

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

ALBERTO OSORIO DOMÍNGUEZ

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

RECIFE

2014

ALBERTO OSORIO DOMÍNGUEZ

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

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

Área de concentração: Fotônica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fontana.

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Oliveira Cavalcanti.

RECIFE

2014

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Rosineide Mesquita Gonçalves Luz / CRB4-1361 (BCTG)

- O083r Osorio Domínguez, Alberto.
Reflectômetro óptico com sistema integrado de infusão para monitoração de reações biomoleculares / Alberto Osorio Domínguez. - Recife, 2014.
80folhas, il., fig., gráfs. e tabs.
- Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fontana.
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Oliveira Cavalcanti.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, 2014.
Inclui Referências.
1. Engenharia Elétrica. 2. RPS. 3. Reflectômetro. 4. Biossensor.
5. Ressonância de plásmos de superfície. 6. Ouro. I. Fontana, Eduardo (Orientador). II. Cavalcanti, Gustavo Oliveira (Coorientador). III. Título.

ALBERTO OSORIO DOMÍNGUEZ

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

Dissertação submetida ao curso de Pós-Graduação em engenharia elétrica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

Área de concentração: Fotônica

Aprovado em: 18/12/2014

Profº. Dr. EDUARDO FONTANA
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. GUSTAVO OLIVEIRA CAVALCANTI
Escola Politécnica de Pernambuco

Prof. Dr. ANTONIO JERONIMO BELFORT DE OLIVEIRA
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. ROSA AMÁLIA FIREMAN DUTRA
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores Dr. Eduardo Fontana (orientador) e ao Dr. Gustavo Cavalcanti (coorientador), pela oportunidade de participar desta pesquisa, transmitindo durante sua realização uma boa quantidade de conhecimentos, contribuindo desta forma com minha formação como mestre.

Aos Professores que ministraram cada uma das disciplinas cursadas durante o mestrado, especialmente ao Dr. Frederico Dias Nunes, que com seus conhecimentos, comentários, anedotas etc., fez da mecânica quântica uma das disciplinas mais agradáveis.

Agradeço a todos os colegas do Grupo de Fotônica, especialmente a Vladimir Homobono, Ricardo Ataíde e Leonardo Machado, por seu apoio e colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Fotônica do DES da UFPE, pela disponibilização dos equipamentos necessários para levar a cabo esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);

Finalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

RESUMO

O reflectômetro pode ser utilizado para monitorização de processos dinâmicos em líquidos, por meio de ressonância de plásmons de superfície, tendo potencial de aplicação na área de biossensores. Este trabalho relata o desenvolvimento de um reflectômetro óptico com sistema integrado de infusão multicanal, visando possíveis aplicações de sensores ópticos para processos dinâmicos em meios líquidos, a partir do efeito da ressonância de plásmons de superfície (RPS), foi integrado um sistema de infusão multicanal a um reflectômetro automatizado, operando no infravermelho ($\lambda = 975,1$ nm). O sistema de infusão pode controlar até quatro seringas, produzindo fluxo contínuo de líquidos com uma vazão mínima da ordem de $\mu\text{l}/\text{min}$, através de uma célula de reação de aproximadamente $30\mu\text{l}$. Com o sistema integrado ao reflectômetro foi analisada a estabilidade do sistema com a temperatura, e foi implementado um novo procedimento de alinhamento óptico. Foi possível realizar a caracterização óptica de soluções salinas com alto grau de precisão, demonstrando o potencial da técnica para aplicações na área de análises clínicas.

Palavras-chave: RPS. Reflectômetro. Biossensor. Ressonância de plásmons de superfície. Ouro.

ABSTRACT

The reflectometer can be used to monitor dynamic processes in liquids by means of surface plasmon resonance, with a potential application in the field of biosensors. This work reports the development of an optical reflectometer with integrated multichannel infusion. Aiming at possible applications of optical sensors for dynamic processes in liquid media, from the effect of surface plasmon resonance (SPR), a multichannel infusion system has been integrated to an automated reflectometer operating in the infrared ($\lambda = 975,1$ nm). The infusion system can control up to four syringes, producing continuous flow of liquids with a minimum flow rate of the order of microlitres/min through a reaction cell of approximately 30 μ l. With the flow system integrated to the reflectometer, the temperature stability of the system was characterized, and a new optical alignment procedure was implemented. It was possible to perform optical characterization of saline solutions with high precision, demonstrating the potential of the technique for applications in the field of clinical analysis.

Keywords: SPR. Reflectometer. Biosensor. Surface plasmon resonance. Gold

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Configuração clássica de Kretschmann para excitação de PS.....	16
Figura 2	- Função reflectância, para a configuração de Kretschmann, registrada para um prisma de SF2, com filme de ouro $d = 55 \text{ nm}$, em $\lambda = 975,1 \text{ nm}$, admitindo um meio externo aquoso com $n_s = 1,333$	18
Figura 3	- Curva de ressonância e parâmetros representativos.	20
Figura 4	- (a) variação do índice de refração volumétrico e (b) superficial do meio externo.	22
Figura 5	- Variação relativa do número de ondas do PS de uma interface simples metal-dielétrico para uma variação de índice de refração volumétrico de $\delta n = 0,01$ do meio externo para valores distintos de n	24
Figura 6	- Classificação dos sensores biomoleculares RPS, baseados em acoplamento por prisma.....	25
Figura 7	- Princípio de detecção de variações no índice de refração, a partir da medição do desvio do ângulo de ressonância.....	26
Figura 8	- Modo de detectar variações no índice de refração, a partir da medição do ΔR	27
Figura 9	- Caracterização dos espectros RPS para a determinação do índice de refração.	28
Figura 10	- Diagrama esquemático do reflectômetro. D_1 e D_2 são os fotodetectores de sinal e referência, respectivamente, I – Íris, P – Polarizador, S – Splitter, $MP(\theta)$ – Motor de passo do estágio de rotação, $MP(x)$ – motor de passo de translação x , $MP(y)$ – Motor de passo para translação y , $MP(w)$ – Motor de passo para correção do fotodetector D_1	30
Figura 11	- Fotografia das partes utilizadas no acondicionamento do laser. (1) Laser Infravermelho $\lambda = 971,1 \text{ nm}$; (2) Íris (I); (3) Polarizador no plano de incidência (P) e (4) Semi-espelho (S)......	32
Figura 12	- Mecanismo de posicionamento do prisma. (1) $MP(\theta)$ – Motor de Rotação; (2) $MP(x)$ – Motor de Translação em x e (3) $MP(y)$ – Motor de Translação em y	33
Figura 13	- Configuração do prisma para definição do ponto de referência.	34
Figura 14	- Procedimento para alinhar o prisma para rotação em torno do incentro (I). ..	35

Figura 15	-	Procedimento para alinhar o prisma para que gire em torno do incentro.....	36
Figura 16	-	Alinhamento translacional e rotacional do prisma.	37
Figura 17	-	(a) Fotodetector de referência D_2 e (b) fotodetector de sinal D_1	38
Figura 18	-	Calibração dos fotodetectores para a determinação da razão D_1/D_2	39
Figura 19	-	Configuração de Kretschmann para observação do efeito de RPS em interface metal-líquido.....	40
Figura 20	-	Foto ilustrativa do sistema de infusão. 1. Notebook com interface gráfica criada em <i>Qt Creator</i> , 2. Módulo de potência controlado pelo Arduino Mega e 3. Peças motorizadas com suporte para as seringas (Extraída de [24]).	41
Figura 21	-	(a) Diagrama esquemático da posição da célula de infusão; (b) fotografia da célula de infusão sobre o prisma do reflectômetro e (c) partes da célula de infusão.....	42
Figura 22	-	Ilustração do feixe laser incidindo na célula de infusão.....	43
Figura 23	-	Localização do ponto para o qual o laser atinge a área interna da célula de infusão.	44
Figura 24	-	Fotografias que ilustram formas de garantir que o feixe do laser atinja a área encerrada pela borracha (célula de infusão).....	45
Figura 25	-	Ilustração do sistema de infusão, célula de infusão e reflectômetro.	46
Figura 26	-	Tempo de registro de dados em função do tempo real.	50
Figura 27	-	Dependência temporal da intensidade do feixe S1.	51
Figura 28	-	Curva de reflectância para a estrutura SF2-ar (1), SF2-PVC-BK7-Au-ar (2), e SF2-óleo mineral-BK7-Au-ar (3).....	52
Figura 29	-	Volume inserido em função do tempo para uma seringa de 20 ml, marca Descarpak. (módulo de infusão programado na função de 1ml/min).....	54
Figura 30	-	Arranjo experimental para medir a temperatura em função de tempo; (a) para a peça motorizada e (b) para a amostra (H_2O destilada) contida na seringa.....	55
Figura 31	-	Incremento da temperatura em função do tempo do suporte da seringa e da amostra contida na seringa. (amostra inserida com uma vazão de 5 μ l/min).	56

Figura 32	- Reflectância em função da posição que mostra a área limitada pelo o-ring, para uma célula de infusão sem líquido.	57
Figura 33	- Reflectância em função da posição, para uma varredura feita no meio da célula de infusão sem líquido.	58
Figura 34	- Curva de calibração que mostra o comportamento linear do sensor para diferentes concentrações salinas.	59
Figura 35	- Curva de calibração para concentrações inferiores a 0,4mg/ml.	60
Figura 36	- Reflectância do prisma como função da concentração de NaCl.	61
Figura 37	- Curvas RPS para diferentes concentrações salinas.	62
Figura 38	- Dependência temporal do sinal de reflectância.	63
Figura 39	- Variação do ângulo de ressonância $\Delta\theta_{PS}$ em função das variações no índice de refração Δn , para diferentes concentrações salinas.	64
Figura 40	- Índice de refração em função da concentração de NaCl.	65
Figura 41	- Reflectância em função do índice de refração das concentrações salinas.	66
Figura 42	- (a) Curvas RPS para diferentes concentrações; (b) Reflectância em função do tempo para ângulo fixo.	67
Figura 43	- Superposição dos sinais de reflectância registrada para cada uma das lavagens que mostram-se nos primeiros segundos 200 segundos da Figura 42 (b).	68
Figura 44	- Curvas RPS para diferentes concentrações em fluxo estático e dinâmico.	69
Figura 45	- Reflectância em função da temperatura para uma configuração SF2-BK7-Au-(água destilada com $20 < T < 30$ °C).	70
Figura 46	- Reflectância em função do tempo para uma amostra de água.	71
Figura 47	- Sensogramas para as condições de vazão indicadas na Tabela 2.	73
Figura 48	- Evolução do sinal de reflectância para um período de 7 dias.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Vazões máxima e mínima para os diferentes padrões de seringas.....	53
Tabela 4.2 - Infusões para avaliar o efeito do fluxo na temperatura.	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE E SUA APLICAÇÃO.....	15
2.1	TÉCNICAS DE OBSERVAÇÃO DA RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE.....	15
2.2	PARÂMETROS CARACTERÍSTICOS DA RPS.....	18
2.3	EFEITO DE RPS NO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES BIOMOLECULARES.....	21
2.3.1	Variação do Índice de Refração do Meio Adjacente ao Metal.....	21
2.3.1.1	Variação do Índice de Refração Volumétrico.....	22
2.3.1.2	Variação do Índice de Refração Superficial.....	24
2.4	DIFERENTES FORMAS DE DETECÇÃO EM SENSORES RPS.....	25
2.4.1	Sensor RPS Baseado na Determinação da Variação do Ângulo θ_{PS}	26
2.4.2	Sensor RPS Baseado na Determinação da Variação da Reflectância	27
2.5	FORMULAÇÃO PARA DETERMINAR O ÍNDICE DE REFRAÇÃO A PARTIR DAS CURVAS RPS.....	27
3	REFLECTÔMETRO AUTOMATIZADO E SISTEMA DE INFUSÃO.....	30
3.1	AJUSTE DO REFLECTÔMETRO AUTOMATIZADO	30
3.1.1	Acondicionamento do Laser	31
3.1.2	Posicionamento do Prisma.....	32
3.1.3	Alinhamento e Calibração Óptica do Prisma	33
3.1.4	Protocolo para Rotação do Prisma em Torno do seu Incentro.....	34
3.1.5	Definição de Pontos de Referência Translacional e Rotacional	37
3.1.6	Protocolo de Detecção, Controle e Processamento	38
3.1.7	Protocolo de Calibração dos Fotodetectores	39
3.2	FILME METÁLICO COMO SUPERFÍCIE SENSORA.....	40
3.3	SISTEMA DE INFUSÃO	40
3.3.1	Célula de Infusão	41
3.3.2	Alinhamento da Célula de Infusão.....	43
3.3.3	Circuito Hidráulico	46
3.3.4	Integração entre o Sistema de Infusão, Célula de Infusão e Reflectômetro.....	46
3.4	AMOSTRAS LÍQUIDAS	47

4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO REFLECTÔMETRO E MÓDULO DE INFUSÃO	49
4.1.1	Avaliação do Tempo de Aquisição no Reflectômetro.....	49
4.1.2	Registro da Intensidade do Feixe S1	50
4.1.3	Filme de PVC como “Casador” de Índices de Refração	52
4.1.4	Vazões Inseridas pelo Módulo de Infusão	53
4.1.5	Influência da Temperatura da Peça Motorizada no Índice de Refração	54
4.2	INTEGRAÇÃO REFLECTÔMETRO AUTOMATIZADO-MÓDULO DE INFUSÃO.....	57
4.2.1	Área de Contato e Área Iluminada.....	57
4.2.2	Curva de Calibração	59
4.3	MEDIDAS REALIZADAS COM O SISTEMA INTEGRADO	60
4.3.1	Determinação do Índice de Refração a partir do Ângulo Crítico.....	61
4.3.2	Análises das Curvas RPS e Sensogramas Realizados com o Sistema Integrado .	62
4.3.3	Resposta do Sensor RPS em Fluxo Contínuo.....	66
4.4	EFEITO DA TEMPERATURA NA REFLECTÂNCIA	70
5	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

O efeito de Ressonância de Plásmons de Superfície (RPS) foi observado inicialmente por Wood em 1902, ao analisar a luz policromática refletida por um espelho que tinha uma grade de difração em sua superfície. A luz refletida apresentava um padrão de faixas que Wood não foi capaz de interpretar (1). Uma interpretação física desse efeito foi proposta por Rayleigh, e posteriormente refinada em 1941 por Fano, que introduziu o conceito de *poláriton superficial*: quase partícula resultante da oscilação coletiva dos elétrons como resultado da interação da luz (2).

A primeira descrição teórica da ressonância de plásmons de superfície foi proporcionada por Ritchie em 1957. Onze anos depois, Ritchie relacionou o plásmon superficial com as ondas superficiais de Sommerfeld e o fenômeno observado por Wood (3). Nesse mesmo ano, Otto (4) e Kretschmann e Raether (5) apresentaram dois métodos simples de excitação de plásmons de superfície (*PS*) em filmes de metais nobres. Esses métodos estabeleceram as bases da plasmônica, tal como é conhecida hoje em dia, abrindo assim um extenso campo de ação para o desenvolvimento de sensores utilizados amplamente nas áreas da química e da biologia (6).

O efeito *RPS* pode ser observado em diferentes tipos de configurações, como por exemplo, em configurações de fibra óptica (7), em grades de difração (8), na configuração de Otto (9) e na configuração básica de Kretschmann (10). Esta última configuração é empregada no reflectômetro usado neste trabalho, em que um substrato de vidro metalizado fica em contato óptico com um prisma de acoplamento para observação do efeito. A ressonância de plásmons de superfície pode ser utilizada na caracterização óptica de superfícies, ou também no estudo em tempo real de reações entre diferentes agentes biomoleculares, sem o uso de marcadores fluorescentes ou radioisotópicos (5).

O Biacore, primeiro equipamento comercial a explorar essa técnica, foi lançado no começo da década de 90 pela Pharmacia (11) e outras versões de sistemas baseados em RPS para caracterização *label-free* de reações biomoleculares foram também lançadas.

Com o objetivo de expandir a capacidade da técnica de *RPS* para uma larga gama de aplicações, incluindo a monitoração de processos dinâmicos em meios líquidos, como no caso das reações biomoleculares de superfície, foi integrado ao reflectômetro automatizado do Grupo de Fotônica um módulo de infusão de líquidos, com capacidade de controlar até quatro seringas. Além disso, foi desenvolvida uma nova técnica de alinhamento do reflectômetro

que permite obter um ganho substancial de tempo na realização de experimentos. Com o sistema, foi também caracterizada a sensibilidade à temperatura da técnica de *RPS* em meio líquido. Com o sistema integrado foram realizadas medidas de caracterização óptica de substâncias líquidas em função da salinidade, no modo de fluxo contínuo, visando aplicações futuras no estudo da cinética de reações biomoleculares.

O presente trabalho está dividido em 4 capítulos, que estão distribuídos da seguinte maneira: No Capítulo 2 é apresentada a teoria que fundamenta o princípio físico do efeito de *RPS* e como esta técnica é utilizada para determinar variações do índice de refração do meio sob teste. O Capítulo 3 descreve as características dos equipamentos utilizados, a forma como foi integrado o módulo de infusão com a célula de infusão, os procedimentos de preparação das amostras líquidas e finalmente a metodologia tanto de alinhamento do sistema como de registro de dados. No Capítulo 4 apresenta-se a caracterização do refletômetro e do módulo de infusão com o objetivo de conhecer e avaliar os requisitos fundamentais do sistema e são também apresentadas as curvas de reflectância obtidas da medição de diferentes soluções salinas com o refletômetro integrado ao módulo de infusão. No Capítulo 5, são descritas as conclusões do trabalho.

2 RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE E SUA APLICAÇÃO

Neste capítulo é descrito o fenômeno de ressonância de plásmons de superfície (*RPS*) e discutido como é feito o emprego desse efeito na caracterização e desenvolvimento de sensores *RPS* para o estudo de reações biomoleculares.

2.1 Técnicas de Observação da Ressonância de Plásmons de Superfície

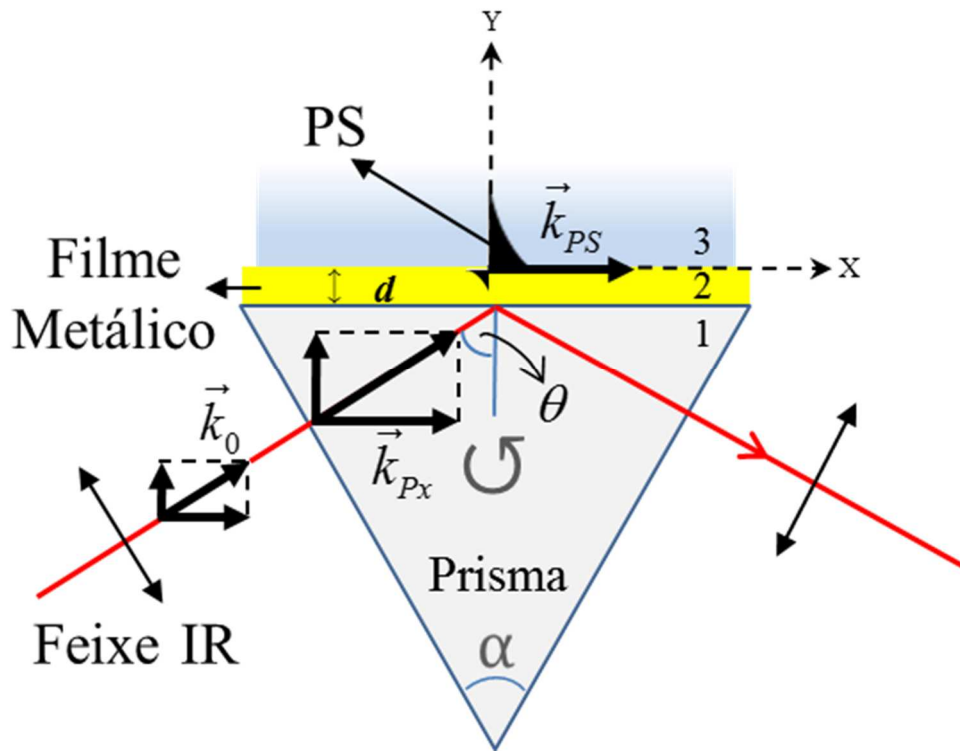
Existem várias formas de excitar plásmons de superfície (*PS*). Em geral os métodos têm em comum a necessidade de acoplar a componente paralela à interface do vetor de onda de campo incidente com aquele do *PS*. Para alcançar esse objetivo, há duas técnicas simples que empregam um prisma de acoplamento. Na primeira delas proposta por Otto em 1968 (6), o filme metálico tem espessura mínima de 200 nm e sua superfície é posicionada a uma distância de uma fração de comprimento de onda da superfície do prisma. Na segunda, proposta por Kretschmann (10), e utilizada neste trabalho, um filme fino metálico tendo espessura d de algumas dezenas de nanômetros, fica em contato óptico direto com a superfície do prisma, conforme ilustrado na Figura 1. Nessa configuração o *PS* é excitado na face exterior do filme metálico que se encontra em contato direto com o meio externo, que é geralmente o meio sob teste. Ocorre o efeito de ressonância iluminando-se a superfície metalizada do prisma com luz polarizada no plano de incidência, na faixa angular em que ocorreria reflexão interna total. Para um dado ângulo de incidência, tal que a componente tangencial do vetor de onda do campo incidente iguale àquele do *PS*, ocorre máxima transferência de energia, resultando em reflexão mínima da luz.

O *PS* será excitado se o sistema operar em uma faixa de comprimentos de onda na qual o meio metálico tenha permissividade negativa (12), tal que esse valor somado àquele do meio externo resulte em um valor negativo. Isso é satisfeito se a magnitude da permissividade do meio externo for inferior àquela do metal. Se essas condições forem satisfeitas a componente tangencial do vetor de onda do *PS*, ilustrado na Figura 1, é dada aproximadamente por (12)

$$k_{PS} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_2 \epsilon_3}{\epsilon_2 + \epsilon_3}}, \quad (1)$$

em que $k_0 = 2\pi/\lambda$ é o número de onda do vácuo no comprimento de onda λ , e ε_2 e ε_3 são as permissividades do metal e do meio externo, respectivamente. Além disso, o PS tem como característica um campo elétrico normal à superfície do filme. Por isso, a excitação eficiente dessa oscilação requer que o campo de excitação esteja polarizado no plano de incidência, como indicado na Figura 1.

Figura 1 - Configuração clássica de Kretschmann para excitação de PS.



Fonte: autor.

Na configuração de Kretschmann mostrada na Figura 1 (10), o filme metálico pode ser evaporado sobre a face do prisma ou sobre um substrato de vidro. Nessa configuração, o prisma, de índice de refração n_1 , aumenta o número de onda do campo incidente para $k = n_1 k_0$, de tal forma que a componente tangencial (assumida como a direção x na Figura 1) é dada por

$$k_x = n_1 k_0 \sin \theta. \quad (2)$$

Ajustando o ângulo de incidência na faixa angular acima do ângulo crítico, obtém-se o acoplamento máximo entre o campo incidente e o PS na condição de ressonância para

$$k_x = k_{ps}, \quad (3)$$

com k_{ps} dado aproximadamente pela Equação 1. As Equações 2 e 3, e com o auxílio da Equação 1 permitem determinar o ângulo de ressonância, que pode ser escrito como

$$\theta_{ps} \approx \arcsen\left(\frac{1}{n_1} \sqrt{\frac{\varepsilon_2 \varepsilon_3}{\varepsilon_2 + \varepsilon_3}}\right). \quad (4)$$

A caracterização do efeito de *RPS* pode ser feita com a geometria ilustrada na Figura 1 realizando uma medição da intensidade da radiação refletida na superfície metálica. Ajustando o ângulo de incidência em torno do valor dado por θ_{ps} , observa-se uma absorção na intensidade da radiação refletida da interface metálica. Essa técnica é conhecida como *Attenuated Total Reflection (ATR)*, utilizada em muitos trabalhos como base do desenvolvimento de sensores químicos e biológicos (6), como também para a caracterização das propriedades ópticas e estruturais de filmes metálicos (10).

Para caracterizar o efeito *RPS* na configuração de Kretschmann, pode utilizar-se a formulação de Fresnel para uma camada simples, possuindo duas interfaces separando os meios 1, 2 e 3, com permissividades $\varepsilon_1, \varepsilon_2$ e ε_3 que correspondem às permissividades relativas do prisma, do metal e do meio externo, respectivamente, e sendo d a espessura do filme metálico, como ilustrado na Figura 1. A equação que permite determinar a reflectância para polarização no plano de incidência é dada por (13)

$$R = \left| \frac{r_{12} + r_{23}e^{-2jk_2d}}{1 + r_{12}r_{23}e^{-2jk_2d}} \right|^2, \quad (5)$$

sendo

$$r_{12} = \frac{\varepsilon_1 k_2 - \varepsilon_2 k_1}{\varepsilon_1 k_2 + \varepsilon_2 k_1}, \quad (6)$$

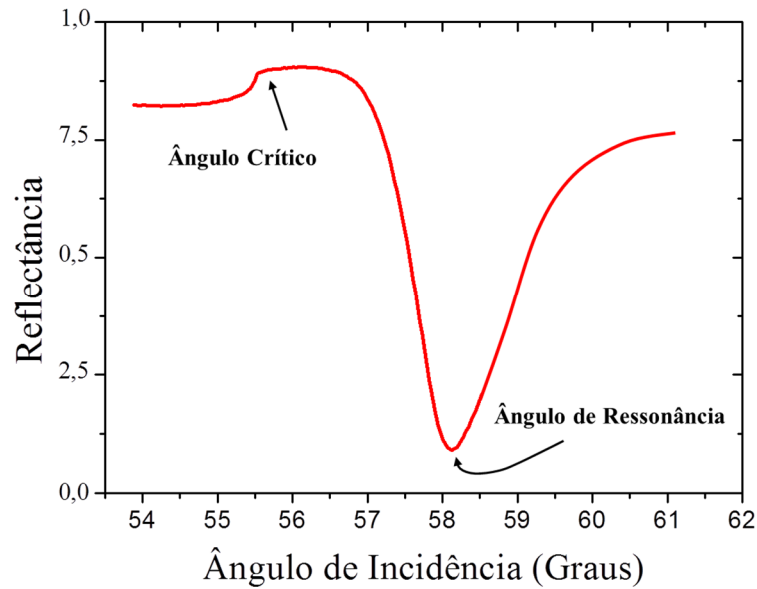
$$r_{23} = \frac{\varepsilon_2 k_3 - \varepsilon_3 k_2}{\varepsilon_2 k_3 + \varepsilon_3 k_2}, \quad (7)$$

em que $k_i (i=1,2,3)$ representa a componente do vetor de onda no meio i , ortogonal à superfície metálica.

A Figura 2 apresenta a reflectância da estrutura ilustrada na Figura 1 em função do ângulo de incidência, exibindo o efeito de *RPS*, em que estão ilustrados o ângulo crítico e o ângulo de ressonância. O ângulo crítico, indicado na Figura 2 é obtido da condição (14)

$$\theta_c = \arcsen\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_3}{\varepsilon_1}}\right). \quad (8)$$

Figura 2 - Função reflectância, para a configuração de Kretschmann, registrada para um prisma de SF2, com filme de ouro $d = 55$ nm, em $\lambda = 975,1$ nm, admitindo um meio externo aquoso com $n_s = 1,333$.



Fonte: autor.

2.2 Parâmetros Característicos da RPS

O efeito de *RPS* depende dos parâmetros ópticos e estruturais dos meios envolvidos. A linha de absorção ressonante apresentada na Figura 2, possibilita obter com alta precisão os parâmetros do filme metálico e do meio externo. O fato de a absorção ressonante estar situada numa região angular bastante estreita permite que o efeito seja usado para detectar pequenas variações da permissividade do meio externo, princípio básico utilizado na elaboração de sensores. Pelo estudo e análise de alguns parâmetros é possível determinar as características

otimizadas dos elementos utilizados no desenvolvimento de sensores baseado em *RPS*. Os três parâmetros que podem ser otimizados para obter maior sensibilidade são a meia largura de linha w_{PS} , o ângulo de ressonância θ_{PS} , e o valor mínimo da reflectância na condição de ressonância $R_{\min}$, ilustrados para uma aproximação lorentziana na Figura 3.(15).

A aproximação lorentziana para a reflectância, ilustrada na Figura 3, possibilita entender os parâmetros que definem a curva de *RPS*. Essa aproximação é válida na região angular próxima ao ângulo de ressonância, que permite expressar a função reflectância da seguinte forma (16)

$$R(k_x) \approx 1 - \frac{(1 - R_{\min}) K''^2}{(k_x - K')^2 + K''^2}, \quad (9)$$

em que,

$$k_x = \sqrt{\epsilon_1} k_0 \sin \theta \quad (10)$$

e

$$K' = \sqrt{\epsilon_1} k_0 \sin \theta_{PS}, \quad (11)$$

sendo K' e K'' as partes real e imaginária da componente x do vetor de onda do *PS*, respectivamente e $R_{\min}$ a reflectância mínima na condição de ressonância $k_x = K'$. Na Figura 3, a reflectância média é dada por

$$\bar{R} = \frac{1}{2} (1 + R_{\min}). \quad (12)$$

Considerando, como indicado na Figura 3, que $R = \bar{R}$ se $|K''| = k_x - K'$ é possível escrever

$$|K''| = \sqrt{\epsilon_1} k_0 [\sin \theta_{PS} - \sin(\theta_{PS} - w_{PS})]. \quad (13)$$

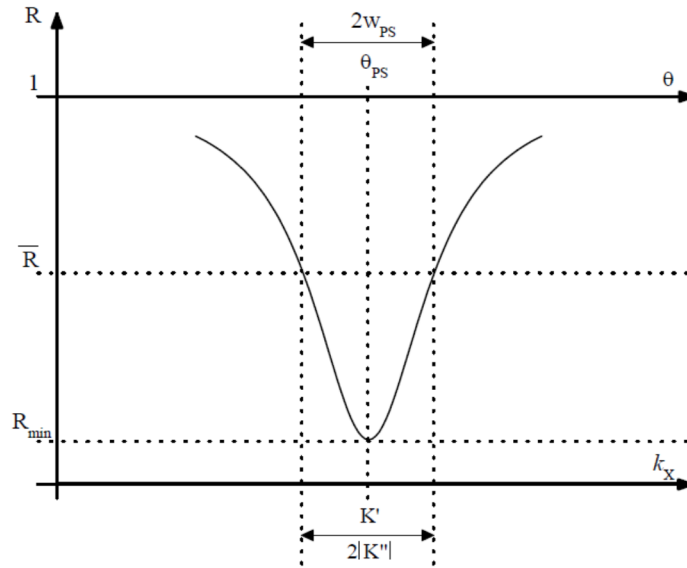
Para pequenas perdas tem-se que $|K''| \ll K'$, ou equivalentemente $w_{PS} \ll \theta_{PS}$. Para obter a dependência angular do efeito de *RPS* no regime de pequenas perdas, utiliza-se a aproximação de primeira ordem

$$\sin(\theta + \Delta\theta) \approx \sin \theta + \Delta\theta \cos \theta, \quad (14)$$

válida para $|\Delta\theta| \ll \theta$. Substituindo na Relação 13, $\theta = \theta_{PS}$ e $\Delta\theta = -w_{PS}$ tem-se que

$$|K''| = \sqrt{\varepsilon_1} k_0 w_{PS} \cos \theta_{PS}. \quad (15)$$

Figura 3 - Curva de ressonância e parâmetros representativos.



Fonte: Adaptado de E. Fontana (2006).

Substituindo na Equação 9 as Expressões 10, 11 e a Relação 15, que é simplificada com ajuda da aproximação em expansão de primeira ordem da Equação 14, é possível obter a dependência angular da curva de *RPS*

$$R(\theta) \approx 1 - \frac{(1 - R_{\min}) w_{PS}^2}{(\theta - \theta_{PS})^2 + w_{PS}^2}. \quad (16)$$

O ângulo abaixo ou acima do valor θ_{PS} , onde ocorre a máxima declividade da curva, está diretamente relacionado à sensibilidade do efeito perante modificações de índice de refração do meio adjacente à superfície metálica. Fontana (17) demonstrou que existe uma espessura ótima do filme metálico, para a qual o efeito *RPS* exhibe máxima sensibilidade ao índice de refração do meio adjacente, e obteve curvas de dependência espectral da espessura ótima, bem como os parâmetros característicos da curva de *RPS* para essa espessura ótima.

Curvas foram obtidas para três tipos de vidro e considerando vácuo ou solução aquosa como o meio adjacente. Por exemplo, para o caso do vidro SF2, no comprimento de onda 975,1 nm, utilizado no reflectômetro automatizado do Grupo de Fotônica, o efeito de *RPS* para um meio líquido, com índice de refração próximo àquele da água, ocorre em uma estreita região angular de largura da ordem de 0,02 graus, em torno do ângulo de ressonância, $\theta_{PS} \approx 56$ graus (15). Por essa razão, o prisma utilizado neste trabalho é um prisma equilátero feito de SF2, o que garante operação próxima ao ângulo de incidência normal relativamente a uma das faces, para observação do efeito de *RPS* em soluções aquosas, como é descrito com mais detalhe nos Capítulos 3 e 4.

2.3 Efeito de RPS no Desenvolvimento de Sensores Biomoleculares

No efeito de *RPS*, o número de onda k_{PS} depende do índice de refração do meio adjacente ao metal. Em aplicações em que a técnica é utilizada na caracterização de reações biomoleculares, as biomoléculas são inicialmente imobilizadas à superfície metálica. Esta é então exposta a uma solução biológica contendo, entre outros componentes, as biomoléculas que interagem especificamente com aquelas imobilizadas. Havendo a reação bio-específica, ocorre um crescimento da espessura do filme orgânico na superfície metálica. Essa variação de espessura média pode depender tanto da concentração de biomoléculas específicas, como do tipo de molécula, que chega ser de apenas alguns ângstroms. Esse processo pode ser modelado alternativamente como uma alteração local de índice de refração nas proximidades da interface (18).

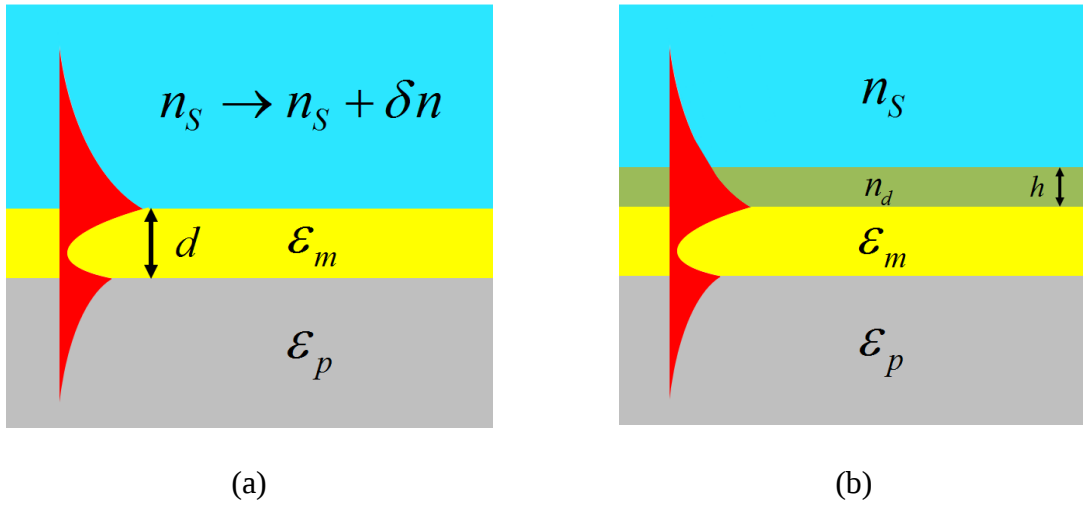
2.3.1 Variação do Índice de Refração do Meio Adjacente ao Metal

Na Figura 4-a ilustra-se a variação volumétrica homogênea de todo o índice de refração do meio externo e na Figura 4-b ilustra-se a variação superficial produzida por uma fina camada de espessura h , que é inferior ao comprimento de penetração do campo eletromagnético no meio dielétrico. A perturbação do número de onda é denotada por

$$\delta k_{PS} = k_{PS} - \bar{k}_{PS}, \quad (17)$$

em que $\bar{k}_{PS}$ é o número de onda não perturbado.

Figura 4 - (a) variação do índice de refração volumétrico e (b) superficial do meio externo.



Fonte: autor.

Na Figura 4 o filme de espessura h tem índice de refração n_d e o índice externo tem índice de refração n_s e ε_p e ε_m correspondem às permissividades relativas do prisma e do metal de espessura d , respectivamente. Na Figura 4-a o parâmetro k_{ps} é influenciado por uma variação δn no índice de refração do meio externo, enquanto que na Figura 4-b, k_{ps} é afetado por uma variação δh na espessura do filme orgânico e índice de refração n_d .

2.3.1.1 Variação do Índice de Refração Volumétrico

Do ponto de vista teórico, a variação em k_{ps} , como consequência da alteração do índice de refração do meio externo da forma $n_s \rightarrow n_s + \delta n$, pode ser analisada pela teoria de perturbação de guias de onda, que teoricamente é muito similar à teoria que explica a excitação de PS pela configuração de Kretschmann utilizada neste trabalho (19).

A influência da variação δn , pode ser obtida de forma simplificada assumindo que os meios que constituem a interface metal-dielétrico, sejam semi-infinitos. Para pequenas alterações da constante dielétrica do meio externo, pode-se assumir que os campos na interface permaneçam praticamente inalterados tal que $|k_{ps} - \bar{k}_{ps}| \ll |k_{ps}|$. Utilizando a Equação 1 com $\varepsilon_2 = \varepsilon_m$, $\varepsilon_3 = n^2$, obtém-se

$$\delta k_{PS_{\text{Volumétrica}}} = k_{PS} - \bar{k}_{PS} = \frac{(k_{PS})^3}{k_0^2 n^3} \delta n. \quad (18)$$

É possível reescrever a perturbação δk_{PS} em função do índice de propagação efetivo N_{PS} , definido pela relação

$$N_{PS} \equiv \frac{k_{PS}}{k_0}, \quad (19)$$

o que fornece

$$(\delta k_{PS}/k_0)_{\text{Volumétrico}} = \left(\frac{N_{PS}}{n} \right)^3 \delta n. \quad (20)$$

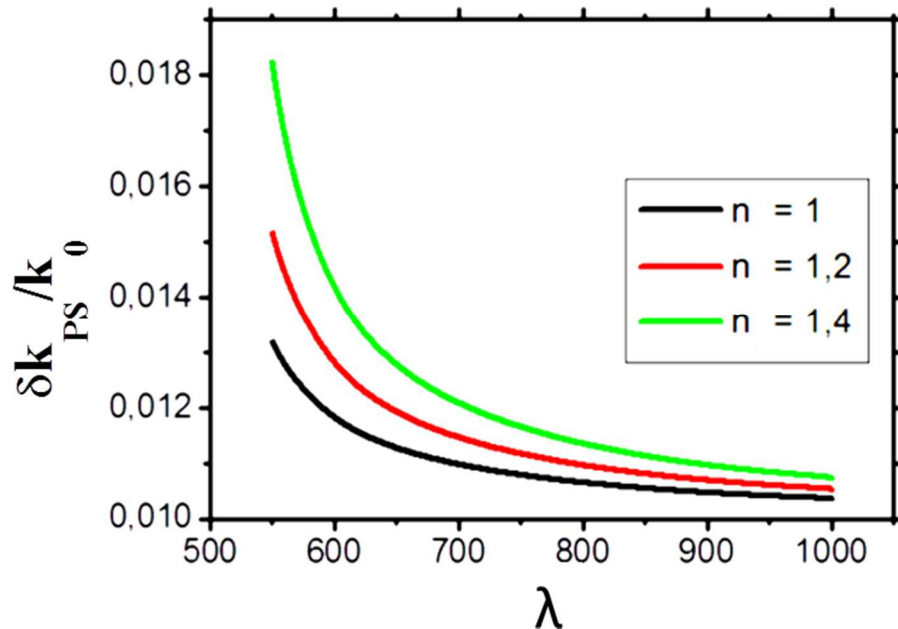
Na faixa do infravermelho, se observa que metais nobres como o ouro, a prata e o cobre têm parte real da permissividade complexa satisfazendo à relação $|\text{Re}(\varepsilon_m)| \gg n^2$ (20). Além disso, para esses metais, tem-se $|\text{Re}(\varepsilon_m)| \gg |\text{Im}(\varepsilon_m)|$ e nessas condições, com o emprego da Equação 1, a Equação 20 pode ser reescrita na forma

$$(\delta k_{PS}/k_0)_{\text{Volumétrico}} \approx \left(\frac{\text{Re}(\varepsilon_m)}{\text{Re}(\varepsilon_m) + n^2} \right)^{3/2} \delta n. \quad (21)$$

A Figura 5 mostra a variação do número de onda do *PS* de uma única interface metal-dielétrico, no caso da interface ouro-dielétrico para uma variação de índice de refração volumétrico do meio dielétrico, assumindo distintos valores de n com as constantes ópticas de (21) e tomando como variação do índice de refração do meio externo $\delta n = 0,01$.

Na Figura 5 observa-se que a variação relativa de δk_{PS} diminui à medida que aumenta o comprimento de onda e aumenta com o valor do índice de refração do meio externo. Por outro lado há também uma redução significativa na meia largura de linha da *RPS*, com o aumento do comprimento de onda e pequenas variações de número de onda resultam em grandes variações na intensidade da luz refletida na configuração de Kretschmann.

Figura 5 - Variação relativa do número de ondas do PS de uma interface simples metal-dielétrico para uma variação de índice de refração volumétrico de $\delta n = 0,01$ do meio externo para valores distintos de n .



Fonte: adaptado de D. Regatos (2012).

2.3.1.2 Variação do Índice de Refração Superficial

As expressões anteriormente calculadas correspondem a uma variação do índice de refração volumétrico, ou seja, em todo o meio externo. Entretanto, nas aplicações em biossensores as variações de índice de refração devidas a reações biológicas são produzidas unicamente em uma região próxima à superfície metálica, conforme ilustrado na Figura 4-b. Portanto, unicamente uma parte da onda evanescente interagirá com a camada biológica reagente. A fração do campo evanescente empregada na detecção depende do tamanho do agente molecular e da intensidade e comprimento de penetração do campo eletromagnético.

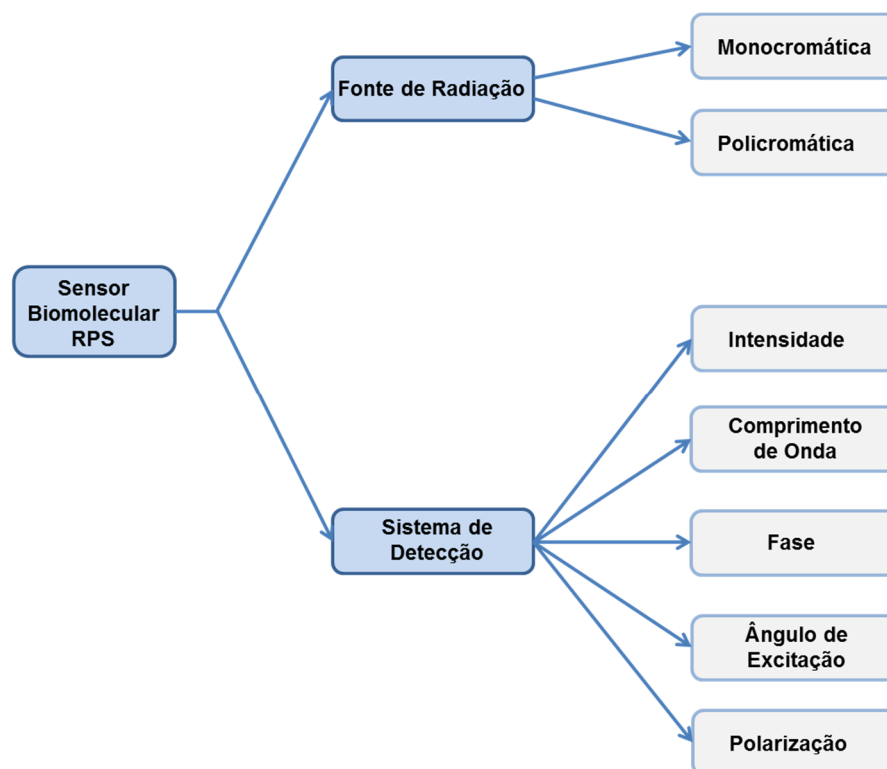
Em algumas aplicações a reação biomolecular se dá com o conhecimento do filme orgânico adsorvido à superfície metálica (22). A espessura desse filme h é da ordem das dimensões físicas de proteínas ou outras macromoléculas biológicas e é tal que $h \ll \lambda$. Nesse regime, $\delta k_{PS} \propto h$. Em outras situações há uma camada de espessura fixa h de material polimérico que atua como uma matriz em que biomoléculas ficam imobilizadas e a reação biomolecular ocorre no interior dessa matriz (15).

A dimensão h da matriz é da ordem da profundidade de penetração do campo eletromagnético associado ao PS no meio externo. Nesse caso a reação biomolecular produz uma variação δn_d no índice de refração da matriz, e no regime de pequenas variações tem-se $\delta k_{PS} \propto \delta n_d$.

2.4 Diferentes Formas de Detecção em Sensores RPS

Os sensores de reações biomoleculares baseados na técnica da RPS são compostos basicamente por três elementos fundamentais: a fonte de radiação, a configuração óptica e finalmente o princípio de detecção. No método de acoplamento de Kretschmann, é possível fazer uma classificação em função do tipo de fonte de radiação utilizada e do sistema de detecção empregado. A Figura 6 apresenta um diagrama que mostra a classificação dos sensores biomoleculares, em função do tipo de fonte de radiação utilizada (radiação monocromática ou policromática), ou em função do sistema de detecção utilizado (21).

Figura 6 - Classificação dos sensores biomoleculares RPS , baseados em acoplamento por prisma.



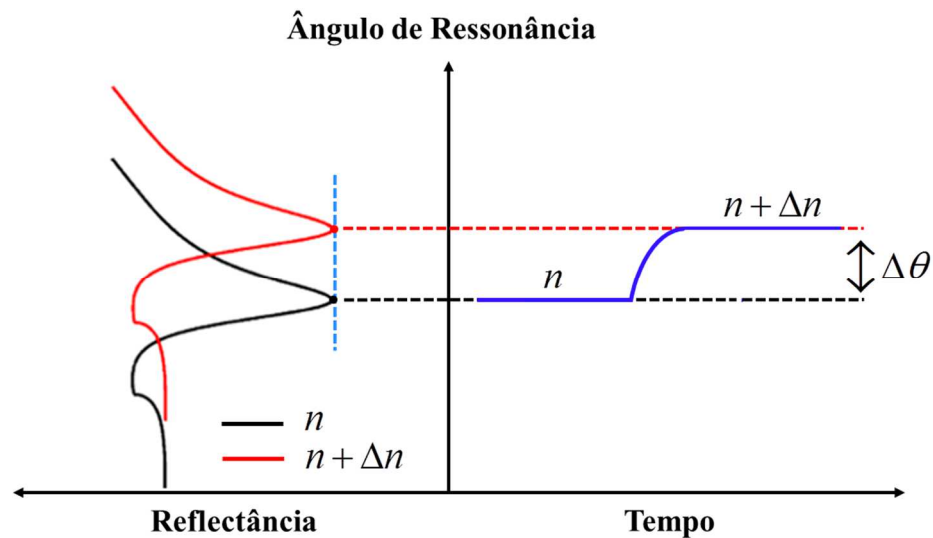
Fonte: autor.

Entre as diferentes formas de medição usadas em biossensores baseados em *RPS* duas se destacam já que são as configurações mais utilizadas: os sensores baseados na medição da intensidade de luz refletida na interface metal-dielétrico e os sensores que medem as variações do ângulo de ressonância, utilizando em ambos os casos uma fonte de radiação monocromática. Além dessas, existe uma terceira configuração na qual são medidas as variações do comprimento de onda na ressonância, quando o sistema permanece em um ângulo fixo utilizando uma fonte de luz policromática.

2.4.1 Sensor RPS Baseado na Determinação da Variação do Ângulo θ_{PS}

O sensor *RPS* angular monitora as variações do ângulo θ_{PS} , ou seja, o ângulo de ressonância. A Figura 7 mostra dois espectros de *RPS* com ângulos θ_{PS} diferentes, que correspondem respectivamente a meios externos, com índices distintos.

Figura 7 - Princípio de detecção de variações no índice de refração, a partir da medição do desvio do ângulo de ressonância.



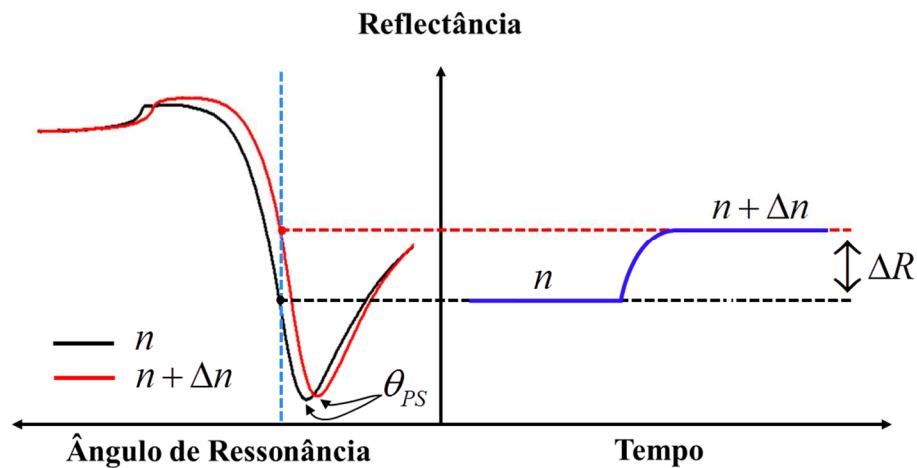
Fonte: autor.

Na Figura 7 $\Delta\theta$ representa a diferença do ângulo de ressonância entre duas amostras com índice de refração n e $n + \Delta n$.

2.4.2 Sensor RPS Baseado na Determinação da Variação da Reflectância

O sensor *RPS* de intensidade monitora a variação na reflectância para um ângulo fixo, geralmente o ângulo em que a derivada da curva de reflectância é máxima. A forma como é realizada a medição de índices de refração esta ilustrada na Figura 8.

Figura 8 - Modo de detectar variações no índice de refração, a partir da medição do ΔR .



Fonte: autor.

Na Figura 8 ΔR corresponde à diferença de reflectância entre duas curvas para o mesmo ângulo de incidência, que mostra a variação para distintas amostras com índices de refração n e $n + \Delta n$. Os sensores biomoleculares baseados na variação angular e de intensidade são empregados com mais frequência em dispositivos comerciais, devido a sua versatilidade, simplicidade e baixo custo.

2.5 Formulação para Determinar o Índice de Refração a partir das Curvas RPS

Para determinar o índice de refração de uma amostra líquida, só é necessário conhecer o ângulo crítico e o índice de refração do prisma para um determinado comprimento de onda. Estes parâmetros são relacionados por

$$\theta > \theta_C = \text{sen}^{-1}(n_s/n_p) \quad (22)$$

A caracterização do efeito de *RPS* é feita pela medição da intensidade de luz refletida no fotodetector ilustrado na Figura 42. O efeito ressonante é observado em uma estreita faixa angular dentro daquela em que ocorreria reflexão interna total na ausência do filme metálico (17), i.e.,

Para ter uma estimativa da sensibilidade do ângulo de ressonância relativamente ao índice de refração, pode-se utilizar a aproximação para a condição de ressonância obtida para o caso de interface metal-dielétrico, ambos considerados semi-infinitos. Assumindo válida a hipótese de um metal nobre de baixas perdas, satisfazendo a $\kappa^2 \gg n^2, n_s^2$ para pequenas variações Δn_s no índice de refração da solução (17), a variação do ângulo de ressonância pode ser posta na forma

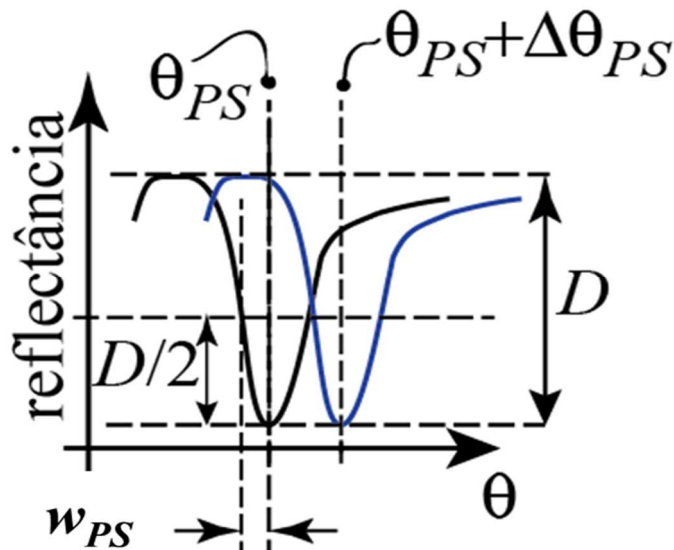
$$\Delta\theta_{PS} \approx \text{tg}\theta_{PS}(\Delta n_s/n_s) . \quad (23)$$

A sensibilidade da técnica depende de quão pequena seja a meia largura à meia altura w_{PS} da curva de ressonância, ilustrada na Figura 9. A magnitude da declividade da função reflectância R à meia altura, conforme indicado na Figura 9, é aproximadamente (17)

$$\Delta R/\Delta\theta \approx D/(2w) , \quad (24)$$

em que D é a faixa dinâmica, indicada na figura.

Figura 9 - Caracterização dos espectros *RPS* para a determinação do índice de refração.



Fonte: autor.

Para uma variação $\Delta\theta = \Delta\theta_{ps}$, as Equações 23 e 24 fornecem

$$\Delta R = Q_{ps} (\Delta n_s / n_s), \quad (25)$$

em que

$$Q_{ps} = \frac{D}{2w} \operatorname{tg}(\theta_{ps}), \quad (26)$$

é definido como o fator de qualidade da curva de *RPS*. A Expressão 26 mostra que para uma dada variação relativa do índice de refração da região vizinha à superfície metálica, a variação de sinal será tanto maior quanto maior for o fator de qualidade. Com base nos dados da ref.(17), para $\lambda=975,1$ nm, no caso de filme de ouro e prisma de vidro SF2, assumindo o valor tabelado do índice de refração da água destilada em $T=300$ K de aproximadamente $n_s \approx 1,333$ tem-se $\theta_{ps} \approx 56$ graus, $w \approx 1,7$ mrad e (2.26) fornece $Q_{ps} \approx 440$, para $D=1$. Assumindo, por exemplo, uma relação sinal ruído típica de 1000, estima-se, com o uso da Equação 25, um limite de detecção de $\Delta n_s / n_s \approx 2 \times 10^{-6}$.

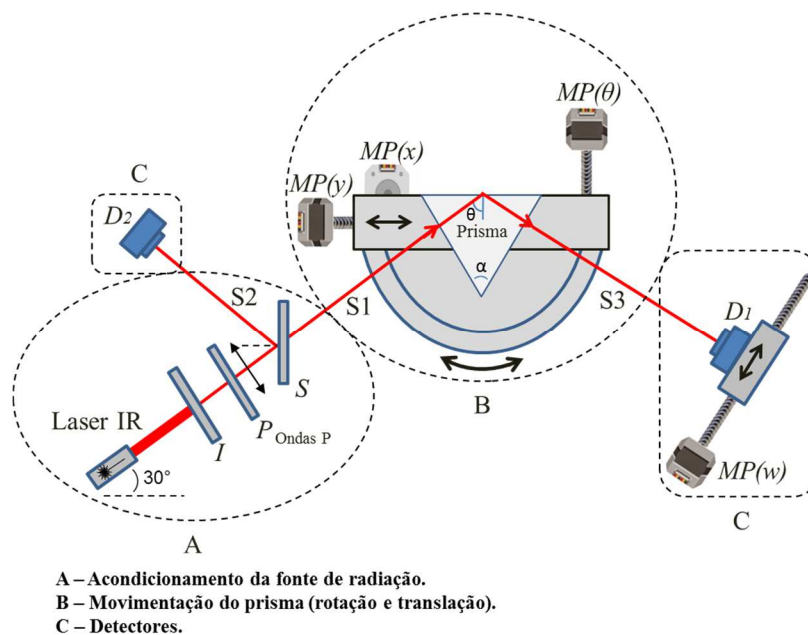
3 REFLECTÔMETRO AUTOMATIZADO E SISTEMA DE INFUSÃO

O processo de construção e desenvolvimento de sensores baseados no efeito *RPS* é um procedimento que demanda a convergência de vários campos do conhecimento e a utilização de equipamentos especializados. Para realizar esse trabalho foram utilizados principalmente dois sistemas desenvolvidos no laboratório de Sensores e Instrumentação (LSI) do Grupo de Fotônica do DES-UFPE: o reflectômetro automatizado (23) e o módulo de infusão (24). Neste capítulo serão detalhados os sistemas e a metodologia utilizada para sua caracterização e integração. É também descrita uma metodologia mais eficiente de alinhamento e de operação na caracterização de processos dinâmicos em meios aquosos, tais como aqueles encontrados em aplicações de biossensores.

3.1 Ajuste do Reflectômetro Automatizado

O reflectômetro utilizado é um equipamento de alta precisão, que possui entre suas aplicações a possibilidade de determinar propriedades ópticas e estruturais de interfaces e o desenvolvimento de sensores biológicos, conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Diagrama esquemático do reflectômetro. D_1 e D_2 são os fotodetectores de sinal e referência, respectivamente, I – Íris, P – Polarizador, S – Splitter, $MP(\theta)$ – Motor de passo do estágio de rotação, $MP(x)$ – motor de passo de translação x , $MP(y)$ – Motor de passo para translação y , $MP(w)$ – Motor de passo para correção do fotodetector D_1 .



Fonte: autor.

A operação do reflectômetro da Figura 10, inclui várias etapas, que devem ser bem executadas para obtenção de espectros de ressonância bem definidos. As etapas mais importantes na adequação do sistema são: o acondicionamento da fonte de radiação, a movimentação do prisma (rotacional e translacional) e o controle, detecção e processamento de sinais.

O reflectômetro pode empregar diferentes tipos de prisma, como por exemplo, prisma isósceles de ângulo reto de vidro BK7 ($n=1,515$, em $\lambda=975,1\text{ nm}$), utilizado geralmente em experimentos com gases, ou prisma equilátero de vidro SF2 ($n=1,643$, em $\lambda=975,1\text{ nm}$), ambos disponíveis no laboratório. O emprego do prisma de vidro SF2 permite realizar testes com soluções aquosas, já que desloca a linha *RPS* para as proximidades da região angular em torno da direção normal à face de entrada do prisma. Nessas condições o sistema opera com a face superior do prisma posicionada praticamente no plano horizontal, facilitando assim o posicionamento da célula de infusão.

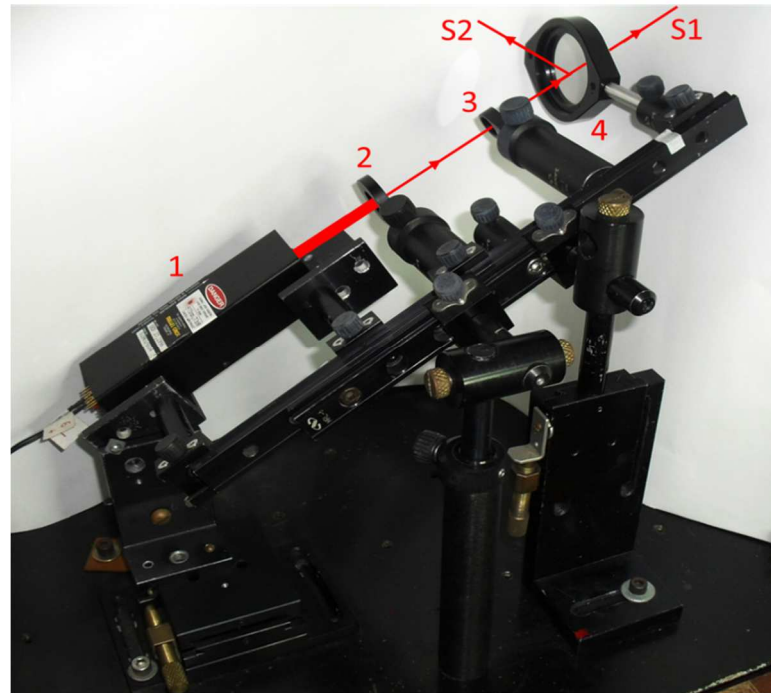
O prisma de vidro SF2 utilizado em todos os experimentos deste trabalho, tem aresta de 50 mm, e valores nominais para o ângulo interno de $\alpha = 60$ graus, como ilustrado na Figura 10.

3.1.1 Acondicionamento do Laser

Para obter a polarização de ondas *p*, o reflectômetro emprega uma fonte de radiação laser acondicionada em um suporte linear, conforme ilustrado na Figura 11. Os elementos utilizados para o acondicionamento do laser são: uma fonte de emissão laser de estado sólido não polarizada, marca Melles Griot, com comprimento de onda no infravermelho centrado em 975,1 nm, e potência de 73 mW, uma íris (*I*), um polarizador (*P*) e um semi-espelho (*S*), dispostos conforme a Figura.11.

O feixe do laser utilizado neste trabalho possui um diâmetro da ordem de 1 cm, a fim de reduzir esse diâmetro o feixe passa através de uma íris [2] sendo obtido um raio com um diâmetro de aproximadamente 1mm. O feixe é então polarizado no plano de incidência pelo polarizador *P*, número [3] da Figura 11. Uma vez que o feixe se encontra colimado e polarizado, é dividido em dois feixes por meio de um semi-espelho: (*S1*) em direção ao prisma e (*S2*) em direção ao fotodetector de referência *D*₂, que em conjunto com o fotodetector *D*₁, produzem os sinais que permitem determinar a reflectância, como detalhado na seção 3.1.3.

Figura 11 - Fotografia das partes utilizadas no acondicionamento do laser. [1] Laser Infravermelho $\lambda = 971,1\text{nm}$; [2] Íris (*I*); [3] Polarizador no plano de incidência (*P*) e [4] Semi-espelho (*S*).



Fonte: autor.

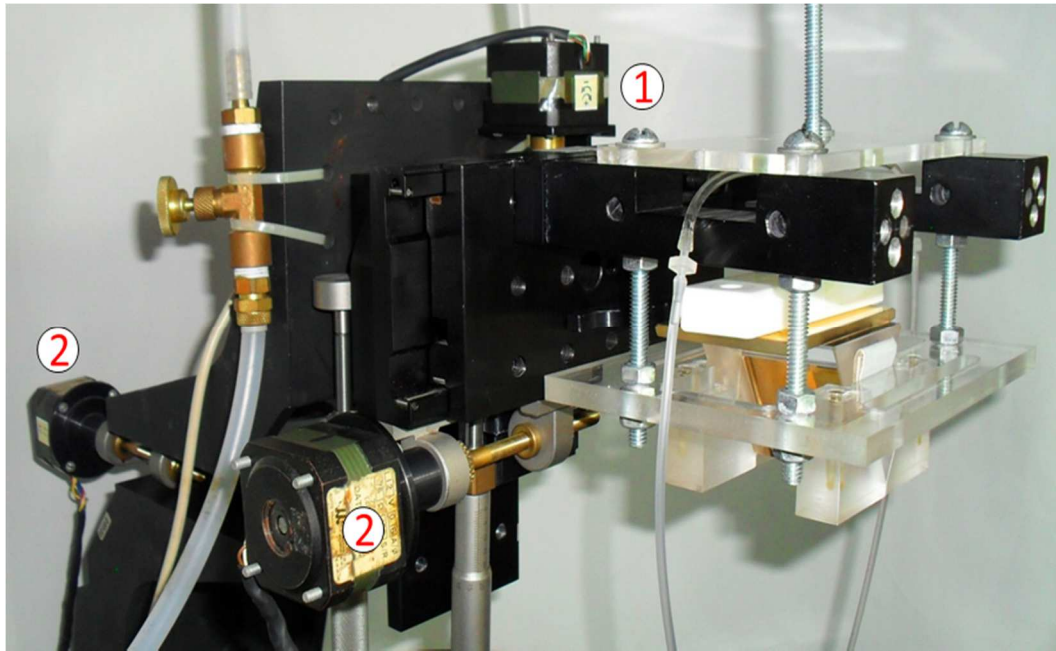
3.1.2 Posicionamento do Prisma

Devido ao ângulo de ressonância para o ouro em contato com um meio aquoso ser próximo de 60 graus, foi necessário para este trabalho trocar o prisma de ângulo reto de vidro BK7 por um prisma equilátero de vidro SF2. Com isso a operação do sistema ocorre com a face metalizada do prisma posicionada praticamente paralela ao plano horizontal. Uma vez que suportes distintos têm de ser usados, um novo e mais eficiente procedimento de alinhamento do prisma equilátero de SF2 foi desenvolvido.

Para garantir que o prisma equilátero realize os movimentos tanto de rotação como de translação (eixos x e y), o reflectômetro possui um sistema mecanizado que permite fixar o prisma em um suporte com liberdade de rotação em torno do eixo que passa pelo incentro da face triangular do prisma, com movimento controlado pelo motor de passo $MP(\theta)$ (número 1), apresentado na Figura 12. Também é possível realizar movimentos de translação ao longo de duas direções ortogonais, no plano do substrato de vidro, que podem ser realizadas por meio dos motores de passo $MP(x)$, $MP(y)$ (número 2), conforme ilustrado na Figura 12. Os motores

de passo são acionados independentemente por um sistema de controle conectado a um PC que também é utilizado para aquisição e processamento dos dados.

Figura 12 - Mecanismo de posicionamento do prisma. [1] $MP(\theta)$ – Motor de Rotação; [2] $MP(x)$ – Motor de Translação em x e [3] $MP(y)$ – Motor de Translação em y.

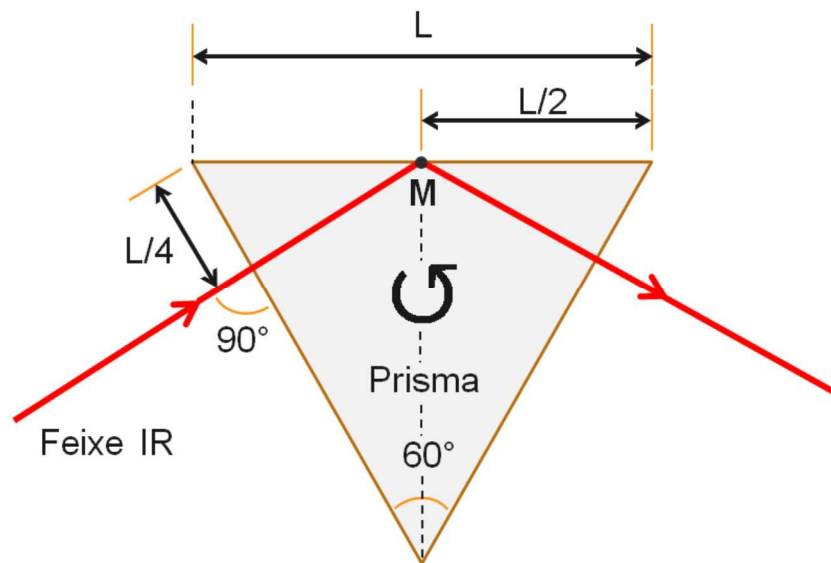


Fonte: autor.

3.1.3 Alinhamento e Calibração Óptica do Prisma

A metodologia de alinhamento do prisma no reflectômetro, proposta por Cavalcanti (25), estabelece que no momento de trocar o prisma de acoplamento, por outro com geometria e dimensões diferentes, o sistema tem de ser realinhado. É necessário garantir que o feixe do laser que incide perpendicularmente na face de entrada do prisma incida na parte central da face superior, conforme ilustrado na Figura 13, e o prisma rotacione em torno do incentro. Esta é uma posição bem definida e denominada de ponto de referência (M) (23).

Figura 13 - Configuração do prisma para definição do ponto de referência.



Fonte: autor.

Cavalcanti (23), detalha o protocolo com os passos para conseguir alinhar de maneira correta o sistema para um prisma de ângulo reto. Uma vez que neste trabalho foi utilizado um prisma equilátero foi necessário além de seguir o protocolo mencionado, realizar algumas modificações e acrescentar novos passos ao procedimento. A seguir indicam-se os 4 procedimentos de interesse no alinhamento do sistema.

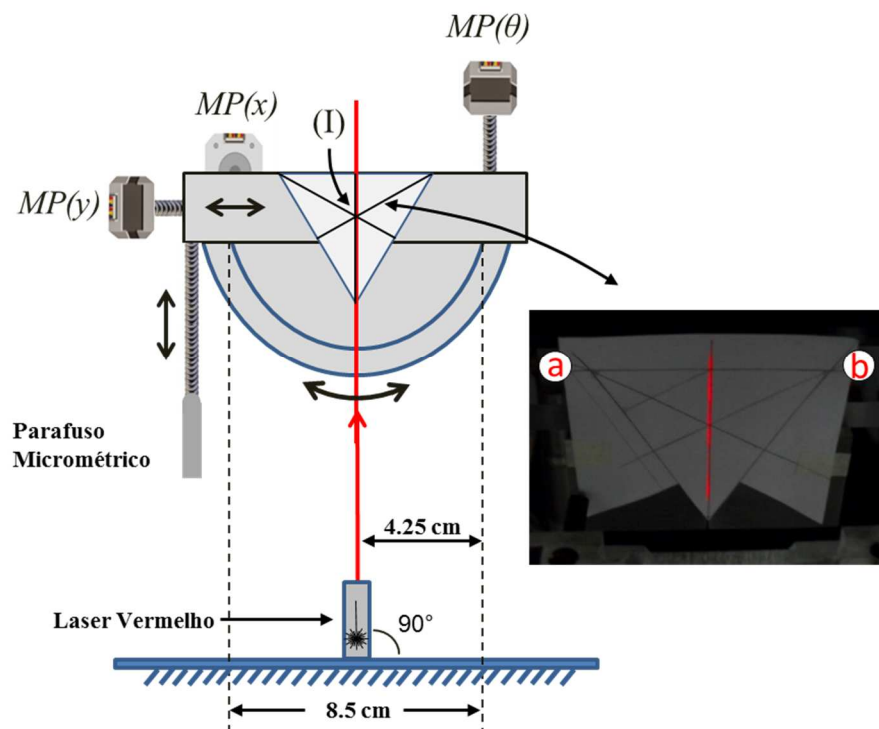
- Protocolo para rotação do prisma em torno do seu incentro.
- Definição de pontos de referência translacional e rotacional.
- Protocolo de detecção controle e processamento de dados.
- Protocolo de calibração dos fotodetectores.

3.1.4. Protocolo para Rotação do Prisma em Torno do seu Incentro

Para o correto funcionamento do reflectômetro, é necessário verificar se a rotação do prisma está sendo realizada em torno de seu incentro (I) (23). A fim de realizar esse alinhamento, antes de colocar o laser incidindo de forma perpendicular, são realizados os seguintes passos:

1. Para o alinhamento do sistema (reflectômetro) é utilizado um laser vermelho, localizado em baixo do suporte do prisma, garantindo que o feixe fique na metade do estágio de rotação e de maneira perpendicular à mesa óptica e à superfície superior do prisma, conforme ilustrado na Figura 14.
2. Faz-se um desenho em papel da face triangular do prisma com marcas que indiquem o incentro (I). Desenho que posteriormente é colado na posição lateral do prisma como mostrado na Figura 14.
3. Movimentam-se os motores $MP(x)$, $MP(y)$ e $MP(\theta)$, com ajuda do software Auto RPS, que permite controlar todos os movimentos das peças do sistema automaticamente (23). O controle manual também é permitido. Assim é possível fazer com que o feixe vermelho fique alinhado com a linha vertical do desenho, conforme ilustrado na Figura 14.

Figura 14 - Procedimento para alinhar o prisma para rotação em torno do incentro (I).



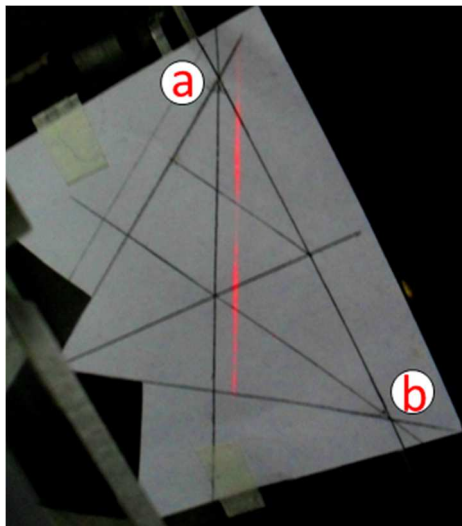
Fonte: autor.

4. Aplica-se uma rotação no sentido horário ou anti-horário de um ângulo conhecido, usando o aplicativo AutoRPS (23), e alinha-se visualmente o feixe vermelho com as linhas que emergem dos vértices (a) e (b), conforme ilustrado na Figura 15.

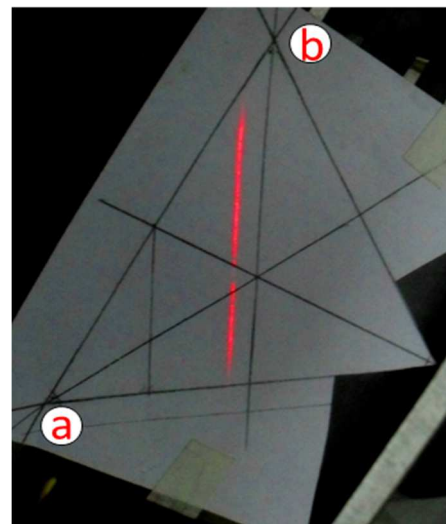
As Figuras 15-a y 15-b correspondem a rotações nos sentidos horário e anti-horário respectivamente, indicando que o prisma tem que subir para chegar na posição certa, (a separação entre o feixe vermelho e a linha paralela, corresponde à distância que deve ser movimentado o estágio de rotação). Esta movimentação é feita com ajuda do parafuso micrométrico que desloca o estágio de rotação na direção vertical.

As Figuras 15-c e 15-d, correspondem a rotações nos sentidos horário e anti-horário, respectivamente, indicando que o prisma deve baixar, seguindo procedimento idêntico ao indicado para o caso das Figuras 15-a e 15-b.

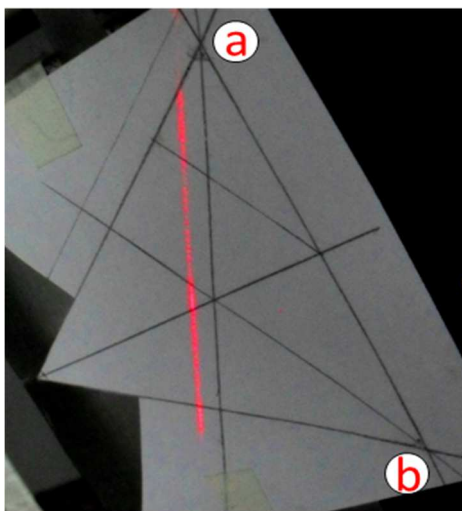
Figura 15 - Procedimento para alinhar o prisma para que gire em torno do incentro.



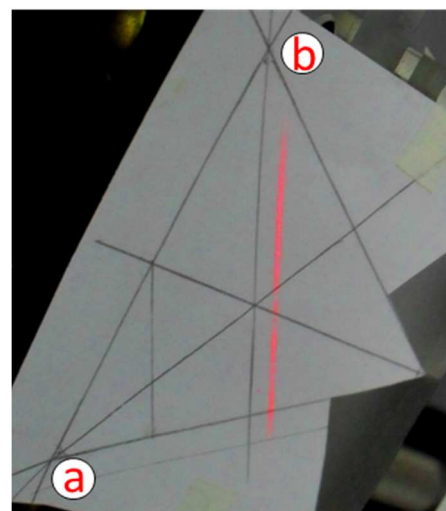
(a)



(b)



(c)



(d)

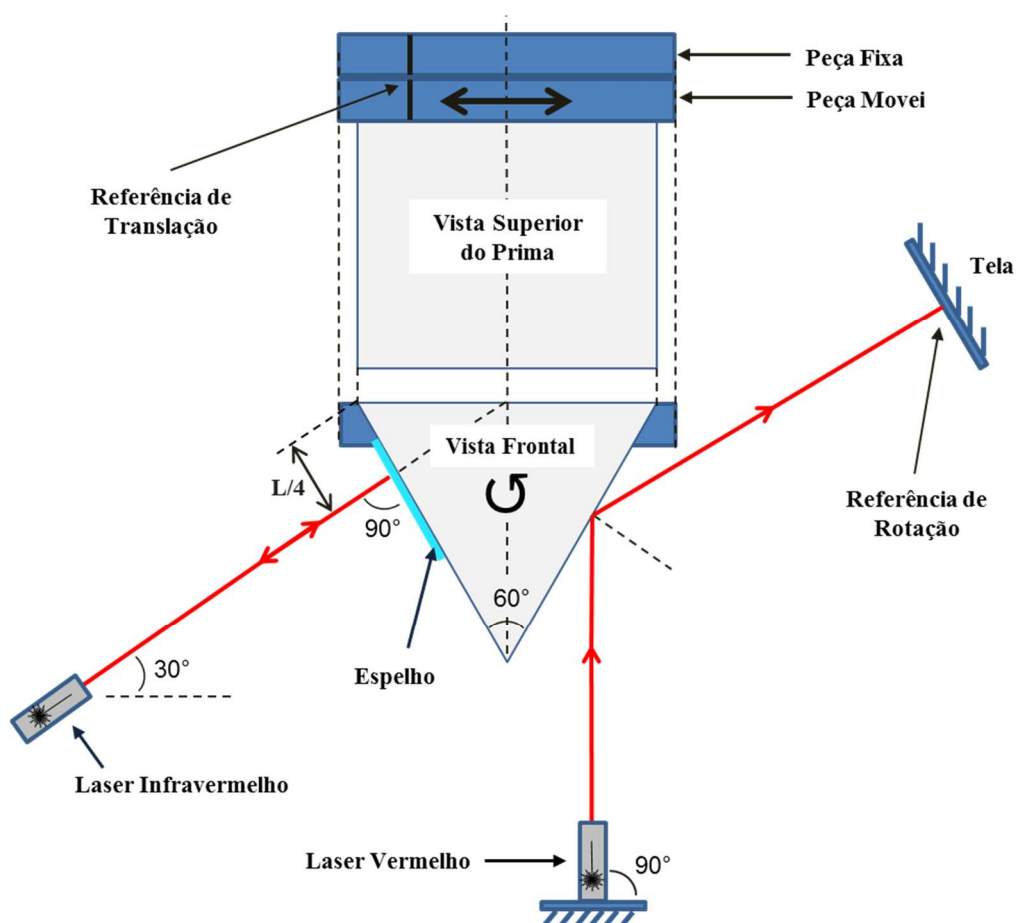
Fonte: autor.

3.1.5 Definição de Pontos de Referência Translacional e Rotacional

O sistema de controle do reflectômetro tem a capacidade de armazenar a posição de translação e a de rotação uma vez que seja fechado o aplicativo. No entanto, um desligamento inoportuno, causado por falta de energia, por exemplo, pode provocar perda de informação, razão pela qual, depois de alinhar o prisma para que gire em torno do incentro, é necessário gravar os pontos de referência nas posições de translação e rotação, com o objetivo de evitar um novo procedimento de alinhamento.

Para marcar o ponto de referência de translação é necessário na parte superior do suporte do prisma fazer uma linha que indique o deslocamento entre as partes fixa e móvel (linha contínua indica deslocamento zero na translação), ilustrada na Figura 16. O ponto de referência rotacional pode ser registrado ao marcar em uma tela afastada do prisma a posição do feixe refletido na face lateral do prisma, indicando desta maneira rotação zero quando o feixe refletido coincide com o ponto de referência, conforme esquema da Figura 16.

Figura 16 - Alinhamento translacional e rotacional do prisma.



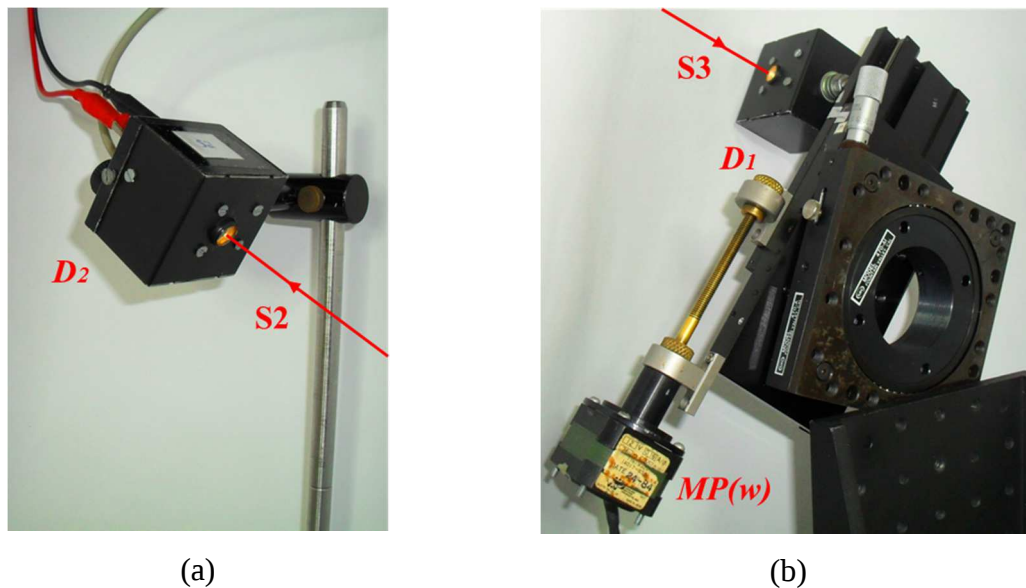
Fonte: autor.

Uma vez determinados os pontos de referência de translação e rotação, tem que se garantir que o laser infravermelho incida no ponto de referência (M). Para isso o feixe do laser deve incidir perpendicularmente na face lateral do prisma na posição de $L/4$, procedimento realizado com ajuda de um espelho como se indica na Figura 16.

3.1.6 Protocolo de Detecção, Controle e Processamento

O processo de detecção envolve os feixes do laser S2 e S3 que incidem respectivamente nos fotodetectores D_2 (fotodetector de referência) e D_1 (fotodetector de sinal), ambos mostrados na Figura 17. Sendo S2 o feixe refletido no semi-espelho e S3 o feixe transmitido no ar depois que o feixe S1 reflete-se na interface metal-liquido.

Figura 17 - (a) Fotodetector de referência D_2 e (b) fotodetector de sinal D_1 .



Fonte: autor.

O fotodetector D_2 , sempre em posição fixa, mede a intensidade do feixe S2, com o objetivo de eliminar qualquer flutuação na potência do laser. O segundo fotodetector D_1 é movimentado pelo motor de passo $MP(w)$, mantendo-o na posição de máxima intensidade refletida. Os dois sinais gerados por esses fotodetectores são processados e monitorados por dois canais de um conversor analógico-digital DAS-16, 100 kHz (Keithley Instruments, Cleveland, Ohio-EAU), instalado dentro de um PC que realiza o controle e processamento dos sinais de todo o sistema (23).

Para que seja realizada a etapa de processamento é necessário evitar as flutuações do sinal. Para otimizar a medida de refletância o sistema realiza 1000 medições, obtendo uma média da razão entre o sinal S_3 e a sinal de referência S_2 , medidas que junto com a razão S_1/S_2 , permitem determinar o valor da refletância, da face superior do prisma por meio da seguinte Equação

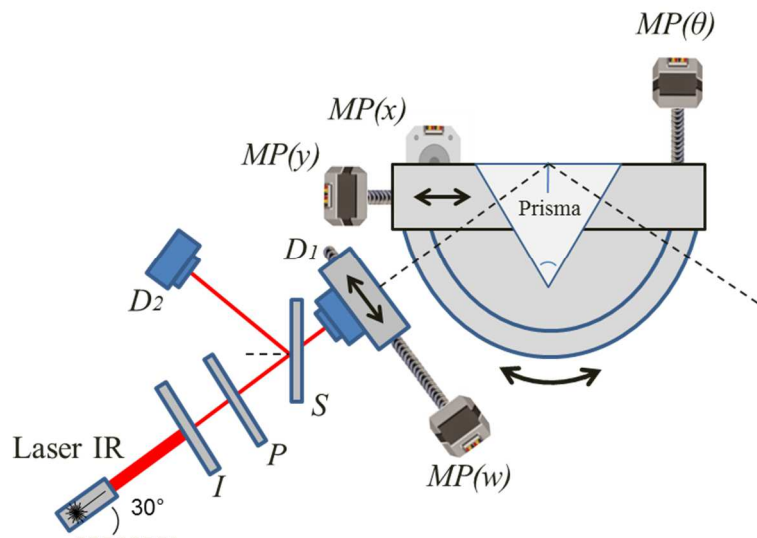
$$R = \frac{S_3/S_2}{S_1/S_2} = \frac{S_3}{S_1} . \quad (27)$$

Na Equação (3.1) a razão S_1/S_2 , é um valor invariável e independente das flutuações do nível de potência do laser. O procedimento de calibração dos fotodetectores é detalhado a seguir.

3.1.7 Protocolo de Calibração dos Fotodetectores

Para realizar a calibração dos fotodetectores, o feixe principal do laser é dividido em dois feixes pelo semi-espelho S , um dos quais incide no fotodetector de sinal D_1 , e o outro no fotodetector de referência D_2 , conforme ilustrado na Figura 18. Observa-se que durante a calibração, o detector D_1 capta o sinal antes de passar pelo prisma. A fim de eliminar as flutuações geradas pela fonte de luz laser, se determina a razão entre S_1 e S_2 , tal como se explicou anteriormente. Nesta configuração o sistema posiciona o detector D_1 procurando a maior intensidade de laser, fornecendo assim a maior razão.

Figura 18 - Calibração dos fotodetectores para a determinação da razão D_1/D_2 .

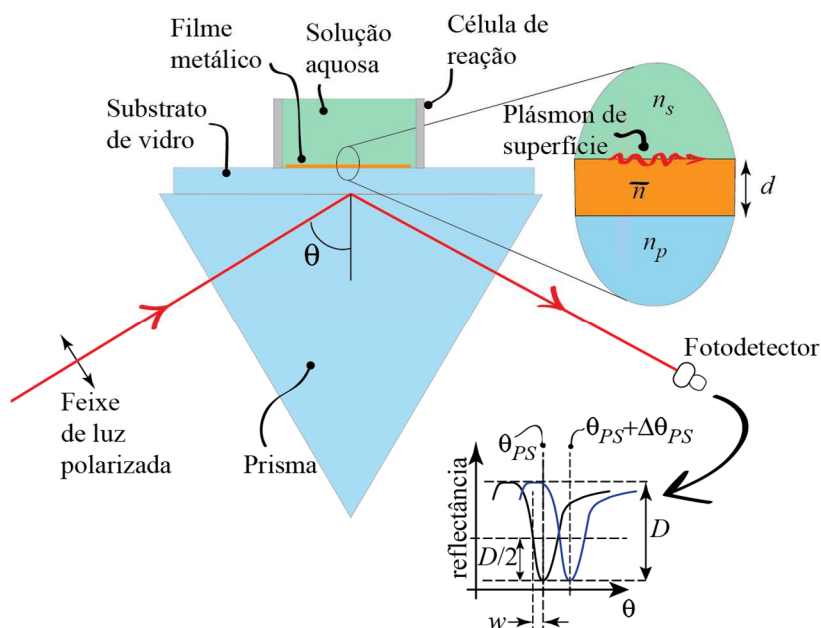


Fonte: autor.

3.2 Filme Metálico Como Superfície Sensora

O filme metálico utilizado no presente trabalho foi fabricado sobre um substrato de vidro BK7, com 4 mm de espessura e índice de refração $n=1,515$ em $\lambda=975,1\text{ nm}$, contendo uma bicamada de Cr (3 nm) e Au (54 nm – 99,999% de pureza). A fina camada de Cr tem como objetivo facilitar a aderência do filme de ouro ao substrato. A Figura 19 ilustra a configuração prisma-substrato-filme de ouro empregada nos experimentos deste trabalho.

Figura 19 - Configuração de Kretschmann para observação do efeito de RPS em interface metal-líquido.



Fonte: autor.

3.3 Sistema de Infusão

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

O sistema de infusão é composto por um *notebook* com interface gráfica criada em *Qt Creator*, um módulo de potência controlado por uma plataforma de desenvolvimento Arduino Mega e um conjunto de peças motorizadas com suporte para as seringas, conforme fotografia da Figura 20.

Figura 20 - Foto ilustrativa do sistema de infusão. 1. Notebook com interface gráfica criada em *Qt Creator*, 2. Módulo de potência controlado pelo Arduino Mega e 3. Peças motorizadas com suporte para as seringas.



Fonte: adaptado de J. R. Loibman (2013).

Este sistema é capaz de controlar independentemente a vazão em quatro seringas com volumes de alguns microlitros por minuto, função realizada por quatro peças motorizadas, que permitem trabalhar com 4 diferentes padrões de seringa (3, 5, 10 e 20 ml). Vale salientar que o sistema permite também adaptar seringas de insulina de 1ml, em qualquer peça motorizada e inserir seu volume na função de seringa de 10 ml, com o objetivo de obter vazões muito menores, necessárias em alguns experimentos, obtém-se nesse caso uma vazão mínima de 1 ml/hora, ou equivalentemente, $0,3\mu\text{l} / \text{seg}$ aproximadamente.

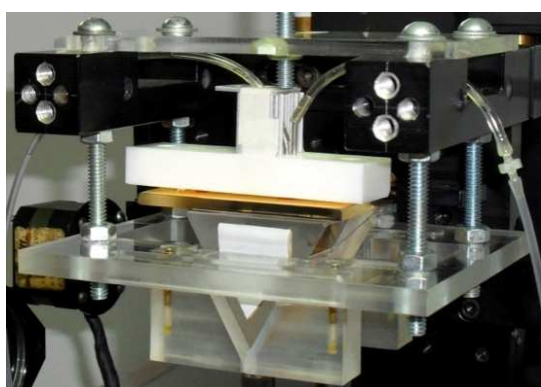
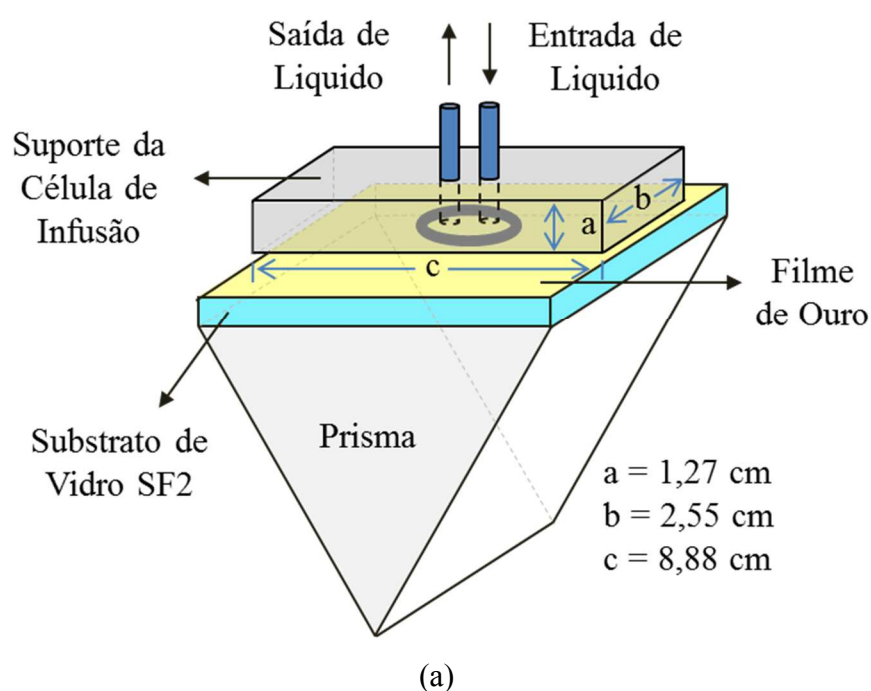
As seringas são comprimidas de maneira independente pelos êmbolos que são acionados por motores de passo com 200 passos por volta. Os motores são controlados pelo microcontrolador Arduino Mega que se comunica com o PC, por meio da conexão USB. Por meio de uma interface gráfica é possível selecionar o número de seringas com que se deseja trabalhar, o volume da seringa, o volume a ser inserido e o tempo no qual será realizado o procedimento (24).

3.3.1 Célula de Infusão

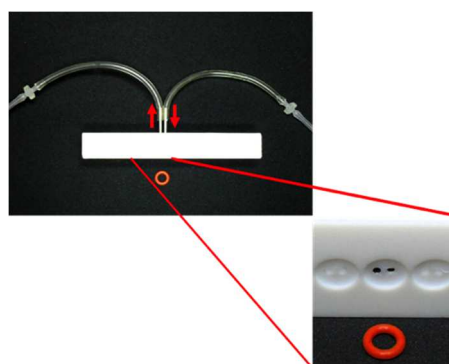
A célula de infusão é a peça que possibilita confinar temporalmente o líquido que entra em contato com o filme de ouro. A peça utilizada no presente trabalho foi feita em

teflon, material escolhido por sua baixa absorção, apresenta uma cavidade de aproximadamente 30 μ l, que permite a entrada e saída de líquido. A célula de infusão permite o fluxo contínuo das amostras líquidas em estudo. As dimensões da célula de infusão estão especificadas na Figura 21-a.

Figura 21 - (a) Diagrama esquemático da posição da célula de infusão; (b) fotografia da célula de infusão sobre o prisma do reflectômetro e (c) partes da célula de infusão.



(b)



(c)

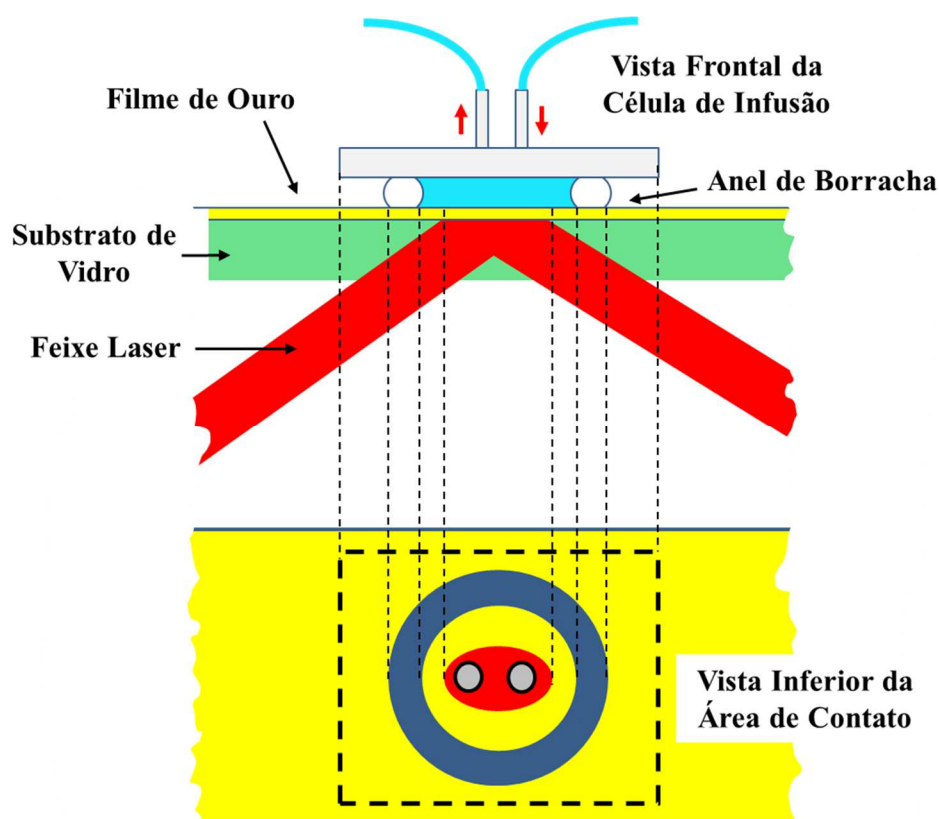
Fonte: autor.

Para evitar vazamento foi utilizado um anel de borracha (*o-ring*) que se encontra posicionado entre a célula de infusão e o filme metálico. Este anel apresenta as seguintes características: diâmetro interno e externo de 4,45 mm e 7,85 mm respectivamente, e espessura de 1,65 mm. A Figura 21 ilustra de forma detalhada a posição da célula de infusão, junto com as demais partes envolvidas.

3.3.2 Alinhamento da Célula de Infusão

Para conseguir os espectros de reflectância das amostras líquidas, contidas na célula de infusão, é necessário que o feixe do laser incida justamente na pequena área efetiva limitada a aproximadamente 12 mm^2 , encerrada pelo anel de borracha, conforme ilustrado na Figura 22. A incidência do laser na célula de infusão é um procedimento dispendioso, em função do reduzido tamanho da célula e da impossibilidade da visualização do feixe.

Figura 22 - Ilustração do feixe laser incidindo na célula de infusão.

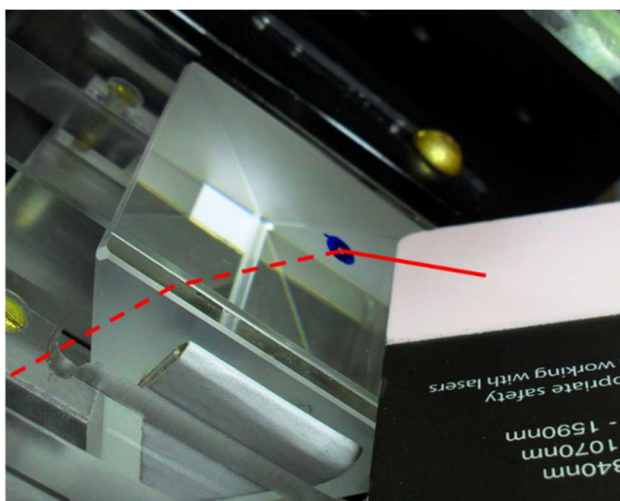


Fonte: autor.

Para alcançar a incidência do laser dentro da célula de infusão, realizam-se os seguintes procedimentos:

1. Se o feixe do laser atinge a face lateral, no ponto $L/4$, como se mostra na Figura 13, garante-se que a radiação incide no ponto de referência (M). Então com um paquímetro se procura este ponto na face horizontal do prisma, e se posiciona o anel de borracha, junto com a célula de Infusão nesse ponto.
2. Gira-se o prisma junto com um substrato sem filme de ouro, até o ângulo onde o feixe que incide internamente na face superior, não sofra reflexão total, conseguindo ser transmitido para fora do prisma, posteriormente com a ajuda de um cartão infravermelho localiza-se o ponto onde se deve posicionar a célula de infusão, conforme ilustrado na Figura 23.

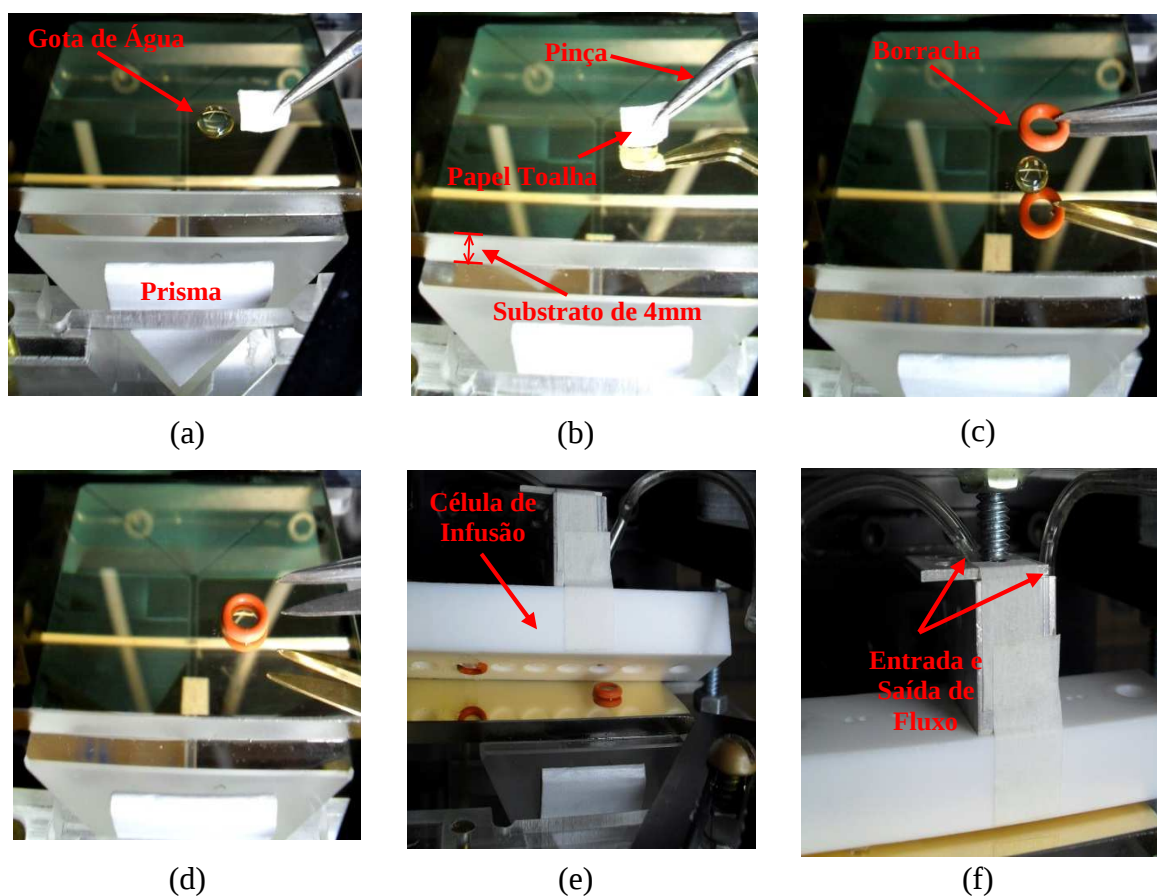
Figura 23 - Localização do ponto para o qual o laser atinge a área interna da célula de infusão.



Fonte: autor.

3. Outro procedimento menos convencional que oferece uma rápida localização do ponto de referência (M), consiste em situar uma gota de água com ajuda de um pincel próxima ao ponto de incidência do laser na face horizontal que corresponde à posição da célula de infusão. Quando a intensidade do sinal do fotodetector D1 alcança a mínima intensidade, é possível afirmar que esta é a posição do ponto (M), tendo em vista que este procedimento é feito para a posição angular onde ocorre o mínimo de refletância (ângulo de ressonância) para a água. A Figura 24 mostra o procedimento explicado anteriormente.

Figura 24 - Fotografias que ilustram formas de garantir que o feixe do laser atinja a área encerrada pela borracha (célula de infusão).



Fonte: autor.

Na Figura 24-a gotas de água são depositadas sobre o filme, na posição próxima ao ponto de referência (M, mostrado na Figura 13). Na Figura 24-b a gota de água, é movimentada empregando uma pinça e um pedaço de papel toalha, procurando obter o mínimo de refletância, para o prisma posicionado no ângulo de ressonância da sustância aquosas (o ângulo de ressonância para a água destilada, medido previamente no reflectômetro foi de $58,1^\circ$). Nas Figuras 24-c e 24-d a borracha é colocada sobre a gota de água, já localizada na posição correta. Na Figura 24-e mostra-se no momento em que é posicionada a célula de infusão, finalmente na Figura 24-f, assegura-se a célula de infusão com o parafuso, pressionando suavemente, evitando as fugas no circuito de fluxo.

É importante ressaltar que o último procedimento apesar de não ser um método convencional, assegura a incidência do laser dentro da célula de infusão, apresentando-se

como um processo eficaz, simples e de grande ajuda para conseguir inserir o laser na face superior onde fica localizado o ponto de referência (M).

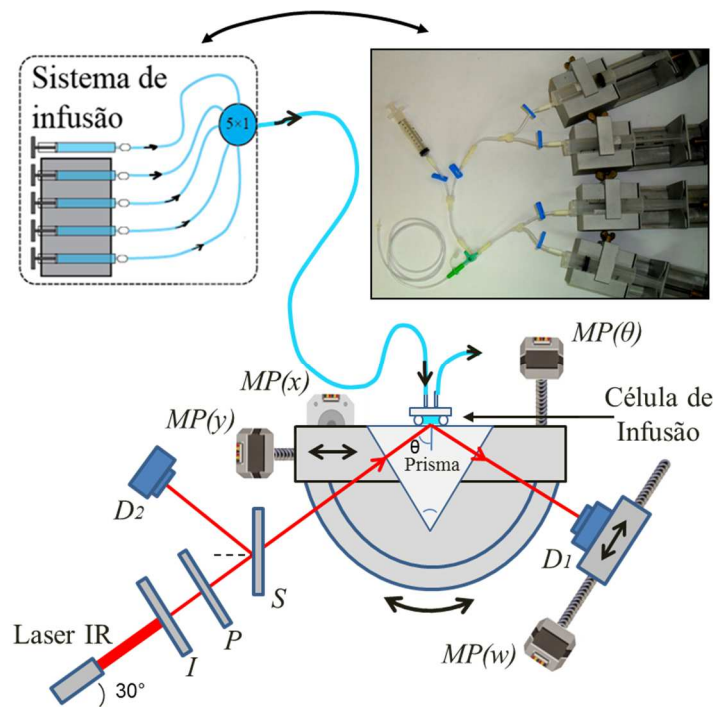
3.3.3 Circuito Hidráulico

Para a realização dos experimentos, foi desenvolvido um circuito hidráulico, que permite a conexão entre o sistema de infusão e a célula de infusão com um volume aproximado de 5 ml desde a seringa até a célula. O circuito foi feito com mangueiras de diâmetro interno de 2 mm, infusores IF05C de duas vias (Compojet) e torneiras de 3 vias (Embramed). Os elementos utilizados são comumente empregados em procedimentos médicos. Com esses componentes foi montado um multiplexador de soluções de 5×1 , conforme ilustrado na Figura 25. A operação de chaveamento entre as distintas amostras contidas nas seringas é feita manualmente.

3.3.4 Integração entre o Sistema de Infusão, Célula de Infusão e Reflectômetro

Foi necessário realizar a integração entre o sistema de infusão, o circuito hidráulico, a célula de infusão e o reflectômetro, como se observa na Figura 25.

Figura 25 - Ilustração do sistema de infusão, célula de infusão e reflectômetro.



Fonte: autor.

Dependendo do tipo de experimento com substâncias aquosas, ou seja, com ou sem agentes biológicos, o sistema integrado além de ter a capacidade de inserir as substâncias com diferentes vazões, tem de cumprir os seguintes requisitos básicos:

- O analito não deve ser absorvido pelas paredes do sistema de fluxo, incluindo a superfície interna das mangueiras, que devem ser quimicamente resistentes e inertes;
- Tem de minimizar os volumes mortos no circuito hidráulico;
- Espera-se que o sistema de infusão injete as amostras de maneira uniforme, mantendo constante a taxa de fluxo;
- É importante que o sistema não esquite as amostras líquidas, já que pode modificar a densidade, gerando variação nas propriedades ópticas como o índice de refração;
- O desenho da célula de infusão deve permitir que os agentes presentes na amostra entrem em contato direto com a superfície do transdutor (filme metálico ou camada polimérica), e deve-se assegurar que a taxa de fluxo não seja muito elevada, já que se o agente biomolecular contido na amostra é inserido com muita rapidez, ele poderá não interagir com as biomoléculas na superfície.

3.4 Amostras Líquidas

Nos experimentos descritos no Capítulo 4 foram preparadas amostras líquidas de água com diferentes concentrações de NaCl. Para pesar a quantidade de soluto em cada solução foi utilizada uma balança semi-analítica (Marte AS1000) com uma incerteza de $\pm 0,01\text{g}$. Os volumes de água destilada foram medidos com o emprego de uma seringa de $20\text{ ml} \pm 1\text{ ml}$ e uma micropipeta (Transferpette) com uma incerteza de $\pm 0,0005\text{ ml}$.

Para a realização da curva de calibração foram preparadas soluções salinas a partir da divisão progressiva (divisões por dois) de uma concentração base de 100 mg/ml , até obter uma solução com concentração aproximada de $0,02\text{ mg/ml}$. Essas preparações foram testadas na célula de infusão, para posterior registro da curva *RPS*.

Para determinar o índice de refração a partir da variação no sinal de reflectância, foram preparadas em água destilada cinco soluções com distintos valores de concentração. Foram obtidas amostras com volume de 100 ml, e concentrações de NaCl de 0, 5, 10, 15 e 20 mg/ml.

Durante os experimentos, foram acondicionadas no sistema de infusão seringas de 20 ml, uma das quais contendo sempre água pura, para a lavagem do sistema entre as medições de amostras com diferentes concentrações de NaCl. A quinta amostra conectada ao multiplexor, permaneceu em uma seringa fora do sistema de infusão, aguardando tomar o lugar da primeira amostra inserida, tal como apresentado na Figura 25.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos da caracterização do reflectômetro e do módulo de infusão separadamente, além da caracterização da integração do reflectômetro automatizado, com o módulo de infusão de líquidos. Após apresentar a caracterização, são mostrados os resultados das medidas com amostras líquidas com diferentes concentrações salinas, a fim de exibir as possibilidades e as deficiências do sistema.

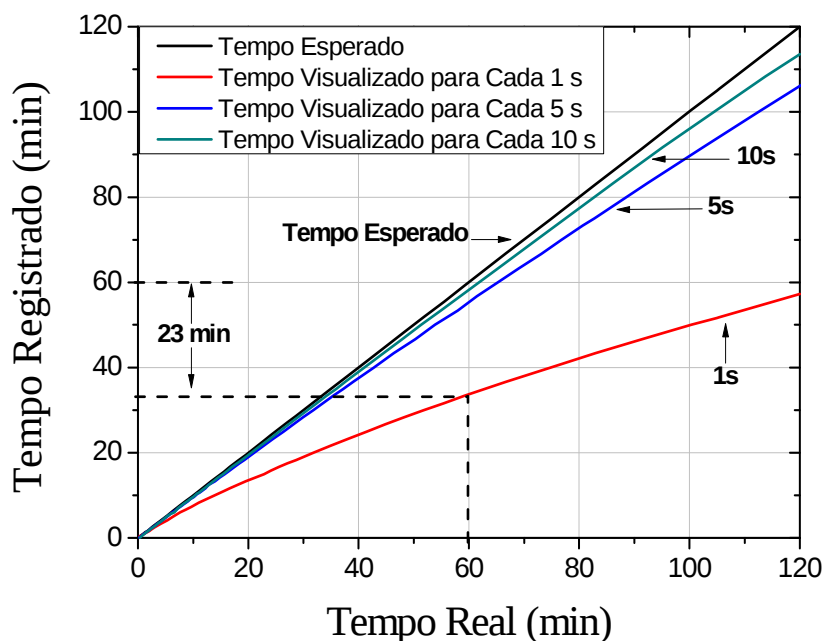
4.1 Caracterização do Reflectômetro e Módulo de Infusão

Nesta seção será tratada a forma em que foi feita a caracterização do sistema, mostrando como é registrada a intensidade do feixe laser em função do tempo, também é abordada a forma em que o sistema responde com o emprego de filme de PVC como casador de índices de refração, como uma alternativa diferente ao óleo mineral. Finalmente, caracteriza-se o módulo de infusão, para determinar as vazões mínimas y máximas inseridas por cada uma das seringas permitidas pelo sistema, como também a elevação da temperatura das amostras, alterada por efeito de aquecimento.

4.1.1 Avaliação do Tempo de Aquisição no Reflectômetro

O sistema de detecção, controle e processamento do reflectômetro mostra que o processo de aquisição e visualização dos dados de reflectância em função do tempo, depende das características do conversor analógico-digital e do software do computador. A fim de observar esse comportamento, foram realizadas curvas de reflectância em função do tempo para frequências de 1, 5 e 10 segundos de amostragem, obtendo um gráfico que relaciona o tempo registrado em função do tempo real, conforme é ilustrado na Figura 26.

Figura 26 - Tempo de registro de dados em função do tempo real.



Fonte: autor.

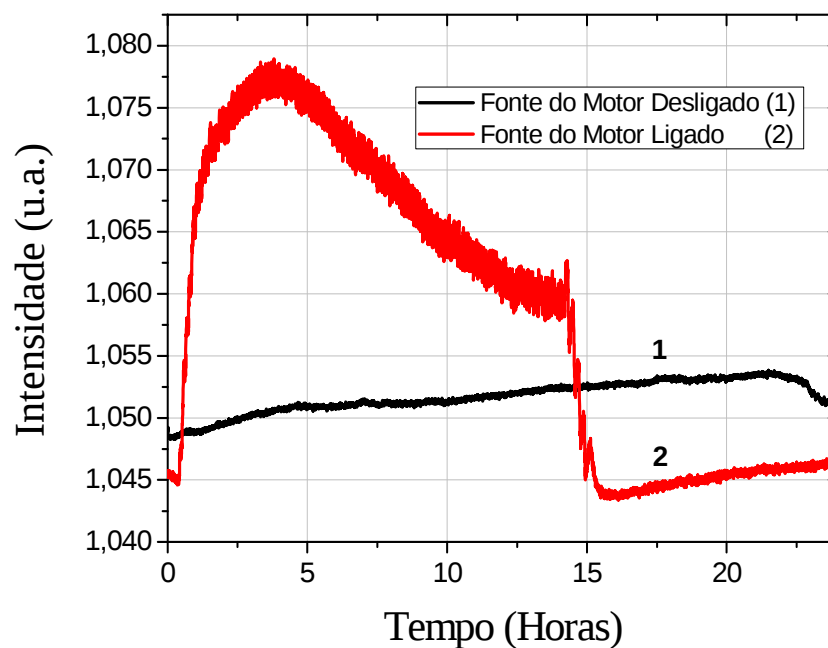
Na Figura 26 se observa que o tempo registrado para as frequências de amostragem não coincide com o tempo real em que elas ocorrem. Por exemplo, para medidas de uma hora os registros realizados com frequências de amostragem de 5 e 10 segundos apresentam uma defasagem de aproximadamente 4 e 2 minutos, respectivamente. Esses valores são aceitáveis quando as reações acontecem lentamente ou para experimentos onde o comportamento da refletância no tempo não representa uma prioridade. No entanto, para este mesmo tempo e uma frequência de amostragem de 1 segundo, será registrado pelo sistema uma medida de 28 minutos, que corresponde com uma defasagem de 23 minutos com o tempo real em que acontecem os eventos. Estas defasagens ocasionam uma “compressão ou deformação” das curvas de refletância em função do tempo, em particular, em experimentos que envolvam agentes biomoleculares, gerando uma leitura errada da velocidade com que acontecem as associações e dissociações moleculares.

4.1.2 Registro da Intensidade do Feixe S1

A fim de avaliar no sistema o efeito de ligar e desligar o motor de passo $MP(w)$, foram realizadas duas medidas do feixe que incide no prisma (S1) em dois períodos de 24 horas.

Para as medidas tomadas no primeiro período foi desligada a fonte de alimentação do motor de passo $MP(w)$ que movimenta o fotodetector de sinal (D_1), as medidas realizadas no segundo período foram feitas com a fonte de alimentação ligada. Foi obtido um gráfico da intensidade do feixe S1 em função do tempo para cada um dos períodos registrados, tal como se apresenta na Figura 27.

Figura 27 - Dependência temporal da intensidade do feixe S1.



Fonte: autor.

Na Figura 27 é possível observar que a curva 1 registrada com a fonte dos motores de passo desligada, apresenta uma flutuação na intensidade de 0,005. Na curva 2 registrada com a fonte dos motores ligada foi obtida uma flutuação de 0,033, representando um aumento significativo em comparação com a curva 1. O aumento e diminuição da intensidade na curva 2 é atribuído à movimentação do fotodetector D_1 por parte do motor de passo $MP(w)$, causada pela ligação no início da medição e desligamento depois de 15 horas aproximadamente.

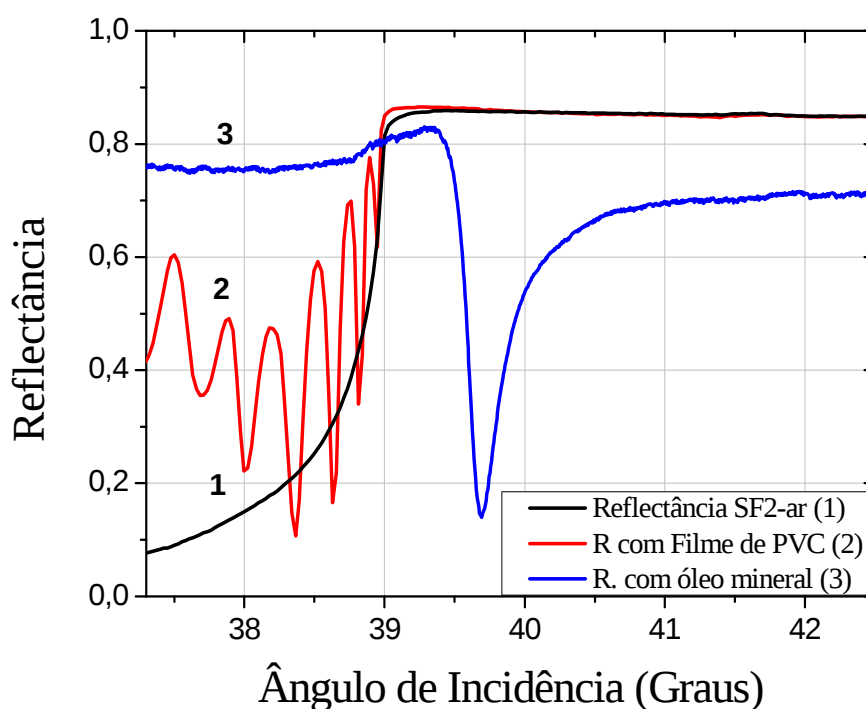
O efeito observado na troca de intensidade do feixe, pode ser causado pelo movimento da área sensora do fotodetector, que em efeito poderia estar relacionado com o aquecimento do parafuso que sofre uma dilatação térmica, causada pelo aquecimento do motor de passo o também pelas pequenas vibrações do motor, já que ele fica com as bobinas ligadas todo o tempo.

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

O procedimento para casar os índices de refração entre o prisma e o substrato é feito com a adição de óleo mineral com índice de refração similar a qualquer dos meios que precisam ser casados, evitando desta maneira a retenção de bolhas de ar. Uma das desvantagens em utilizar o óleo é poder contaminar a filme metálico ou até mesmo a amostra em estudo. Além disso, trocar o substrato, casado desta maneira, torna-se dispendioso, já que implica desmontar e limpar rigorosamente com álcool as superfícies de contato, evitando deixar rastros de óleo antes de realizar uma nova operação.

Com o objetivo de encontrar uma melhor forma de “casar” opticamente o prisma com o substrato, sem utilizar óleo mineral, este foi substituído por um filme de PVC. Uma vez realizado este processo, foram feitas três curvas de refletância para diferentes configurações e igual meio dielétrico, conforme ilustrado na Figura 28. A curva 1 foi feita para uma configuração SF2-ar, as curvas 2 e 3 foram feitas para SF2-BK7-Au-ar, utilizando meios “casadores” diferentes. A curva 2 foi obtida com filme de PVC e a curva 3, com o emprego de óleo mineral.

Figura 28 - Curva de reflectância para a estrutura SF2-ar [1], SF2-PVC-BK7-Au-ar [2], e SF2-óleo mineral-BK7-Au-ar [3].



Fonte: autor.

Observa-se na Figura 28 que na configuração SF2-ar [1] se obtém um espectro de reflexão interna total. Na configuração SF2-óleo mineral-BK7-Au-ar se obtém uma curva de RPS típica para o ar. No entanto, na configuração SF2-PVC-BK7-Au-ar, foi obtida uma curva que mostra uma múltipla reflexão interna do feixe transmitido dentro do filme de PVC, que origina uma interferência dependente do ângulo de incidência. Levando em consideração estas curvas, é possível dizer que o filme de PVC utilizado não permite um bom acoplamento dos índices de refração do prisma e do substrato, uma vez que não foi possível obter a curva de RPS.

4.1.4 Vazões Inseridas pelo Módulo de Infusão

O módulo de infusão tem um limite de operação, que depende tecnicamente da quantidade de passos necessária para que os motores girem uma volta. Por causa disso foram determinados os valores das vazões mínimas e máximas com as quais o módulo pode operar para as seringas de 3, 5, 10 e 20 ml. Os valores obtidos estão listados na Tabela 4.1.

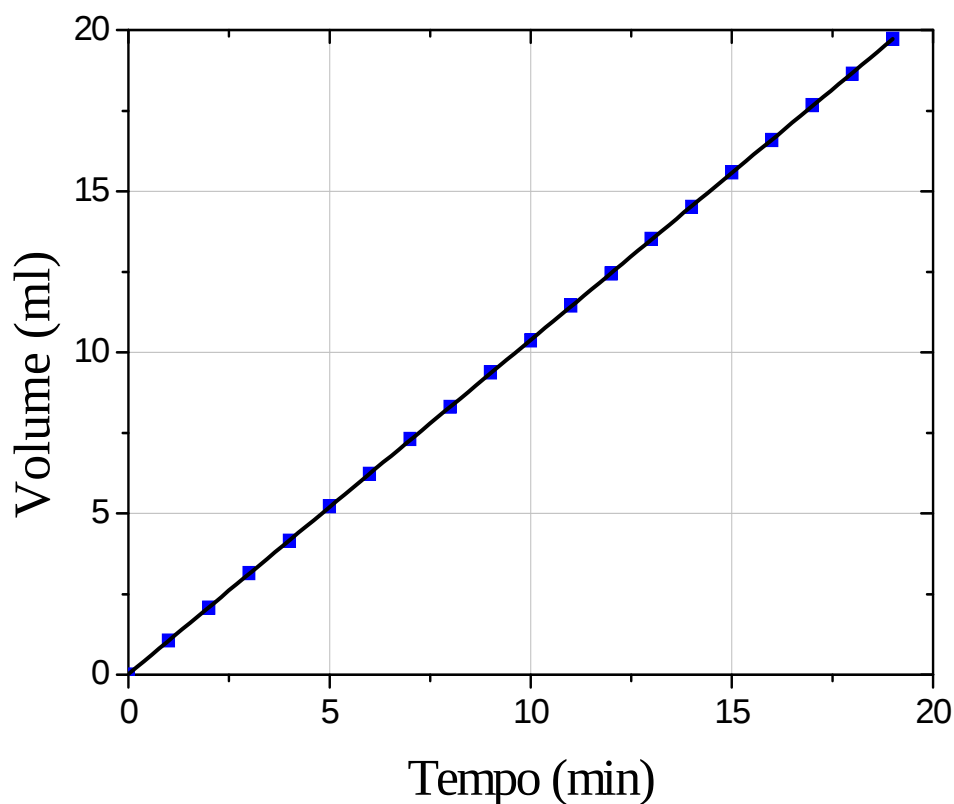
Tabela 4.1 Vazões máxima e mínima para os diferentes padrões de seringas.

<i>Seringa</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>Vazão Mínima (μl/min)</i>	<i>Vazão Máxima (ml/min)</i>
1	3	2,24	7,46
2	5	3,42	11,41
3	10	5,10	16,86
4	20	8,55	28,50

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

A fim de comparar a vazão programada no sistema com a vazão experimental, foram realizadas medidas de volume em função do tempo, inserindo um volume de 19 ml em 19 minutos de forma contínua. A Figura 29 apresenta o volume em função do tempo correspondente à caracterização do módulo de infusão na função de vazão de 1 ml/min (16,66 μl/min).

Figura 29 - Volume inserido em função do tempo para uma seringa de 20 ml, marca Descarpak. (módulo de infusão programado na função de 1ml/min).



Fonte: autor.

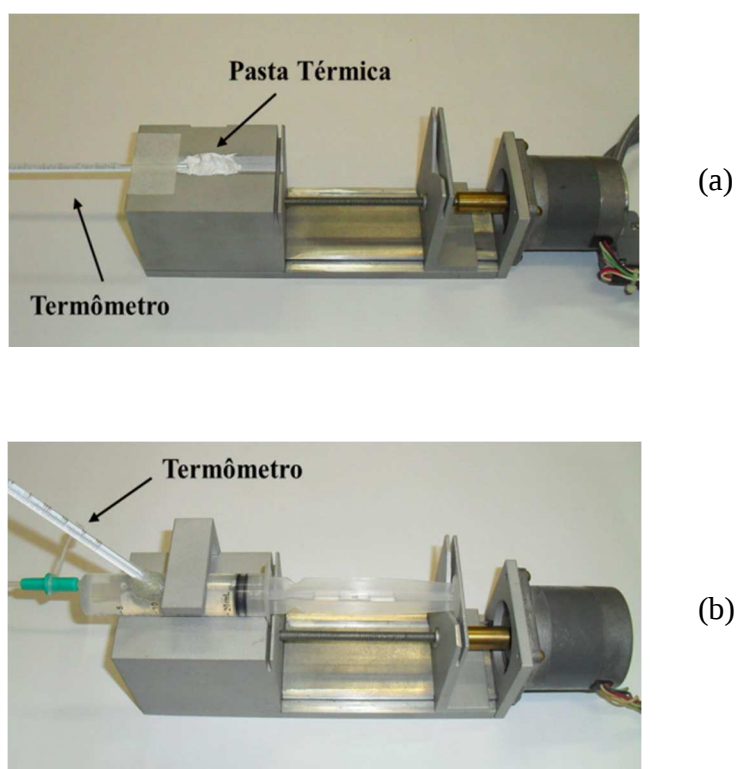
De acordo com a Figura 29 pode-se observar que experimentalmente se obtém uma vazão de 1,037 ml/min (17,28 μ l/min) afastando-se 3,4% aproximadamente da programada no módulo de infusão. Dado que as dimensões das seringas podem variar de uma marca a outra, recomenda-se que as seringas sejam caracterizadas antes de cada experimento, para dar certeza da vazão inserida no sistema.

4.1.5 Influência da Temperatura da Peça Motorizada no Índice de Refração

O calor gerado pelos motores de passo em cada uma das peças motorizadas, causa um aquecimento de toda a peça de alumínio, calor que é lentamente transferido à amostra contida na seringa. Este efeito térmico pode alterar o índice de refração da amostra, já que a densidade dos líquidos diminui com o aumento da temperatura. Para observar este efeito realizaram-se experimentos de monitoramento da temperatura.

Para realizar as medições o sistema de infusão foi programado na função de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, vazão correspondente a um passo a cada 4 segundos, para a monitoração da temperatura foi utilizado um termômetro analógico com uma incerteza de $\pm 1^\circ\text{C}$. Foram realizados dois arranjos: no primeiro caso (a) o termômetro foi posicionado no suporte da seringa, para medir a temperatura na peça motorizada. No segundo caso (b) o termômetro foi posicionado dentro da seringa para medir a temperatura na amostra (água destilada), conforme a Figura 30.

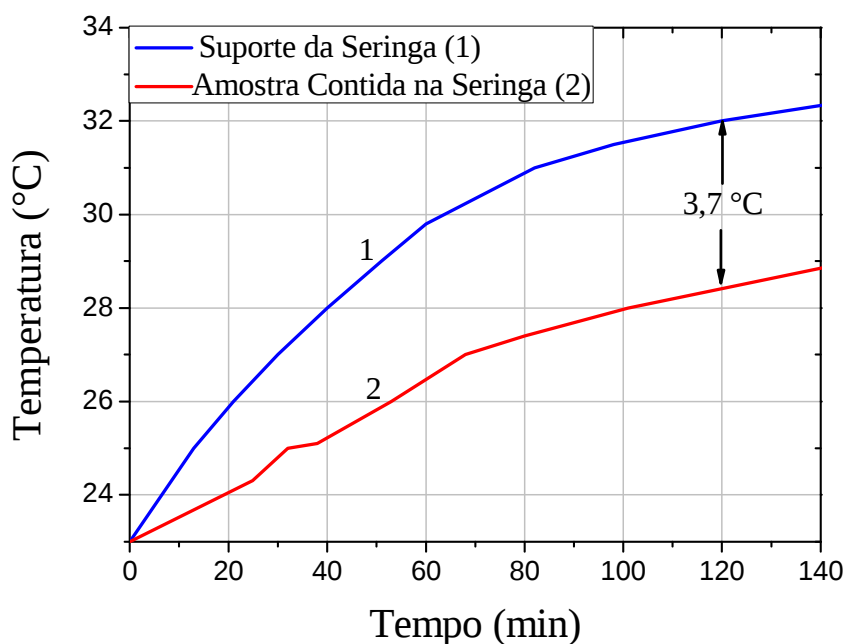
Figura 30 - Arranjo experimental para medir a temperatura em função de tempo; (a) para a peça motorizada e (b) para a amostra (H_2O destilada) contida na seringa.



Fonte: autor.

A fim de avaliar a influência da temperatura na variação do índice de refração, foram registradas medidas da temperatura em função do tempo para o suporte e para uma amostra de água destilada contida na seringa de 10 ml, que está acoplada ao suporte. As duas curvas obtidas são mostradas na Figura 31.

Figura 31 - Incremento da temperatura em função do tempo do suporte da seringa e da amostra contida na seringa. (amostra inserida com uma vazão de 5 µl/min).



Fonte: autor.

As curvas apresentadas na Figura 31 mostram um comportamento não linear, destacando um aumento progressivo da temperatura com respeito ao tempo. Pode-se observar que, ao longo de 120 minutos o aquecimento do suporte transfere calor lentamente à água contida na seringa, produzindo nesse período de tempo uma elevação da temperatura em 3,7 °C. Elevações na temperatura podem ocasionar uma alteração nas medidas de reflectância que permitam determinar o índice de refração. É importante ressaltar que o índice de refração da amostra não sofrerá variações apreciáveis se o calor é dissipado antes de entrar na célula de infusão.

Continuando a análise da influência da temperatura foi determinada teoricamente a partir da equação de Sellmeier a variação do índice de refração, para uma amostra de água na faixa entre 20 e 30 °C e para um comprimento de onda de 975,1 nm, obtendo

$$n = -1,947 \times 10^{-5} T + 1,32639, \quad (28)$$

com T em unidades de °C.

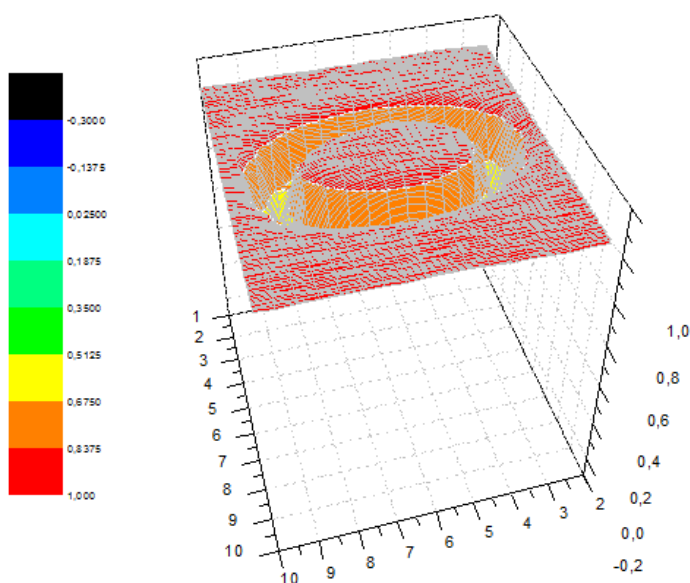
4.2 Integração Reflectômetro Automatizado-Módulo de Infusão

Nesta seção por um lado apresentam-se medidas de reflectância varrendo posição do feixe através da região da célula delimitada pelo o-ring. Também é obtido o limite de detecção do reflectômetro para concentrações inferiores a 0,4 mg/ml.

4.2.1 Área de Contato e Área Iluminada

Para determinar com certeza a posição exata onde o feixe tem que incidir, foi implementada uma rotina no reflectômetro que permitiu varrer a superfície de contato entre o metal e a célula de infusão sem líquido. Foi feita uma varredura de uma superfície de 180 mm², em forma matricial, com linhas e colunas espaçadas a cada 0,5 mm e a cada 0,1 mm respectivamente. Deve-se enfatizar que existe uma distinção entre área de contato e área iluminada. A primeira corresponde à área limitada pela célula de infusão e a segunda se refere à região iluminada pelo feixe a qual depende do ângulo de incidência. A fim de encontrar o ponto exato para fazer incidir o feixe dentro da área limitada pela célula de infusão, foi realizada uma medição de reflectância em função da posição. Os resultados experimentais de reflectância da área de contato entre a célula de infusão e o filme de ouro, são apresentados na Figura 32.

Figura 32 - Reflectância em função da posição que mostra a área limitada pelo o-ring, para uma célula de infusão sem líquido.

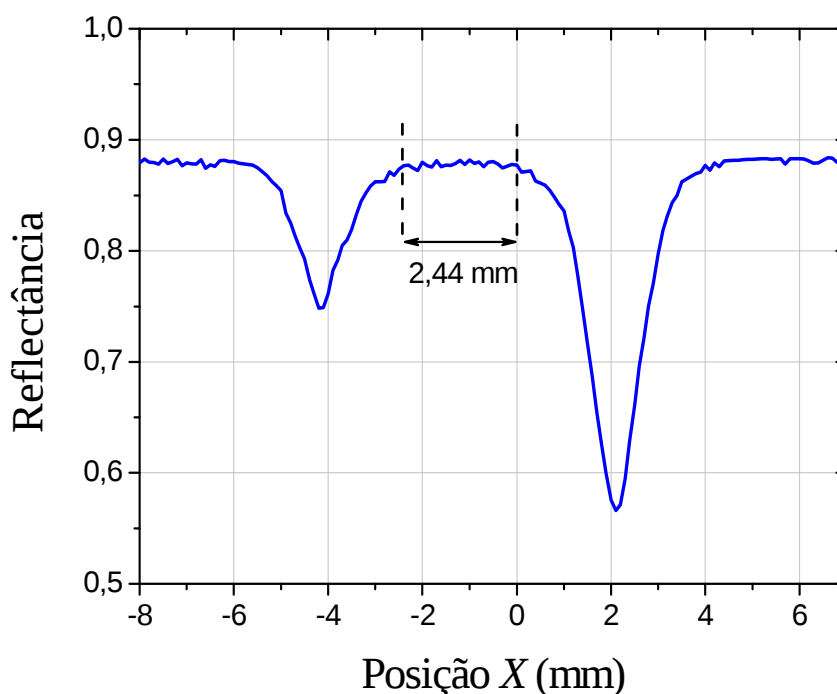


Fonte: autor.

Na Figura 32 se observa uma depressão circular que corresponde à área de contato entre a borracha e o filme metálico, que permite ver com clareza a área limitada pela célula de infusão, a qual estará em contato direto com a solução aquosa.

A Figura 33 mostra um corte transversal da curva de nível de intensidade da reflectância em função da posição. Nota-se que os dois valores mínimos apresentam diferentes reflectâncias. Essa diferença é atribuída ao fato de o parafuso que pressiona a célula de infusão, não exercer uma pressão uniforme sobre ela, influenciando as dimensões da área de contato.

Figura 33 - Reflectância em função da posição, para uma varredura feita no meio da célula de infusão sem líquido.



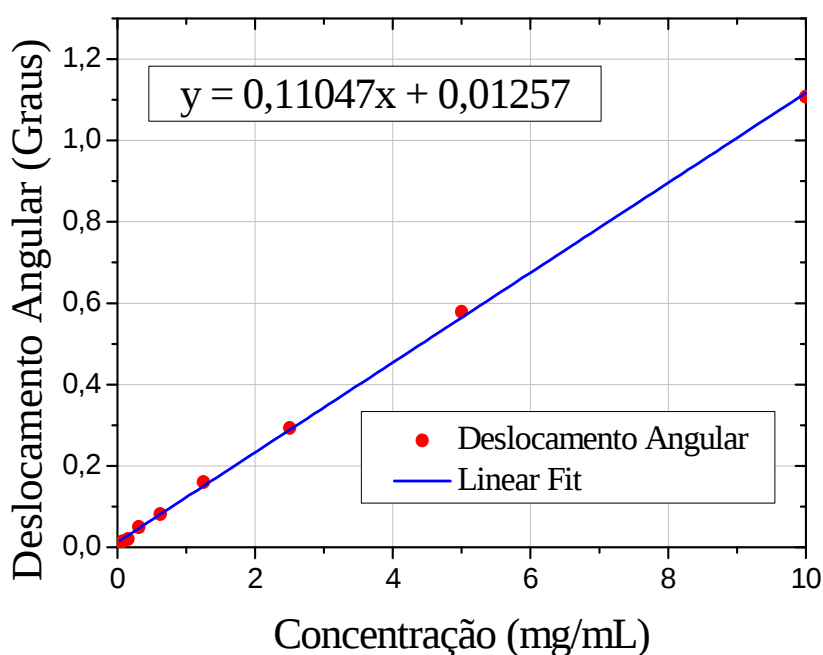
Fonte: autor.

A partir da Figura 33 foi determinado o diâmetro interno de 2,44 mm da célula de infusão, o que fornece uma área de contato de $4,66 \text{ mm}^2$. Essa área possui uma reflectância média de 0,88. Considerando que o feixe do laser possui 1 mm de diâmetro e incide na superfície do filme metálico com um ângulo de 60 graus, a área iluminada é de aproximadamente $1,6 \text{ mm}^2$. Assim, é possível afirmar que este feixe pode ser alojado dentro da célula de infusão, sem atingir a região de baixa reflectância ou de contato entre a borracha e o filme metálico.

4.2.2 Curva de Calibração

A curva de calibração do reflectômetro integrado foi realizada para fluxo em estado de repouso, ou seja, para uma vazão nula. A curva apresentada na Figura 34 representa o deslocamento angular $\Delta\theta_{PS}$, em função da concentração de NaCl na solução.

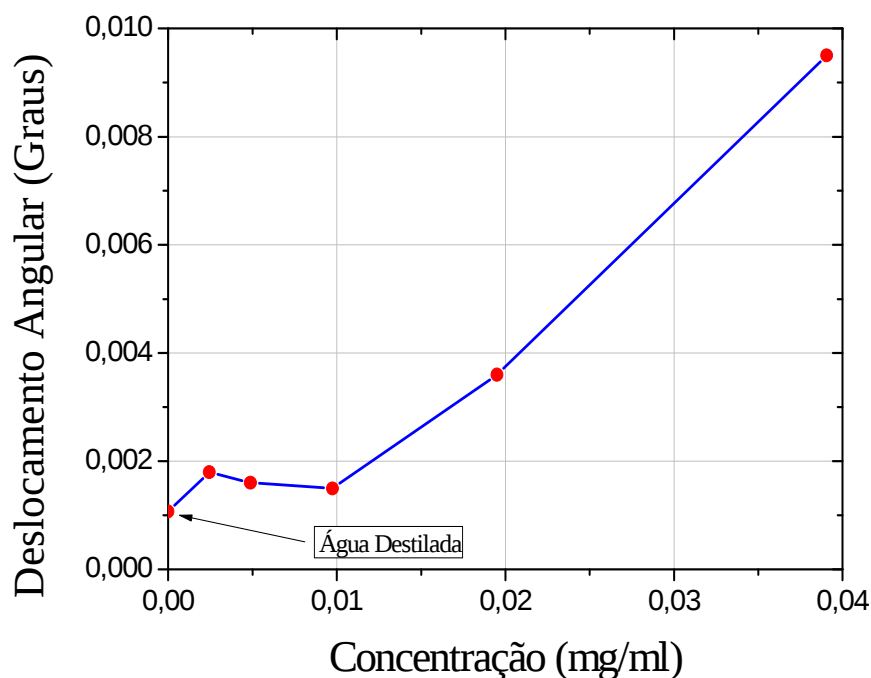
Figura 34 - Curva de calibração que mostra o comportamento linear do sensor para diferentes concentrações salinas.



Fonte: autor.

Observa-se que para concentrações salinas inferiores a 10 mg/ml o reflectômetro na configuração SF2-BK7-Au-(Solução salina) responde linearmente com uma relação $d\theta_{ps}/dC = 0,11\text{ graus mL/mg}$ de NaCl, permitindo calcular concentrações salinas a partir do deslocamento do ângulo de ressonância. A Figura 35 mostra em mais detalhe a resposta do reflectômetro na faixa de concentrações entre 0 e 0,04 mg/ml.

Figura 35 - Curva de calibração para concentrações inferiores a 0,4mg/ml.



Fonte: autor.

Na Figura 35 observa-se que não é possível garantir que o sistema apresente um comportamento linear para concentrações inferiores de 0,02 mg/ml. Para medições de intensidade com o ângulo fixo pode-se chegar a níveis ainda menores de concentração, em que infere-se a variação angular a partir da variação de reflectância.

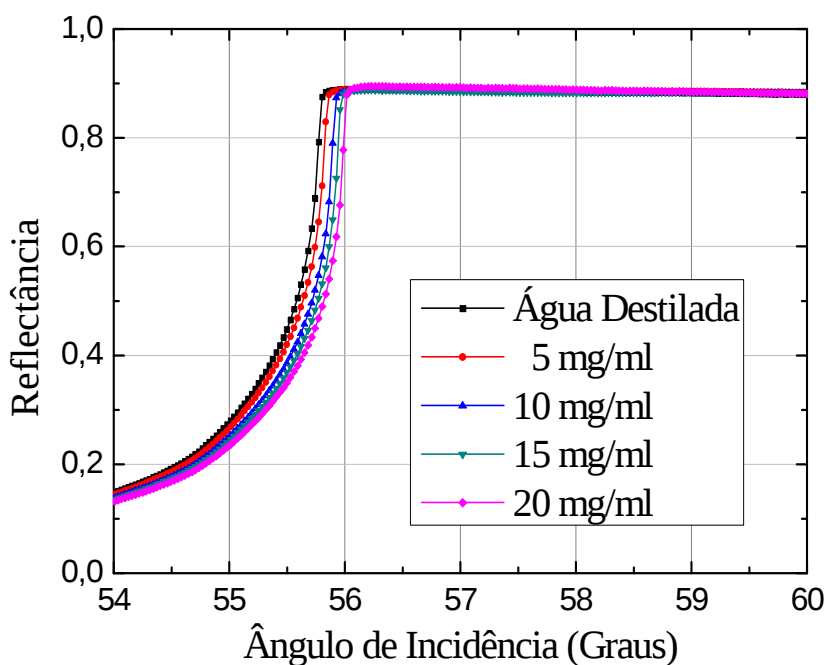
4.3 Medidas Realizadas com o Sistema Integrado

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

4.3.1 Determinação do Índice de Refração a partir do Ângulo Crítico

Com base no arranjo apresentado na Seção 3.3.4, foi possível realizar um experimento preliminar para determinar as propriedades ópticas da solução a partir da medição de reflectância do prisma sem filme metálico. Essa medida foi realizada em regime estático para amostras salinas com concentrações de NaCl de 5, 10, 15 e 20 mg/ml. A Figura 36 mostra as curvas de reflectância para cada uma das amostras salinas, nas quais se observam os pontos de maior declividade que correspondem ao valor do ângulo crítico.

Figura 36 - Reflectância do prisma como função da concentração de NaCl.



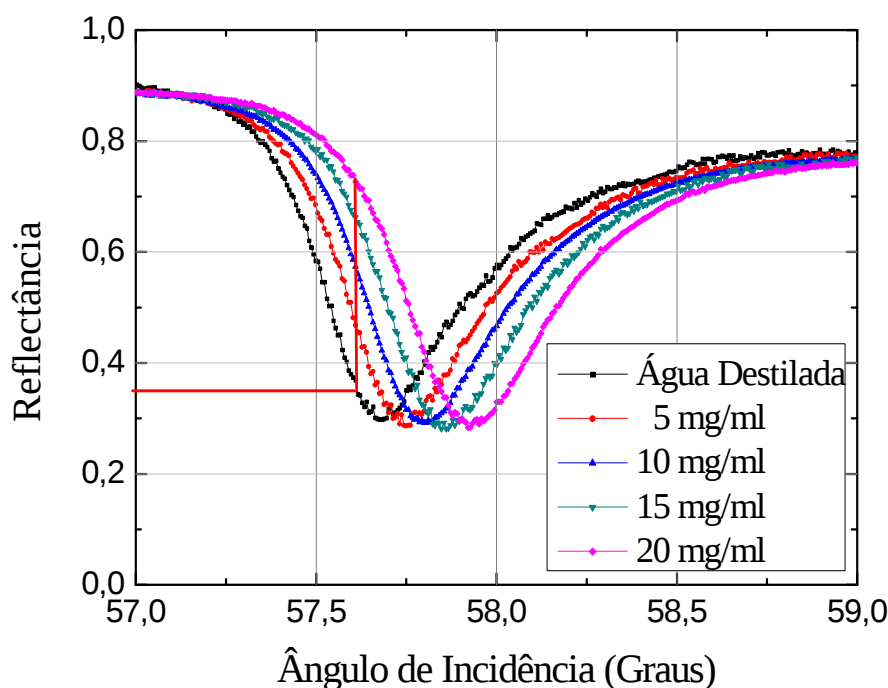
Fonte: autor.

Na Figura 36 pode-se notar uma pequena alteração na condição de reflexão interna total como função da concentração da amostra contida na célula de infusão. Da curva de reflexão interna total para a água é possível extrair o valor experimental do ângulo crítico, que corresponde a 55,835 graus. Conhecendo o índice de refração do prisma de vidro SF2 que é de 1,634 para um comprimento de onda de 975,1 nm, e conforme a Equação 22, foi determinado que o valor do índice de refração da água é $n_s = 1,348$, valor que difere apenas em 1% do valor tabelado na literatura (26).

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

A fim de avaliar a resposta do reflectômetro integrado foram registrados espectros de refletância para água destilada e quatro amostras salinas, com concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg/ml. A Figura 37 mostra as cinco curvas de RPS em filme de ouro, medidas no sistema como função da concentração de NaCl, realizadas em regime estático.

Figura 37 - Curvas RPS para diferentes concentrações salinas.

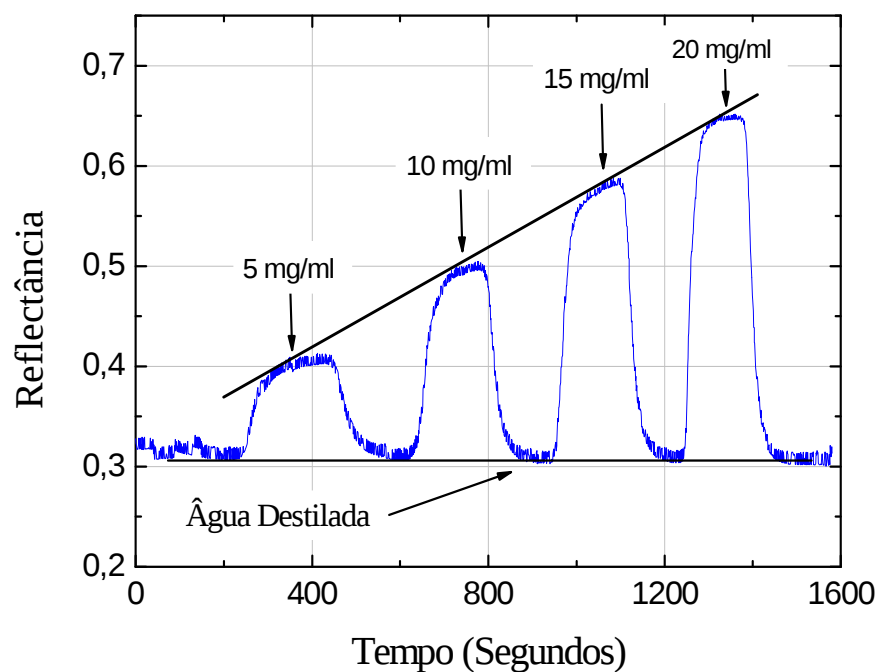


Fonte: autor.

Na Figura 37 pode-se observar que à medida que aumenta a concentração de sal apresenta-se também um deslocamento progressivo no mínimo da curva RPS, que corresponde ao ângulo de ressonância θ_{PS} . Três características relevantes podem ser extraídas da curva RPS, as quais são o ângulo de ressonância, a meia largura a meia altura e a faixa dinâmica que para o caso da água destilada foram, respectivamente, $\theta_{PS}=57,6826$ graus, $w = 0,196$ graus e $D = 0,6$. Substituindo estes valores na Equação 26, se determina o fator de qualidade $Q_{PS} = 139$, valor que é aproximadamente 1/3 daquele previsto teoricamente. Essa diferença entre os valores pode ser o resultado do fato de a espessura do filme não estar otimizada (27).

Posteriormente foi realizado um experimento com amostras líquidas com concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 mg/mL de NaCl, que foram injetadas através da célula de infusão a uma taxa de 1ml/min por cinco minutos cada, com o objetivo de analisar a variação temporal da reflectância e a influência da lavagem no espectro de reflectância. Nesse experimento foi utilizado um prisma em uma posição angular fixa, com o ângulo de incidência interno $\theta=57,6$ graus e o gráfico obtido está apresentado na Figura 38.

Figura 38 - Dependência temporal do sinal de reflectância.

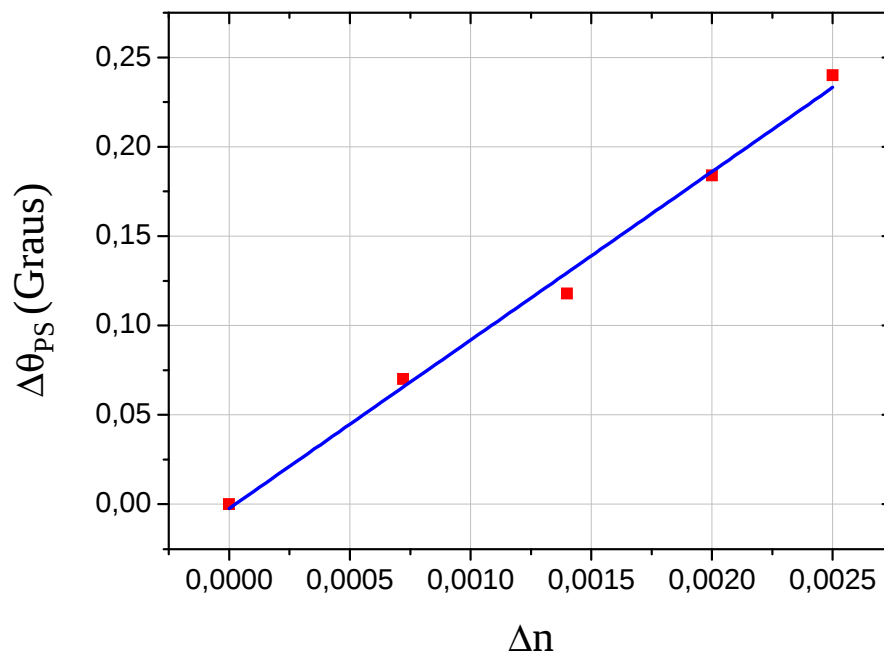


Fonte: autor.

Na Figura 38 obtém-se para as concentrações em estudo um comportamento linear entre o sinal e a concentração de NaCl. Usando o fator de qualidade $Q_{PS} = 139$, a variação da reflectância observada para a amostra de 20 mg/ml que foi de 0,35 e a Equação 25 obteve-se a variação relativa do índice de refração da amostra $\Delta n_s/n_s = 0,0025$. Essa variação está de acordo com o valor tabelado na literatura que é de 0,0027 (26). Pode-se observar também na Figura 38 que depois de inserir cada uma das amostras salinas e realizar o processo de lavagem, o sinal de reflectância retorna à linha de base, que corresponde à reflectância da água destilada.

Com o objetivo de conhecer tanto a resposta do sensor *RPS* como a sensibilidade, foi necessário utilizar a informação apresentada nas Figuras 37 e 38. Com essas informações foi construído o gráfico que mostra o deslocamento angular em função do índice de refração, apresentado na Figura 39.

Figura 39 - Variação do ângulo de ressonância $\Delta\theta_{ps}$ em função das variações no índice de refração Δn , para diferentes concentrações salinas.

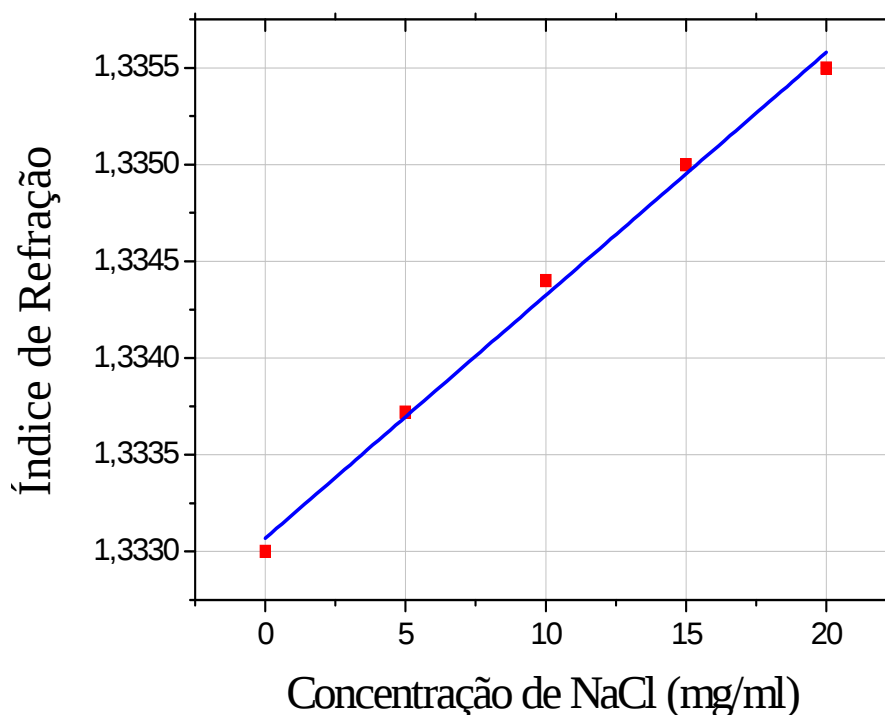


Fonte: autor.

Na Figura 39 observa-se que os valores do índice de refração para a faixa de concentrações de 0 até 20 mg/ml incrementam-se linearmente com respeito às variações do ângulo de ressonância. Considerando a sensibilidade $\Delta\theta_{ps}/\Delta n = 94$, e que as medições foram registradas com o reflectômetro na resolução de $0,05^\circ$, é possível determinar a partir da Equação $\eta_{ps}(\theta) = S_{RPS}(\theta) / \sigma_\theta$ (resposta sensora), que relaciona o ângulo de ressonância e a incerteza da medida angular, que o valor de resposta sensora é $\eta_{ps}(\theta) = 5,3 \times 10^{-4}$.

O valor do índice de refração pode ser também representado em função da concentração de NaCl em soluções aquosas, como mostrado na Figura 40.

Figura 40 - Índice de refração em função da concentração de NaCl.

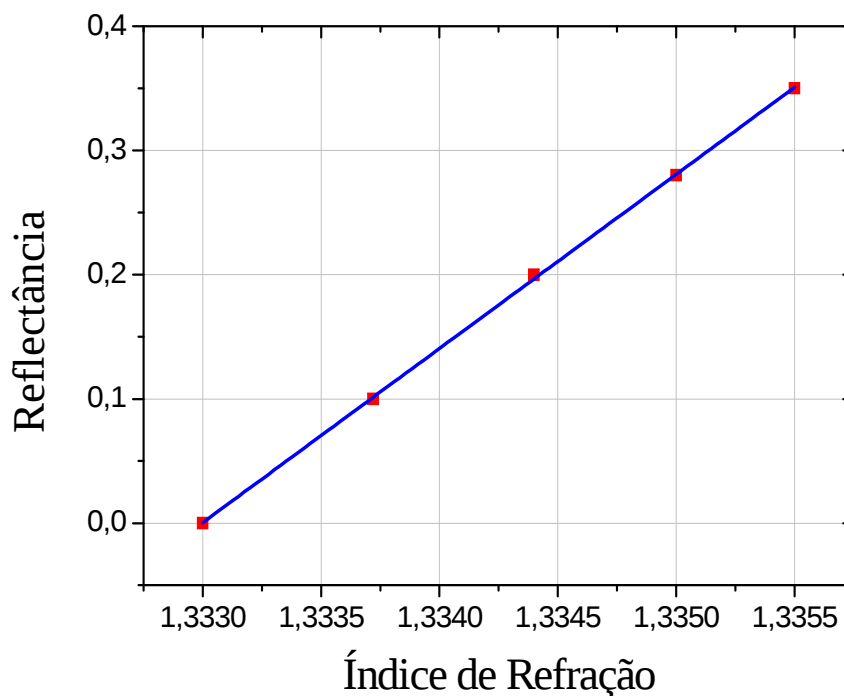


Fonte: autor.

Na Figura 40 observa-se que o valor do índice de refração varia linearmente com a concentração de NaCl. O gráfico permitiu obter uma reta com derivada $\Delta n / \Delta C = 1,25 \times 10^{-4}$ ml/mg. Para calcular a máxima sensibilidade de detecção da variação de concentrações salinas, foi realizada a razão entre o valor da resposta sensora ($\eta_{ps}(\theta) = 5,3 \times 10^{-4}$) e o valor da inclinação da reta anterior (4.15), obtendo-se um valor de sensibilidade de 4,24 mg/ml.

Outra correlação que pode ser estabelecida para essa faixa de concentração do experimento anterior é a reflectância em função do índice de refração como é apresentado na Figura 41. Observa-se que neste ajuste as medidas experimentais coincidem com a reta linear, obtendo-se uma inclinação com um valor aproximado de 140, que permite calcular o índice de refração a partir da reflectância ou vice-versa.

Figura 41 - Reflectância em função do índice de refração das concentrações salinas.



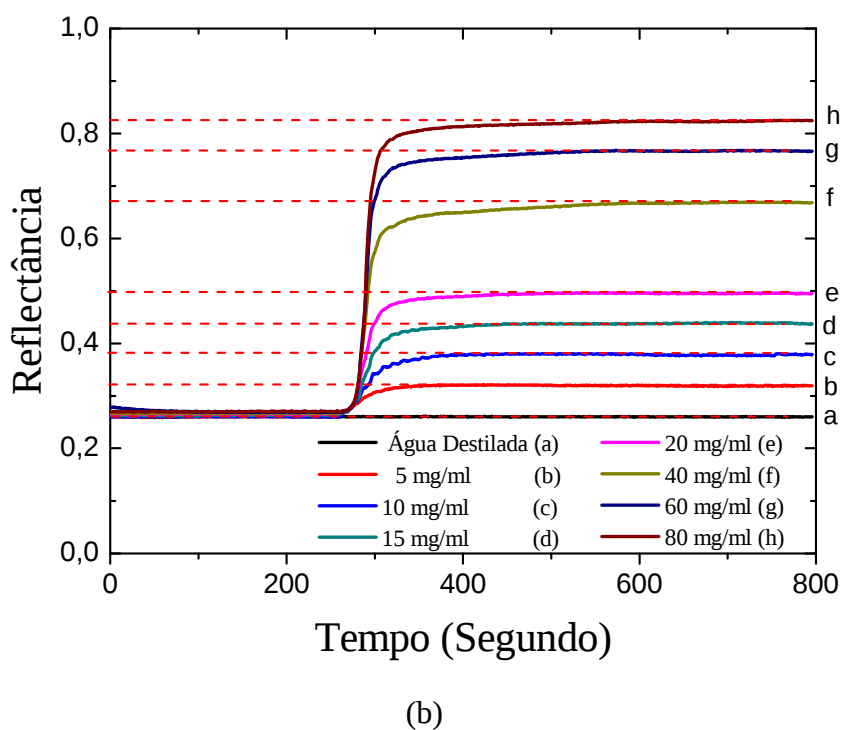
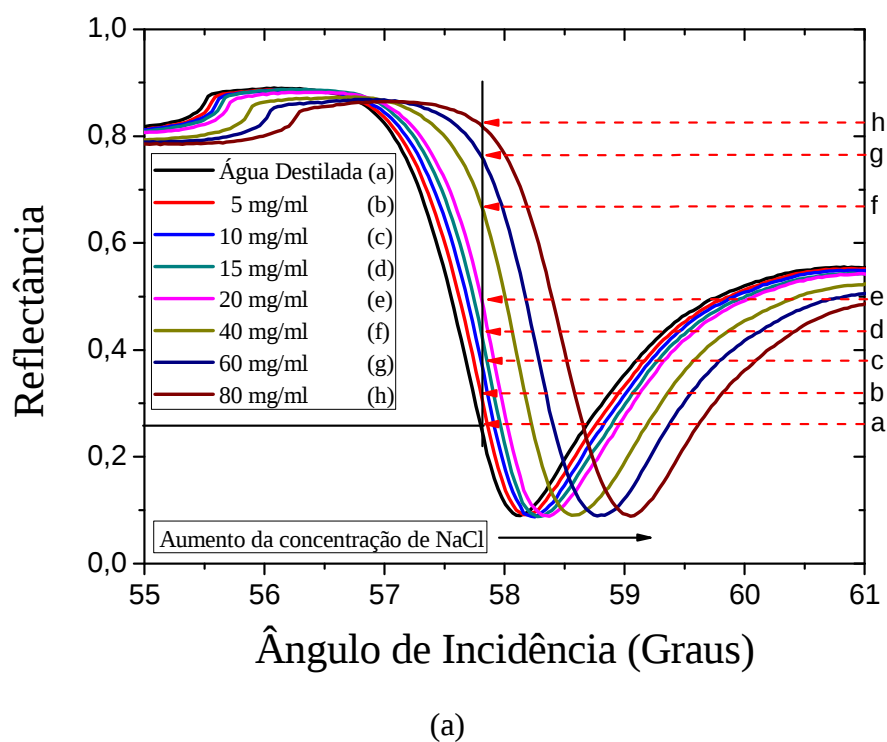
Fonte: autor.

4.3.3 Resposta do Sensor RPS em Fluxo Contínuo

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

Foram realizadas curvas *RPS* para amostras em regime estático a uma temperatura média de 24 °C, com concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 40, 60 e 80 mg/ml. Para este conjunto de amostras foram feitos sensogramas para um ângulo fixado em 57,81 graus e uma taxa de amostragem de um segundo. A seguir são apresentadas as curvas *RPS* e os sensogramas obtidos nas Figuras 42-a e 42-b respectivamente.

Figura 42 - (a) Curvas RPS para diferentes concentrações; (b) Reflectância em função do tempo para ângulo fixo.



Fonte: autor.

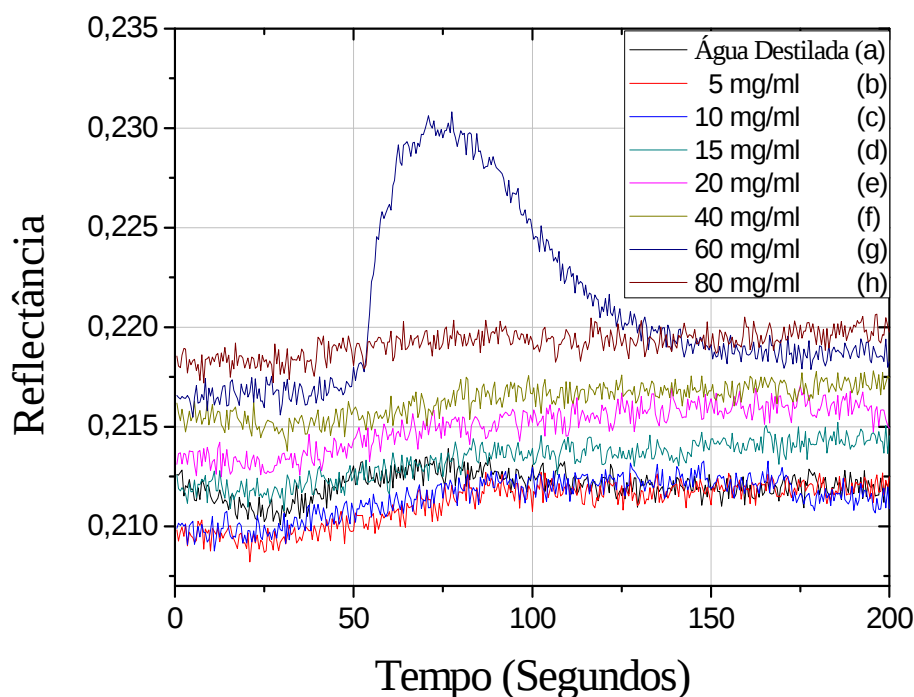
Na Figura 42-a pode-se observar, como as curvas *RPS* são deslocadas para ângulos maiores à medida que aumenta a concentração da amostra. O deslocamento angular médio

para as primeiras cinco amostras é de 0,6 graus por cada 5 mg/ml, e de 0,24 graus por cada 20 mg/ml, para as três amostras restantes. Neste gráfico foi plotada uma reta vertical próxima ao ângulo onde se apresenta a maior declividade (57,81 graus). Com referência a esta reta pode-se apreciar para as cinco concentrações inferiores (a-e) que os cruzamentos entre as curvas *RPS* e a reta apresentam espaçamentos similares. Caso contrário ao comportamento das três amostras restantes (f-h), nas quais os espaçamentos são diferentes.

Na Figura 42-b apresentam-se os sensogramas que mostram a variação de reflectância para cada uma das amostras estudadas na Figura 42-a. É possível observar que para as amostras que se localizam na região linear (a-e) a variação da refletância mantém um valor próximo de 0,06 entre cada uma delas, no entanto, para as amostras que se encontram fora da região linear e que apresentam concentrações mais altas (f-h), observam-se variações ΔR fora de um padrão linear, para ΔC iguais. A informação do gráfico permite concluir que para concentrações inferiores de 20 mg/ml, a resposta do sensor apresenta um comportamento linear.

Para observar a eficiência do processo de lavagem do circuito hidráulico, os dados do sinal de reflectância para os primeiros 200 segundos, obtidos após este processo foram sobrepostos e ampliados como pode-se observar na Figura 43.

Figura 43 - Superposição dos sinais de reflectância registrada para cada uma das lavagens que mostram-se nos primeiros segundos 200 segundos da Figura 42-b.

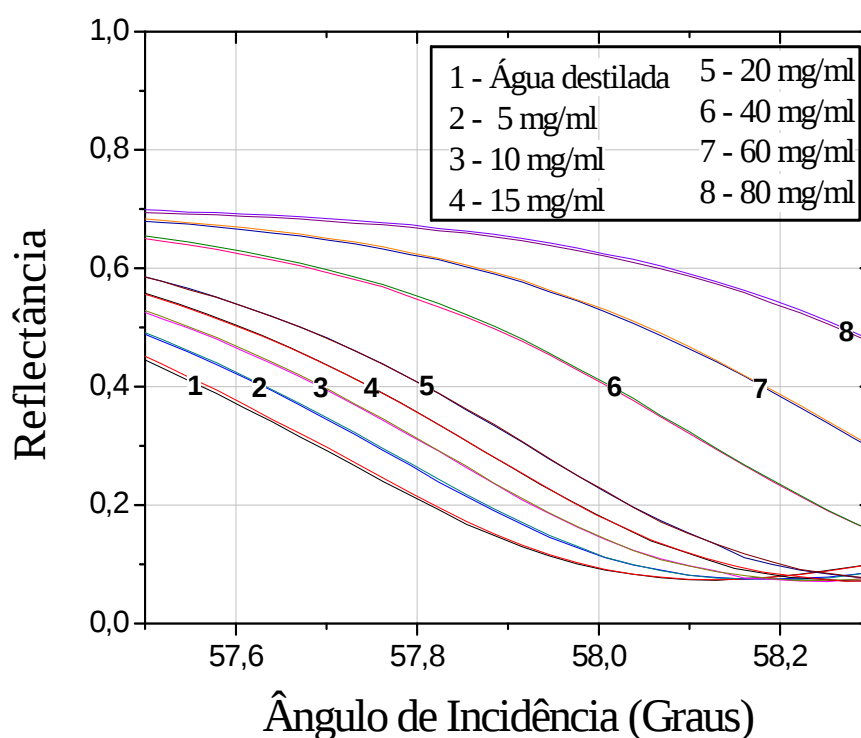


Fonte: autor.

Ao realizar uma comparação entre as curvas do sensograma da Figura 43, é possível observar um aumento progressivo no sinal de reflectância, que possivelmente pode ser causado pelos resíduos de NaCl que ficam dentro do circuito hidráulico após a medição, e que não são evacuados pelo processo de lavagem, causa que possivelmente pode estar associada a uma adsorção da solução salina por parte dos elementos do circuito hidráulico. A curva de reflectância correspondente à concentração de 60 mg/ml, apresenta um pico que parece ter sido causado por um resíduo de NaCl que não foi evacuado na lavagem anterior.

Por último, a Figura 44 apresenta para as concentrações anteriormente descritas uma comparação entre as curvas *RPS* registradas, para as amostras em regime estático e regime dinâmico (as amostras inseridas em regime dinâmico foram feitas com uma taxa 1 ml/min).

Figura 44 - Curvas *RPS* para diferentes concentrações em fluxo estático e dinâmico.



Fonte: autor.

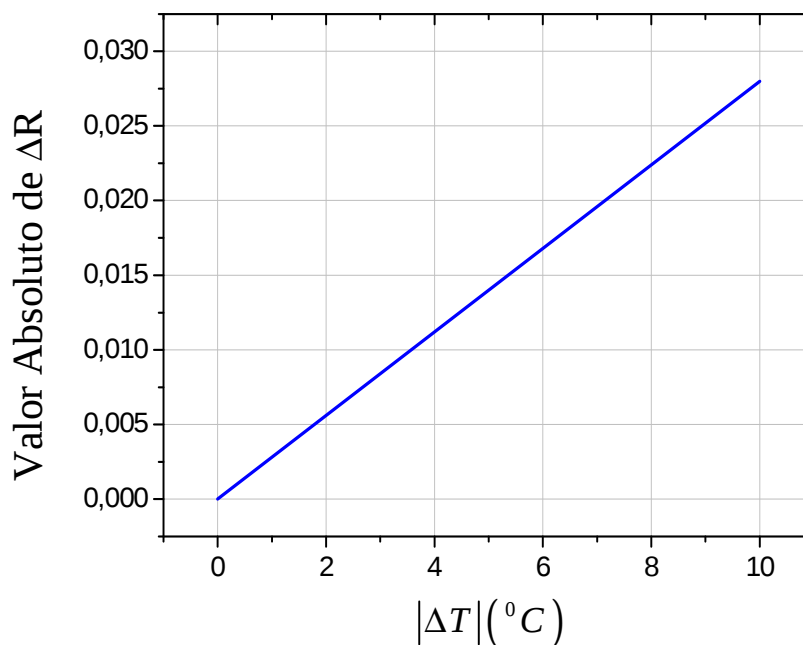
Na Figura 44 observa-se a superposição das curvas *RPS*, não sendo possível perceber um deslocamento que permita distinguir uma da outra, sugerindo que para as condições deste experimento não representam variação significativa no regime do fluxo em que são registradas as curvas.

4.4 Efeito da Temperatura na Reflectância

A temperatura da amostra contida na célula de infusão pode sofrer variações, as quais podem ser causadas por flutuações da temperatura no laboratório ou das variações da temperatura das amostras inseridas na célula de infusão. As flutuações térmicas que afetam as soluções aquosas geram variações no índice de refração da amostra, que podem ser detectadas pelo sensor de *RPS*.

Com o propósito de acrescentar a caracterização do reflectômetro integrado no estudo das variações térmicas nas amostras, foi necessário inicialmente determinar a relação que existe entre a reflectância e a temperatura. Com ajuda da Equação 28, que representa a variação do índice de refração em função da temperatura, para uma faixa de temperaturas entre 20 e 30 °C ($\Delta T = 10$ °C) e a reflectância em função do índice de refração (Figura 41), foi possível determinar a dependência da reflectância com a temperatura, como se apresenta na Figura 45.

Figura 45 - Reflectância em função da temperatura para uma configuração SF2-BK7-Au-(água destilada com $20 < T < 30$ °C).



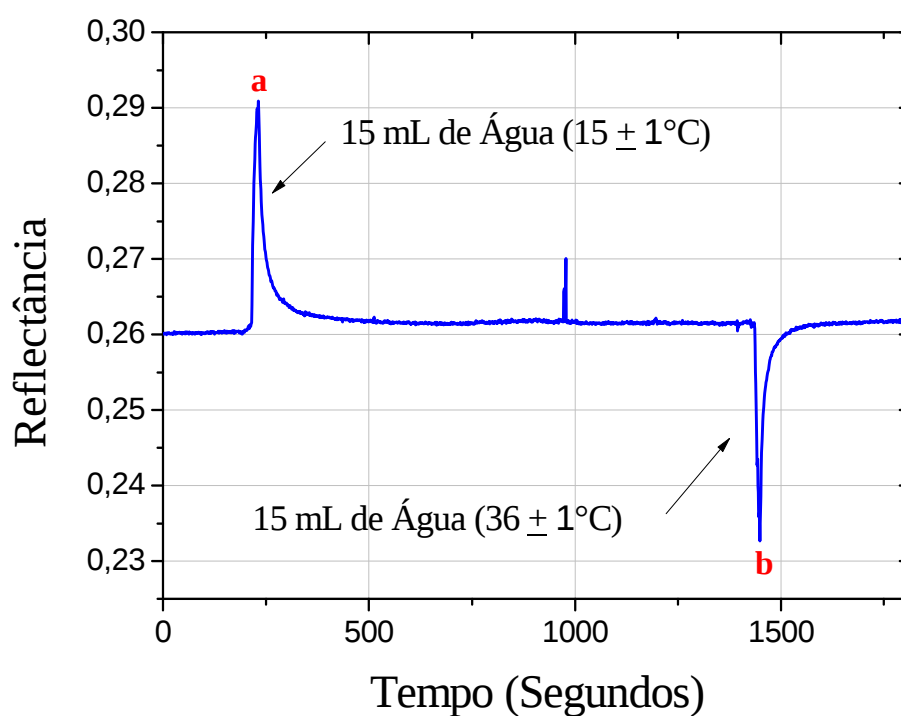
Fonte: autor.

Na Figura 45 observa-se que para a faixa de variação de temperatura entre 0 e 10 °C, o reflectômetro na configuração SF2-BK7-Au - (água destilada), responde linearmente com

uma inclinação de $dR/dT = 0,0028 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, a qual permite determinar que para uma amostra de água destilada que varia sua temperatura em $1 \text{ } ^\circ\text{C}$, o sistema responde com variações na reflectância de 0,0028.

Posteriormente foi planejado um experimento com o objetivo de observar como é a dinâmica de variação da reflectância com a temperatura. Levando em conta que o desenho da célula não permite o posicionamento de um termômetro dentro dela, se optou por realizar a medição da temperatura da amostra contida na seringa, justamente antes de inserir-se dentro do sistema. No experimento foram inseridas de maneira independente duas amostras de água de 15 ml com uma taxa de 30 ml/ min e com temperaturas de 15 e $36 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$. O sensograma obtido é apresentado na Figura 46.

Figura 46 - Reflectância em função do tempo para uma amostra de água.



Fonte: autor.

O sensograma da Figura 46 mostra duas variações significativas no sinal de reflectância, associadas às variações do índice de refração, geradas pelas variações na temperatura da amostra alojada dentro da célula de infusão. É possível observar um aumento (a) e uma queda (b) na reflectância de aproximadamente 0,03, em ambos os casos que

correspondem respectivamente às temperaturas de 15 e 36 °C da água inserida dentro da célula de infusão.

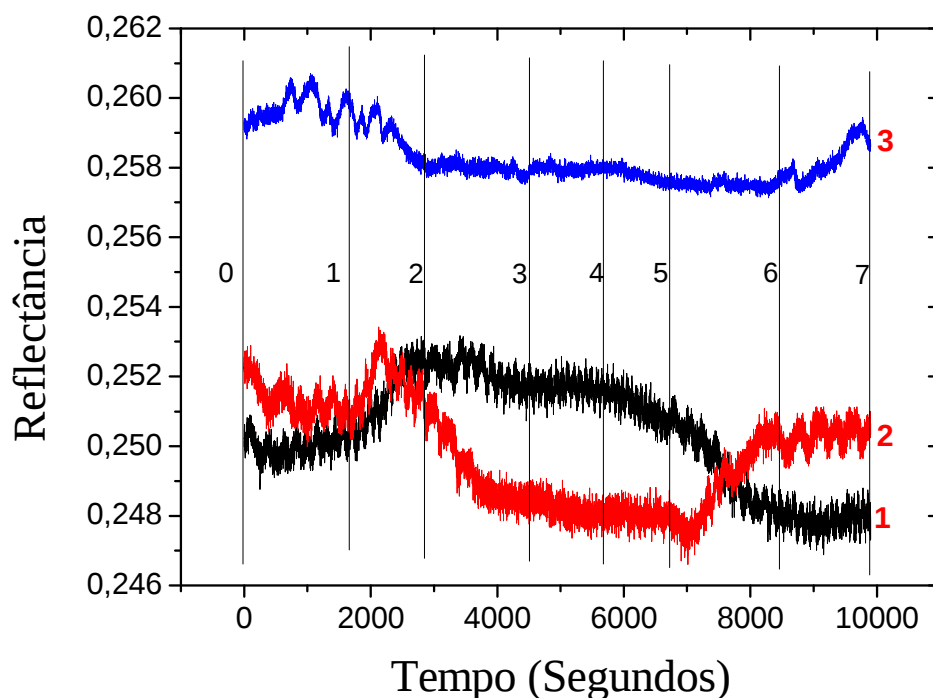
Uma maneira de determinar a temperatura da amostra dentro da célula de infusão é utilizando a relação de reflectância em função da temperatura $dR/dT = 0,0028 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ encontrada na Figura 47, a partir da qual foi possível determinar que para uma variação de 0,03 no sinal de reflectância, se apresenta uma variação aproximada de 11 °C na temperatura da amostra contida na célula de infusão. Sendo a temperatura de referência de 24 °C, se obtém que as temperaturas aproximadas das amostras dentro da célula de infusão são de 14 e 35 °C respectivamente. Observando uma leve diferença entre elas, a variação entre o valor estimado e o valor medido, pode ter relação com a variação da temperatura gerada pela adsorção e dissipação de calor, ao longo do percurso percorrido pelo circuito hidráulico do sistema.

Continuando com a ideia de analisar a influência da temperatura na reflectância, foi realizado um experimento utilizando regime estático e contínuo para observar se eles geram variações significativas nos valores de reflectância. Para uma temperatura média de 24 °C. Assim, foram estabelecidas condições de tempo e vazão em que foi inserida água destilada dentro da célula de infusão apresentadas na Tabela 4.2. Utilizando estas condições foram realizados três sensogramas que registram a reflectância em um período de sete horas, para uma posição do prisma de 5,5 graus. A Figura 47 apresenta o resultado dos três sensogramas que foram realizados independentemente nas mesmas condições anteriormente descritas.

Tabela 4.2 Infusões para avaliar o efeito do fluxo na temperatura.

<i>Intervalo de Tempo (horas)</i>	<i>Vazão (ml/hora)</i>	<i>Vazão (μl/min)</i>
0-1	0	0
1-2	2	33,3
2-3	3	50,0
3-4	5	83,3
4-5	10	166,6
5-7	0	0

Figura 47 - Sensogramas para as condições de vazão indicadas na Tabela 2.

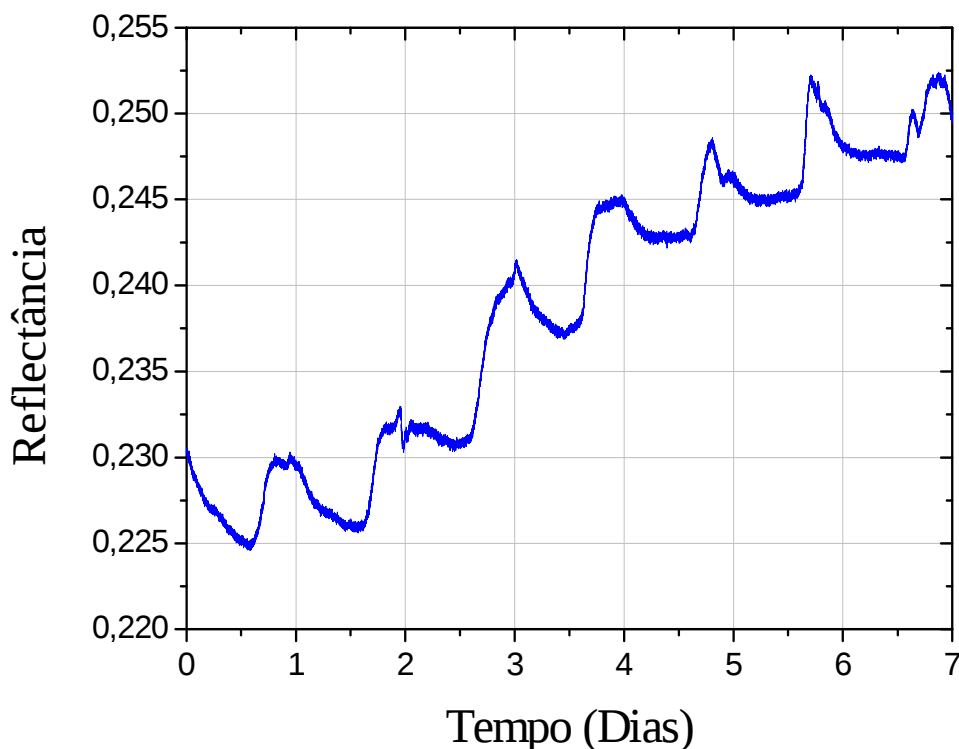


Fonte: autor.

É possível observar nos sensogramas da Figura 47 que para cada intervalo de tempo (indicado na Tabela 4.2), o sinal de reflectância não mantém um padrão no comportamento que possa ser associado à vazão inserida no momento. É provável que as variações na reflectância tenham uma relação direta com as variações de temperatura tanto da amostra inserida como do ambiente da sala ou também dos equipamentos do reflectômetro. Se a causa das flutuações do sinal é realmente a temperatura, os espectros 1, 2 e 3 apresentam variações máximas na reflectância de 0,0047, 0,0053 e 0,0028, valores acima do erro do sistema de 0,002 relatado em (23) e que corresponderiam respectivamente com flutuações de temperaturas de aproximadamente 1,7, 1,9 e 1 °C.

Visando analisar a influência da temperatura dentro da sala foi realizado um experimento utilizando uma amostra de água destilada com temperatura média de 24 °C em regime estático, frequência de amostragem de 10 segundos e para o prisma uma posição angular de 5,5 graus. O sensograma que mostra a evolução do sinal de reflectância para um período de sete dias é apresentado na Figura 48.

Figura 48 - Evolução do sinal de reflectância para um período de 7 dias.



Fonte: autor.

Durante todo o período de medição do experimento foi monitorada periodicamente a temperatura da sala com um termômetro, observando-se que esta permaneceu aproximadamente em 24 °C, esperando-se obter uma curva de reflectância com leves variações no decorrer dos dias. No entanto, pode-se notar na Figura 48 que o sinal de reflectância vai aumentando progressivamente com o tempo. Este comportamento nos indica que existe um fator que interfere no comportamento da curva.

Entre os parâmetros que podem afetar visivelmente a curva de reflectância está a variação da temperatura. É por isso que se optou por determinar este valor indiretamente com base na relação $dR/dT = 0,0028 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, sendo o valor da reflectância 0,023, obtém-se um valor $\Delta T = 8,2 \text{ } ^\circ\text{C}$, que indica a variação da temperatura. Novamente observando o comportamento da curva é esperado que este valor corresponda a uma queda na temperatura visto que a reflectância está aumentando. Assim iniciando com uma temperatura de 24 °C e com uma queda de 8,2 °C, a temperatura esperada seria de 16 °C aproximadamente, valor de temperatura que não coincide com a temperatura de 24 °C registrada pelo termômetro.

Observa-se que existe uma discordância entre o valor calculado da temperatura e o valor medido pelo termômetro, que não corresponde ao comportamento mostrado pela curva, o que nos leva a sugerir que o aumento do sinal de refletância pode estar associado a outros fatores como uma possível instabilidade nas fontes de alimentação, laser, fotodetectores, contaminação da água utilizada etc., hipóteses que não foram testadas no presente trabalho e que merecem investigações em pesquisas futuras.

5 CONCLUSÕES

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

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

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

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

A partir das curvas de refletância obtidas com o reflectômetro integrado na configuração de refletância total (ATR), foi possível determinar o ângulo crítico para uma série de amostras com concentrações salinas diferentes, permitindo com ajuda do índice de refração do prisma, calcular o índice de refração das amostras. Esta configuração oferece diversas aplicações, sem precisar estritamente do efeito de plásmon de superfície, já que o reflectômetro integrado pode ser utilizado para determinar índices de refração.

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

O sistema integrado de RPS foi usado para determinar o índice de refração em amostras líquidas nas quais foi variada a concentração de NaCl, que permitiu calcular uma resposta sensora de 5.3×10^{-4} , valor que se considera apropriado e suficiente para o desenvolvimento de sensores biomoleculares.

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

As curvas de RPS, tanto em regime estático como dinâmico, realizadas nas mesmas condições de temperatura e concentração, não apresentam diferenças significativas nos valores de refletância. Conclui-se assim, que as medições da refletância podem ser realizadas em qualquer regime sem ter variações que comprometam seu comportamento.

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

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

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

REFERÊNCIAS

1. WOOD, R. W. **On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum.** Proc. Phys. Soc. London, v.18. p. 269-275, 1902.
2. RAYLEIGH, L. **Dynamical Theory of Gratings.** Proceeding of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, v.79, p. 399-416, 1907.
3. RITCHIE, R. H.; ARAKAWA, E. T.; COWAN, J. J.; HAMM, R. N. **Surface-Plasmon Resonance Effect in Grating Diffraction.** Phy. Rev, Lett. 21, p. 1530, 1968.
4. OTTO, A. **Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection.** Zeitschrift für Physik, v. 216, Issue 4, p. 398-410, 1968.
5. KRETSCHMANN, E. **Determination of Optical Constants of Metals Through the Stimulation of Surface Plasma Oscillations.** (in German), Z. Phys., v. 241, No.4, p. 313-324, 1971.
6. HOMOLA, J. **Surface Plasmon Resonance Sensor for Detection of Chemical and Biological Species.** Chemical Rev., v. 108, p. 462-493, 2008.
7. JORGENSEN, R. C.; YEE, S. S. **A Fiber-Optic Sensor Based on Surface Plasmon Resonance.** Sensors and Actuators B, v. 12, No. 3, p. 213-220, 1993.
8. FONTANA, E.; PANTELL, R. H.; STROBER, S. **Surface Plasmon Immunoassay.** Appl. Optics, v. 29, No.31, p. 4694-4704, 1990.
9. OTTO, A. **Spectroscopy of Surface Polaritons by Attenuated Total Reflections.** Optical Properties of solids, Chapter 13, p. 677-729, ed. North-Holland, 1975.
10. KRETSCHMANN, E; RAETHER, H. **Radiative Decay of Nonradiative Surface Plasmons Excited by Light.** Z. Naturforsch 23A, p. 2135-2136, 1968.

11. LIEBERG, B.; NYLANDER, C.; LUNDSTROM, I. **Surface Plasmon Resonance for Gas Detection and Biosensing**. Sensors and Actuators v. 4, p. 299-304, 1983.
12. FONTANA, E. **Fundamentos de Óptica e Propagação de Luz**. Notas de Curso. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica-UFPE, Recife-Brasil, 1999.
13. CHEN, W. P.; CHEN, J. M. **Use of Surface Plasma Waves for Determination of the Thickness and Optical Constants of thin Metallic Films**. J. Opt. Soc. Am. 71(2), p. 189-191, 1981.
14. HECHT, E. **Optics**. 4th. Edition, San Francisco, Addison Wesley, p. 122-123, 2002.
15. FERREIRA, D. **Espectrômetro de Plásmos de Superfície no Infravermelho para o Desenvolvimento de Biossensores**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
16. MACIEL, J. O. **Ressonância de Plásmos de Superfície: Relação de Dispersão, Otimização de Parâmetros e Observação Experimental**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, UFPE, p. 79-81, 2000.
17. FONTANA, E. **Thickness Optimization of Metal Films for the Development of Surface Plasmon Based Sensors**. Applied Optics, v. 45, No. 29, p. 7632-7642, 2006.
18. HOMOLA, J. **Present and Future of Surface Plasmon Resonance Biosensors**. Springer, Anal Bioanal Chem, v. 377, p. 528-539, 2003.
19. SNYDER, A. W.; LOVE, J. D. **Optical Waveguide Theory**. Springer 1983.
20. **Handbook of Chemistry and Physics**, 67th. Edition, CRC Press, p. E377-392, 1986-1987.
21. REGATOS, D. **Biossensores Ópticos de Alta Sensibilidad Basados en Técnicas de Modulación Plasmónica**. Tesis, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2012.

22. AKASAKA, H. **Detailed Evaluation of protein Adsorption on Alumina Surface Through Turface Plasmon Resonance Phenomenon.** Applied Surface Science, v. 258, p. 9526- 9530, 2012.
23. CAVALCANTI, G. **Reflectômetro Controlado por Computador e sua Aplicação na Detecção de Hidrogênio com Filmes Finos de Paládio e Ouro/Paládio.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.
24. LOIBMAN, J. R. **Sistema de Infucao de Liquidos Controlado por Arduino.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2013.
25. CAVALCANTI, G. **Caracterização Precisa de Filmes Metálicos e Novas Propostas de Transdutores Ópticos por Ressonancia de Plásmons de Superficie.** Teses Doutoral do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
26. **Salt and sugar solutions vs refractive index.** Disponível em: <http://www.topac.com/salinity_brix.html>. Acessado em 01/05/2014
27. FONTANA, E.; CAVALCANTI, G. **Maintaining a Stationary Laser Footprint During Angular Scan in Internal-Reflection Experiments.** Applied Optics 52 (32), p. 7669-74, 2013.