – Geometria da rotação da polarização devido às diferentes refletividades das ondas *s* e *p*.
Fonte: Elaborada pelo autor

Podemos obter o ângulo de rotação da polarização linear para esse referido campo através da seguinte equação:

$$|\Delta\theta| = \left|\theta_0 - \arctan\left(\frac{r_s}{r_p}\right)\right| \tag{B.1}$$

Note que a equação B.1 é válida apenas para o caso onde $\theta_0 = 45°$.

À medida que o ângulo de incidência de aproxima de θ_c, os coeficientes de Fresnel tendem ao valor unitário, de tal sorte que a direção de polarização do campo refletido é rotacionada até $\Delta\theta = 90$, conforme ilustrado na figura B.2.

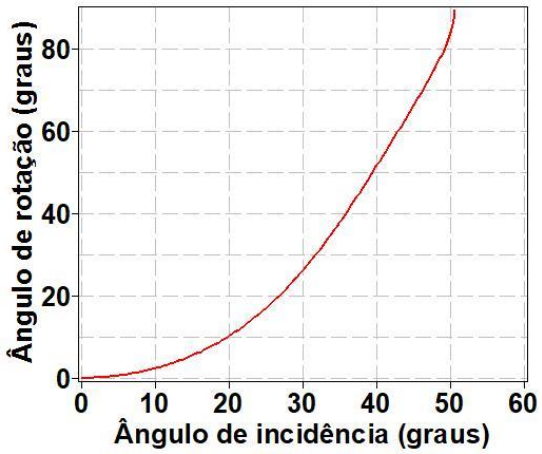

Figura B.2 – Rotação da polarização de um campo elétrico refletido em uma interface SF10/água em função do ângulo de incidência.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Acima do ângulo crítico, conforme visto na seção 3, os coeficientes de Fresnel possuem módulo unitário e uma fase complexa. Do ponto de vista da polarização da luz, isso significa que o campo está elipticamente polarizado.

Ao considerarmos a montagem experimental utilizada, podemos interpretar o padrão luminoso observado da seguinte forma: uma vez que a parcela da luz, refletida pela lente semicilíndrica abaixo do ângulo crítico, tem a cada valor de ângulo de incidência uma polarização diferente, observamos uma variação espacial da intensidade transmitida pelo analisador. Essa variação é no sentido de diminuir a intensidade luminosa, pois, a rotação da polarização tende a $90°$. No ângulo crítico, como a polarização da luz é rotacionada de $90°$, esta é totalmente bloqueada pelo analisador, voltando a ser transmitida acima desse ângulo, pois, temos agora polarização elíptica.

Observe que a variação da intensidade luminosa observada acima do ângulo crítico se deve à mudança da orientação dos semieixos da elipse com relação ao eixo de transmissão do analisador.