

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

A. O. Dominguez*, J. R. Loibman*, G.O. Cavalcanti** e Eduardo Fontana*

* Dep. de Eletrônica e Sistemas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

** Dep. de Engenharia Eletrônica, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil.

E-mail: fontana@ufpe.br

Resumo: Este trabalho relata o desenvolvimento de um reflectômetro óptico com sistema integrado de infusão multicanal. 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. As principais características do sistema são descritas e são relatados testes preliminares sobre o uso do sistema na caracterização óptica de soluções de NaCl.

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

Abstract: *This paper reports development of an optical reflectometer with a multichannel integrated infusion system. The reflectometer can be used for monitoring dynamic processes in liquids by means of surface plasmon resonance with potential use in the field of biosensors. The main characteristics of the system are described and preliminary tests are reported on the use of the system in the optical characterization of NaCl solutions.*

Keywords: *SPR, reflectometer, biosensor, surface plasmon resonance, gold*

Introdução

O efeito de ressonância de plásmons de superfície (RPS) [1] foi proposto na década de 80 como um novo mecanismo de transdução óptica que permitiria a análise em tempo real da cinética de reações biomoleculares sem o uso de marcadores fluorescentes ou radioisotópicos [2] – [6]. O Biacore, primeiro equipamento comercial a explorar essa técnica, foi lançado no começo da década de 90 pela Pharmacia [7] 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 aquelas dirigidas à caracterização de reações biomoleculares, desenvolvemos um reflectômetro completamente automatizado que permite a monitoração de processos dinâmicos, aí incluídas reações biomoleculares de superfície. Diferentemente dos sistemas tradicionais que operam com um feixe focalizado fixado em um único ponto da superfície, o que dificulta a medição paralela de múltiplas reações, o sistema descrito neste trabalho permite esse modo de

medição, pois opera com varredura tanto angular do feixe laser na superfície sob teste como linear ao longo de duas direções ortogonais na superfície. Um sistema multicanal de infusão de líquidos, controlado por computador, foi também desenvolvido e integrado ao reflectômetro.

A seguir é feita uma descrição mais detalhada da funcionalidade do sistema integrado e são mostrados resultados experimentais preliminares de monitoração de flutuações no índice de refração de uma substância líquida sob fluxo contínuo em uma célula de reação, simulando a situação que seria esperada na medição de reações biomoleculares.

Materiais e métodos

Efeito de RPS em interface metal-líquido – Na Figura 1 está ilustrada a configuração de Kretschmann [1] para observação do efeito de RPS em uma interface metal-líquido, como explorado no presente trabalho. Nessa configuração, um feixe laser polarizado no plano de incidência ilumina internamente a face horizontal do prisma. O filme metálico, depositado em um substrato de vidro, é colocado em contato óptico com o prisma usando um gel de índice de refração próximo ao do vidro. O metal utilizado em aplicações envolvendo reações biomoleculares é o ouro, que não sofre oxidação ou degradação por efeitos atmosféricos, e por exibir o

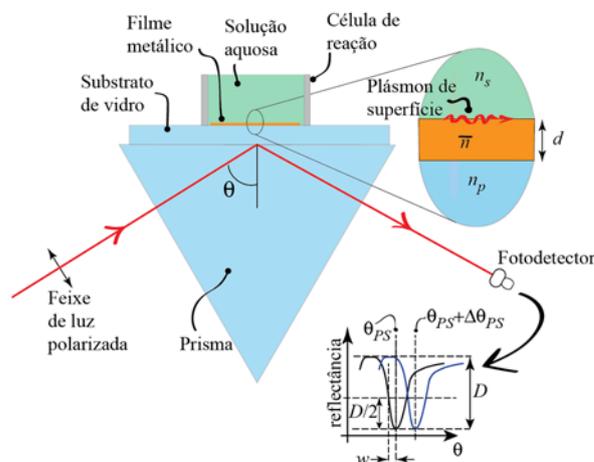


Figura 1: Configuração de Kretschmann para observação do efeito de RPS em interface metal-líquido.

maior fator de qualidade da curva de RPS perante outros metais nobres [8].

A imagem expandida na Figura 1 mostra em mais detalhe a estrutura composta do substrato de vidro com índice de refração aproximadamente igual ao do prisma (n_p), coberto com o filme metálico de espessura d e índice de refração complexo

$$\bar{n} = n - j\kappa, \quad (1)$$

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

A caracterização do efeito de RPS é feita pela medição da intensidade de luz refletida no fotodetector ilustrado na Figura 1. O efeito ressonante é observado em uma estreita faixa angular dentro daquela em que ocorreria reflexão interna total na ausência do filme metálico [8], i.e.,

$$\theta > \theta_c = \text{sen}^{-1}(n_s / n_p). \quad (2)$$

Processos dinâmicos ocorrendo na vizinhança da superfície metálica, provenientes, por exemplo, de reações biomoleculares, causam flutuações no índice de refração resultando em um deslocamento na curva de ressonância, conforme ilustrado na Figura 1. A medição do deslocamento angular $\Delta\theta_{PS}$ do ângulo de ressonância θ_{PS} permite inferir o grau de variação do índice de refração. Se a variação for causada, por exemplo, pela imobilização de biomoléculas na superfície, a concentração de biomoléculas em solução pode então ser quantificada.

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

$$\Delta\theta_{PS} \approx \text{tg}\theta_{PS} (\Delta n_s / n_s). \quad (3)$$

A sensibilidade da técnica depende de quão pequena seja a meia largura à meia altura w da curva de ressonância, ilustrada na Figura 1. A magnitude da declividade da função reflectância R à meia altura, conforme indicado na Figura 1, é aproximadamente [8]

$$\Delta R / \Delta\theta \approx D / (2w), \quad (4)$$

em que D é a faixa dinâmica, indicada na figura. Para uma variação $\Delta\theta = \Delta\theta_{PS}$, (3) e (4) fornecem

$$\Delta R = Q_{PS} (\Delta n_s / n_s), \quad (5)$$

em que

$$Q_{PS} = \frac{D}{2w} \text{tg}\theta_{PS} \quad (6)$$

é definido como o fator de qualidade da curva de RPS. A expressão (5) mostra que para uma dada variação relativa do índice de refração da região vizinha à superfície metálica, a variação de sinal será tanto maior quanto maior for o fator de qualidade. Com base nos dados da ref.[8], para $\lambda = 975,1$ nm, no caso de filme de ouro e prisma de vidro SF2, assumindo o valor tabulado do índice de refração da água destilada em $T = 300K$, de aproximadamente $n_s \approx 1,333$, tem-se $\theta_{PS} \approx 56$ graus, $w \approx 1,7$ mrad e (6) fornece $Q_{PS} \approx 440$, para $D=1$. Assumindo, por exemplo, uma relação sinal ruído típica de 1000, estima-se, com o uso de (5) um limite de detecção de $\Delta n_s / n_s \approx 2 \times 10^{-6}$.

Reflectômetro automatizado – O reflectômetro automatizado adaptado neste trabalho para monitoração de processos dinâmicos em soluções aquosas está ilustrado no diagrama esquemático da Figura 2. A fonte de luz é um laser *pigtail* emitindo no comprimento de onda de 975,1 nm através da íris I. Esta reduz o diâmetro do feixe para aproximadamente 1 mm. O feixe transmitido através do polarizador P com eixo paralelo ao plano de incidência é refletido pelo separador de feixes S e detectado pelo fotodetector de referência D_2 . O feixe transmitido por S após reflexão na face horizontal do prisma é detectado pelo fotodetector D_1 . Os sinais de D_1 e D_2 são enviados para dois canais de uma placa de aquisição de dados DAS-16 (Keythley-Metrabyte), conectada a um PC, para processamento.

Para reduzir o ângulo θ_{PS} associado à interface ouro-água, para um valor próximo de 60 graus, é utilizado um prisma equilátero de vidro SF2. Com isso, a operação do reflectômetro ocorre em torno da região de incidência normal à face de entrada do prisma. Todos os movimentos de translação (xy ao longo da superfície e z ortogonal à superfície) e rotação do prisma, bem como o posicionamento do fotodetector de sinal são controlados por computador. A faixa de varredura angular do reflectômetro é de 12 graus. A resolução

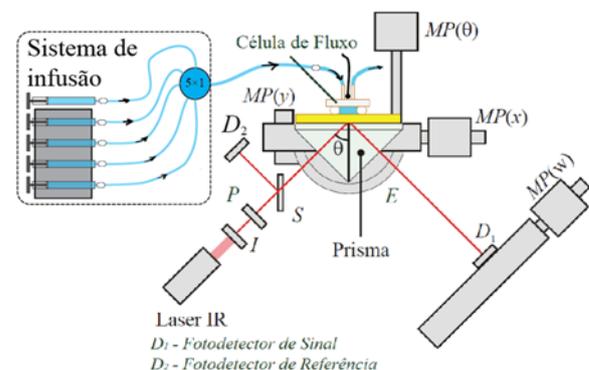


Figura 2: Diagrama esquemático do reflectômetro.

angular do sistema é de 0,005 graus (80 μ rad). O sistema tem embutido um algoritmo de compensação de movimentos para corrigir a refração na face de entrada do prisma perante variações angulares do estágio de rotação [9]. Esse algoritmo garante que o ponto de iluminação do feixe de entrada seja mantido fixado sobre o centro da célula de reação, independentemente do ângulo de incidência e localização da célula sobre a superfície. A célula de fluxo utilizada nos experimentos e ilustrada na Figura 2 tem um volume de 30 μ l.

Sistema de infusão – Um sistema de infusão controlado por computador de quatro canais foi desenvolvido e integrado ao reflectômetro. O sistema, ilustrado na Figura 2 e mostrado isoladamente na Figura 3, contém quatro suportes de seringas acionadas por motores de passo. O controle por computador permite definir volumes de amostras e durações de fluxo para os quatro canais de forma programada. O sistema foi projetado para operação com 5 padrões de seringa (1, 3, 5, 10 e 20 ml). Com a menor seringa, pode-se atingir uma vazão mínima de 1 ml/hora, ou aproximadamente 0,3 μ l/seg.

O módulo de controle foi implementado na plataforma Arduino Mega, e a interface gráfica foi desenvolvida no ambiente Qt Creator [10]. O módulo de controle é conectado ao PC via interface USB.

Para realização de experimentos com fluxo contínuo de amostras distintas através da célula de fluxo, um circuito hidráulico tendo volume total de aproximadamente 1 ml, foi desenvolvido com o emprego de infusores IF05C de duas vias (Compojet) e de torneiras de 3 vias (Embramed), conforme ilustrado na Figura 2. Com esses componentes foi montado um multiplexador de soluções de 5 \times 1. A operação de chaveamento entre amostras distintas é feita manualmente e está em desenvolvimento o controle automático desse procedimento.

Filme de ouro e soluções de NaCl – Foi utilizado um substrato de vidro metalizado com filme de ouro de 99,999% de pureza. A espessura medida por RPS no reflectômetro foi de 54 nm. O substrato utilizado foi de vidro BK7.

Soluções aquosas com cinco valores distintos de índices de refração foram preparadas diluindo quantidades controladas de NaCl em água destilada. As amostras foram todas de 100 ml e as concentrações de



Figura 3: Foto ilustrativa do sistema de infusão.

NaCl nos preparos foram de 0, 5, 10, 15 e 20 mg/ml. A quantidade de soluto em cada solução foi pesada em uma balança semi-analítica (Marte AS1000). Os volumes de água destilada foram medidos com o emprego de seringas de 20 ml. Durante os experimentos, quatro seringas de 20 ml foram acondicionadas no sistema de infusão, uma das quais sendo sempre a amostra de água pura, uma vez que esta era sempre utilizada para lavagem do sistema entre medições de amostras distintas de NaCl. Conforme ilustrado na Figura 2, a quinta amostra, que não permanecia inicialmente no suporte, substituíra uma das amostras de NaCl, logo que esta tivesse sido testada no reflectômetro.

Resultados e Discussão

Vários testes foram realizados para avaliar a capacidade de medição e de controle de fluxo de substâncias líquidas pelo sistema. Nesses experimentos a temperatura se manteve em 24 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C. Foram medidas curvas de dependência angular da reflectância de filmes metálicos em contato com as amostras líquidas, tanto em regime de fluxo contínuo como em regime estático. Desses experimentos não se detectou diferenças significativas entre os dois modos de medida.

Um experimento preliminar foi realizado 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 diferentes amostras. A lavagem do sistema entre amostras nesse experimento foi realizada a uma taxa de 1 ml/min por 5 minutos, tempo esse suficiente para substituição completa do líquido na célula de fluxo.

A Figura 4, mostra a curva de reflectância do prisma para as amostras sob teste. Como pode ser aí observado, há uma pequena alteração na condição de reflexão interna total como função da concentração de sal na célula de fluxo. Dessa medida, para a curva de água destilada tem-se $\theta_c = 55,835$ graus. Utilizando (2), e para o caso do vidro SF2, obtém-se $n_s = 1,348$. Esse valor difere apenas de 1% daquele tabulado na literatura [11].

A Figura 5 mostra as curvas de RPS em filme de ouro medidas no sistema como função da concentração de NaCl. O ângulo de ressonância para o caso da amostra de água destilada é de 57,6826 graus. A meia largura da curva é de $w = 0,196$ graus e a faixa dinâmica é $D = 0,6$. Com esses valores, obtém-se de (6) $Q_{PS} = 139$. Esse valor é aproximadamente 1/3 daquele previsto teoricamente. Essa diferença pode resultar do fato de a espessura do filme não estar otimizada para máximo fator de qualidade [9].

Um experimento de caracterização de variação temporal do índice de refração foi feito para simular a situação tipicamente encontrada em aplicações de biossensores. Nesse experimento, o ângulo de incidência foi fixado no valor $\theta = 57,6$ graus e as diferentes amostras foram injetadas através da célula de reação a uma taxa de 1 ml/min, por cinco minutos cada.

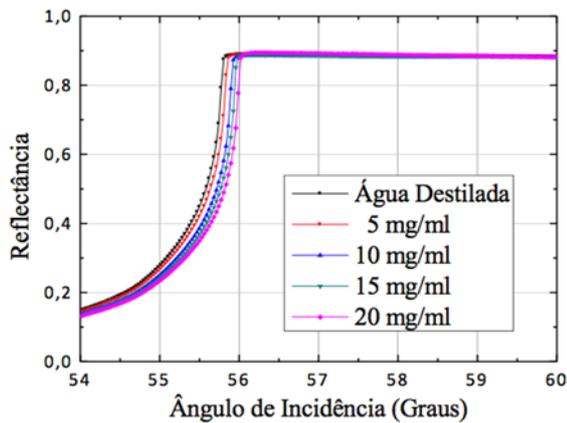


Figura 4: Reflectância do prisma como função da concentração de NaCl.

A Figura 6 mostra a dependência temporal do sinal. Como pode ser aí observado, obtém-se a cada ciclo de limpeza da célula o retorno do sinal à linha de base. Além disso, obtém-se para essa faixa de concentrações uma relação linear entre o sinal e a concentração de NaCl. Com base em (5), e usando $Q_{PS} = 139$, a variação de índice de refração máxima observada para a amostra de 20 mg/ml, correspondente à variação máxima de sinal de 0,35, é $\Delta n_s / n_s = 0,0025$. Essa variação está de acordo com o valor tabulado na literatura de 0,0027 [11].

Conclusões

O reflectômetro automatizado com sistema de infusão integrado relatado neste trabalho pode ser utilizado na caracterização de reações biomoleculares. Trabalhos estão sendo dirigidos no momento para uso do sistema em sistemas biomoleculares bem caracterizados, com o emprego de protocolos de funcionalização bem estabelecidos da superfície de ouro. Os testes realizados no presente trabalho ainda não fizeram uso de filmes de ouro otimizados para máximo fator de qualidade, algo que deverá ser

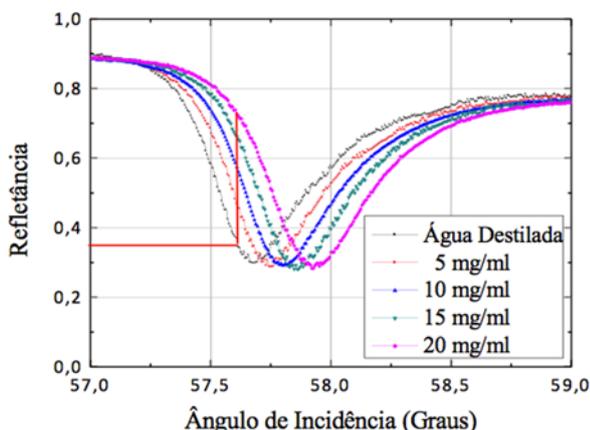


Figura 5: Curvas de RPS em soluções de NaCl.

realizado em trabalhos futuros. Além disso, para evitar

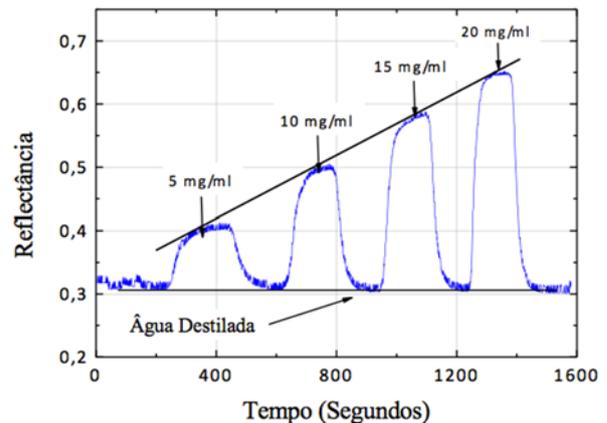


Figura 6: Dependência temporal do sinal.

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. O progresso obtido nesses novos estudos será relatado oportunamente.

Referências

- [1] Kretschmann E. Die bestimmung optischer konstanten von metallen durch anregung von oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift für Physik*. 1971; 241: 313-24.
- [2] Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*. 1983; 4: 299-304.
- [3] Flanagan, MT, Pantell RH. Surface plasmon resonance and immunosensors. *Electronics Letters*. 1984; 20: 968-70.
- [4] Fontana E. Surface plasma wave applications [thesis]. Stanford. Stanford University; 1989.
- [5] Fontana E, Pantell RH, Strober S. Surface plasmon immunoassay. *Applied Optics*. 1990; 29 (31) 4694-4704.
- [6] Sjolander S, Urbaniczky C. Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis. *Analytical Chemistry*. 1991; 63(20): 2336-45.
- [7] Liedberg B, Lundstrom, Stenberg E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B*. 1993; 11: 63-72.
- [8] Fontana E. Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media. *Applied Optics*. 2006; 45 (29): 7632-42.
- [9] Fontana E, Cavalcanti GO. Maintaining a stationary laser footprint during angular scan in internal-reflection experiments. *Applied Optics*. 2013; 52 (32): 7669-74.
- [10] Loibman JR. Sistema de infusão de líquidos controlado por Arduino [monografia]. Recife. Universidade Federal de Pernambuco; 2013.
- [11] Salt and sugar solutions vs refractive index. http://www.topac.com/salinity_brix.html. Acessado em 01/05/2014.