



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

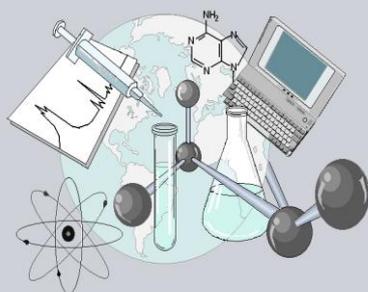
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**BIOSENSORES BASEADOS EM RESSONÂNCIA DE
PLASMON DE SUPERFÍCIE GERADO EM
NANOESTRUTURAS, APLICADOS PARA DETECÇÃO
PRECOCE DE CÂNCER**

Mestrando: Johny Paulo Monteiro
Orientador: Prof. Dr. Emerson M. Girotto

Dissertação apresentada por
Johny P. Monteiro ao Programa de
Pós-Graduação em Química do
Departamento de Química do Centro de
Ciências Exatas da Universidade
Estadual de Maringá para a obtenção do
título de mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Emerson M. Girotto



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, Abril 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação

**BIOSENSORES BASEADOS EM RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE
GERADO EM NANOESTRUTURAS, APLICADOS PARA DETECÇÃO PRECOCE DE
CÂNCER**

Johny Paulo Monteiro

Orientador: Emerson Marcelo Giroto

Maringá, Abril de 2011

JOHNY PAULO MONTEIRO

BIOSSENSORES BASEADOS EM RESSONÂNCIA DE
PLASMON DE SUPERFÍCIE GERADO EM
NANOESTRUTURAS, APLICADOS PARA DETECÇÃO
PRECOCE DE CÂNCER

Dissertação apresentada por **Johny P. Monteiro** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do título de mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Emerson M. Girotto

Abril/2011

BIOSENSORES PLASMÔNICOS

Agradeço a Deus, ao meu pai Genésio Gonçalves Monteiro, à minha mãe Dalva Maria de Lima Monteiro, meus irmãos Tonny Paulo Monteiro e Eliane Rose Monteiro Valentini. Agradeço também a todos meus amigos que fizeram parte dessa história

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Emerson M. Girotto pela orientação.

A todos os professores do Departamento de Química que contribuíram para minha formação.

A Jacqueline Ferreira e Marcos J. L. Santos por me ajudar com todo o suporte teórico e montagem experimental.

Ao Elton G. Bonafé, Alessandro F. Martins, Gedalias C. Martins e Leandro Carneiro pelo companheirismo.

Aos demais colegas do bloco 18.

A CNPq, pela bolsa de mestrado.

A COMCAP pela utilização de equipamentos como MEV e AFM.

Ao Departamento de Química (DQI) da Universidade Estadual de Maringá que me proporcionou a realização do meu projeto de mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Índice de Abreviações

IARC/OMS – (*International Agency for Research on Cancer*) Agência Internacional para Pesquisa em Câncer/Organização Mundial de Saúde

SPR – (*Surface Plasmon Resonance*) Ressonância de Plasmon de Superfície

SRG – (*Surface Relief Grating*) Superfície com Grades em Relevô

SP – (*Surface Plasmon*) Plasmon de Superfície

SPP – (*Surface Plasmon Polariton*) Poláriton de Plasmon de Superfície

ELISA – (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) Análise de Enzima Imuno Adsorvida

BSA – (*Bovine Serum Albumin*) Albumina do soro bovino

MUA – (*11-Mercaptoundecanoic Acid*) Ácido 11-Mercaptoundecanóico

NHS – N-hidroxisuccinamina

PBS – (*Phosphate Buffered Saline*) Tampão Salino de Fosfato

PDMS – Polidimetilsiloxano

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDC – 1-Etil-3-(3-dietilaminopropil) Carbodiimida

SAM – (*Self-Assembled Monolayer*) Monocamada Auto-Montada

Biotina-NHS – Biotina N-hidroxisuccinamida Éster

FIB – (*Focused ion beam*) Feixe de Íons Focados

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

PET – Politereftalato de Etileno

FWHM – (*full width at half maximum*) Largura Total na Metade do Máximo

HER-2 – (*Human Epidermal Growth Factor-Receptor 2*) Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidermal Humano

Índice de Figuras

- Figura 1.** Configuração de Kretchmann para SPR. Ressonância de Plasmon de Superfície é excitada na interface metal/ar quando o ângulo de incidência da luz é tal que a componente evanescente do próprio vetor onda (K_{ev}) é igual ao vetor onda da propagação do Plasmon de Superfície (K_{SP}).¹⁴ 23
- Figura 2.** Principais modos de detecção usados em biossensores baseados em SPR: (A) detecção direta; (B) modo de detecção sanduíche; (C) modo competitivo; (D) modo de detecção por inibição.⁶² 31
- Figura 3.** Imagem MEV de uma nanoestrutura obtida através de um feixe de íons focado. O tempo necessário para a fabricação desta amostra foi de 8 minutos.¹⁰⁴ . 43
- Figura 4.** Imagens MEV de dois conjuntos de nanoburacos, gerando as letras 'hv'. Quando esta estrutura é iluminada com luz branca, a cor transmitida é determinada pela periodicidade do arranjo. Neste caso as periodicidades foram escolhidas como 550 nm e 450 nm e geraram as cores vermelha e verde respectivamente.¹¹³ 46
- Figura 5.** Os nanoburacos foram fabricados em filmes espessos de prata iluminados com luz branca. (A), uma abertura circular e (B), espectro de transmissão através do buraco com diâmetro 270 nm em um filme de 200 nm de espessura. (C), uma abertura retangular e (D), espectro de transmissão como uma função do ângulo de polarização θ para os seguintes parâmetros geométricos: 210 nm X 310 nm, espessura do filme 700 nm. 47
- Figura 6.** Espectro de transmissão normal de luz branca através do filme de ouro de 40 nm de espessura (A) liso e através do filme contendo um arranjos de buracos de (B) 180 nm e (C) 280 nm de diâmetros.¹²² 48
- Figura 7.** Estrutura molecular do azo polímero pDR1A. 49
- Figura 8.** Arranjo experimental utilizado para produzir um feixe de luz com perfil de interferência ajustável que proporciona a formação de grades a partir da fotoisomerização do grupo azobenzênio presentes no polímero.¹²³ 50

Figura 9. Refletividade de luz (em comprimento de onda fixo) incidindo sobre grades com quatro diferentes periodicidades ($p=350, 700, 1100$ e 1400 nm) imersas em dois diferentes índices de refração ($n_a=1,32$ e $1,37$). ¹²⁵	52
Figura 10. (A), esquema e imagens de microscopia eletrônica de varredura ilustrando a arquitetura do <i>chip</i> de microfluido com arranjo de nanoburacos embutido e em (B), estrutura experimental usada para medir o efeito da transmissão óptica extraordinária (EOT). O filme metálico (depositado sobre um substrato de vidro) contendo arranjos de nanoburacos obtidos por FIB é exposto a solventes distribuídos utilizando o sistema de microfluidos. ¹¹²	54
Figura 11. Esquema e descrição do método de obtenção dos microcanais por litografia <i>soft</i>	60
Figura 12. (A) Peça de PDMS contendo os microcanais. (B) microcanais alinhados com o substrato contendo arranjos de nanoburacos. (C) Montagem final do sistema utilizando microfluidos integrado com substrato contendo arranjo de nanoburacos.	61
Figura 13. Esquema utilizado para medidas de sensibilidade dos arranjos de nanoburacos, frente às soluções de glicose de diferentes índices de refração.	62
Figura 14. Esquema utilizado para medidas de sensibilidade das grades de relevo, frente às soluções de glicose de diferentes índices de refração.....	64
Figura 15. Superior: representação esquemática dos arranjos de nanoburacos (200 nm de diâmetro) no substrato com periodicidades de 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445 e 455 nm, percorrendo os arranjos “A” para “J”, respectivamente. A e B são imagens obtidas por MEV, de um arranjo quadrado de nanoburacos com periodicidade de 455 nm em ampliações de (A) 2.000x e (B) 20.000x.	69
Figura 16. Imagens obtidas por MEV de uma SRG em filme de azopolímero recoberta com filme de ouro com periodicidade de 400 nm, em ampliações de (A) 2.000x e (B) 10.000x.	70
Figura 17. (A) Espectros de transmissão normal de luz branca para os arranjos de nanoburacos imersos em água em função da periodicidade dos arranjos. (B) Ampliação das bandas 1 e 2 normalizadas.	72

Figura 18. (A) Espectros de transmissão normal de luz branca s-polarizada para os substratos SRG com periodicidade de 400 e 410 nm e profundidade de 120 nm. (B) Ampliação das bandas 1 e 2 normalizadas.	75
Figura 19. (A) Espectros de transmissão normal de luz branca em função do índice de refração para o arranjo de nanoburacos "J" com periodicidade de 455 nm. (B) Curvas de deslocamento dos comprimentos de onda das bandas de transmissão ($\lambda_{\text{máximos}}$) em função do índice de refração, para bandas 1 e 2. Em destaque são mostradas ampliações da região de interesse dos respectivos espectros, normalizados.....	77
Figura 20. (A) e (C) Espectros de transmissão normal de luz branca em função do índice de refração para as SRGs de diferentes periodicidades (400 e 410 nm, respectivamente) e profundidade de 120 nm. (B) e (D) Curvas de deslocamento dos comprimentos de onda das bandas de transmissão ($\lambda_{\text{máximos}}$) em função do índice de refração, para bandas 1 e 2. Em destaque são apresentadas ampliações da região de interesse dos respectivos espectros, normalizadas.	78
Figura 21. Sensibilidades teóricas e experimentais em função da periodicidade dos arranjos, para as banda 1 e 2. As periodicidades dos arranjos são 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445 e 455 nm.....	81
Figura 22. Partes imaginária (ϵ_2) e real (ϵ_1) da função dielétrica complexa do ouro em função do comprimento de onda. ¹³⁹	82
Figura 23. Reação de acoplamento via amina entre biotina-NHS e grupos aminos primárias da cisteamina.	84
Figura 24. Esquema da estratégia de ligação entre biotina e estreptavidina.	85
Figura 25. Regiões ampliadas dos espectros normalizados das bandas de transmissão para cada etapa de modificação para um arranjo de nanoburacos de 455 nm de periodicidade.....	86
Figura 26. Deslocamentos obtidas para a banda 1 (da figura 25 esquerda) observadas após cada etapa de modificação da superfície do ouro contendo arranjos de nanoburacos (455 nm de periodicidade).....	88

Figura 27. Esquema de ativação do grupo carboxílico do MUA usando EDC/NHS e acoplamento da molécula de BSA.	89
Figura 28. Espectros de transmissão normal de luz s-polarizada para SRG com periodicidade de 410 nm e profundidade 120 nm após a modificação da superfície com MUA/BSA.....	90
Figura 29. Deslocamento dos máximos de transmissão normal em função das etapas de modificação da superfície para (A) banda 1 e (B) banda 2 apresentadas na Figura 28. Em destaque: regiões ampliadas dos espectros de transmissão normal de luz s-polarizada (Figura 27) para cada etapa de modificação, normalizadas.....	91
Figura 30. Espectros de transmissão normal de luz branca em função do índice de refração para o arranjo de periodicidade de 400 nm.	93
Figura 31. Deslocamento do $\lambda_{\text{máximo}}$ de transmissão normal para a banda 2 da Figura 30 como função do índice de refração, obtidos para o arranjo de nanoburacos com periodicidade de 400 nm. Em destaque é apresentada a banda 2 (Figura 30) normalizada e ampliada. De a para j corresponde aos espectros de transmissão relativos aos diferentes índices de refração.....	94
Figura 32. Deslocamento da banda 2 como função das etapas de modificação para o arranjo de nanoburacos utilizado para imobilização das biomoléculas. Em destaque: banda 2, do espectro de transmissão, normalizada e ampliada. AC 1 e AC 2 correspondem aos anticorpos biotilado e secundário, respectivamente.	96

Índice

1. Introdução	16
1.1. Sensores para detecção de moléculas químicas e biológicas.....	18
1.1.1. Características buscadas em sensores:	19
1.2. Ressonância de Plasmon de Superfície	20
1.2.1. SPR através de métodos tradicionais	21
1.2.2. SPR através de arranjos de nanoburacos	24
1.2.3. SPR através de grades de difração	25
1.2.4. Vantagens da técnica SPR	26
1.3. Sensores Baseados em SPR para Detecção de Moléculas Químicas e Biológicas.....	28
1.3.1. Aplicações de sensores baseados em SPR para detecção e diagnóstico de câncer	32
1.6. Tecnologia de sensores baseados em SPR	35
1.6.1. Modificação química da superfície do metal transdutor	35
1.6.2. Elementos de biorreconhecimento.....	35
1.6.3. Imobilização de elementos de biorreconhecimento	37
1.7. Nanofabricação	39
1.7.1. Feixe de Íons Focados (FIB)	41
1.7.2. Otimização do arranjo de nanoburacos	43
1.7.3. Interferência de laser	49
1.7.4. Otimização das grades de relevo	51
1.8. Sistema de microfluído	52
2. Objetivos	55
3. Materiais e Métodos	56
3.1. Materiais	56
3.2. Métodos	58

3.2.1. Substrato contendo nanoburacos	58
3.2.2. Grades de relevo	58
3.2.3. Cella de microfluido	58
3.2.4. Caracterização da sensibilidade do arranjo de nanoburacos e das grades de relevo frente a diferentes soluções de glicose.....	61
3.2.5. Preparação da superfície do ouro com alcanotóis	64
3.2.6. Preparação da camada ligante (<i>linker</i>) para imobilização de proteínas ...	65
3.2.7. Imobilização de proteínas.....	66
3.2.8. Imobilização de anticorpo biotilado e detecção de antígeno p185	66
4. Resultados e Discussões	69
4.1. Caracterização dos substratos não-modificados.....	69
4.2. Efeito da periodicidade	70
4.3. Sensibilidade em função do índice de refração	75
4.4. Imobilização de biomoléculas - biossensibilidade.....	83
4.5. Imobilização de anticorpos e detecção do antígeno p185.....	92
5. Conclusões	98
7. Referências Bibliográficas	100

Resumo

Em virtude da incidência de câncer no nosso país e a necessidade de pesquisas que desenvolvam procedimentos para a detecção precoce da doença, atuamos no sentido de desenvolver biossensores que combinam análise em microfluido e nanofotônica para a detecção de moléculas biológicas. Esses biossensores são baseados no efeito de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR). Para isso foram estudados materiais plasmônicos, que acoplados a um sistema de microfluido, foram utilizados no desenvolvimento de um sensor baseado em SPR. Inicialmente o sensor desenvolvido teve como objetivo a detecção precoce de câncer. Contudo este tipo de sensor pode ser utilizado para várias outras aplicações. Foram montados dois tipos de sensores: 1) substrato contendo arranjos de nanoburacos periodicamente ordenados fabricados através de um filme de ouro de 100 nm de espessura; 2) grade de relevo coberta com um filme de ouro de espessura nanométrica, sendo a estrutura da grade periodicamente ordenada. Através do controle da periodicidade e diâmetro das nanoestruturas, os plasmons de superfície serão gerados em uma faixa de comprimento de onda específica, possibilitando a detecção de moléculas através de medidas ópticas. Os nanoburacos foram fabricados pelo método de feixe de íons focado e as grades de relevo pelo método de fotoisomerização de azopolímeros através de interferência de *lasers*. Para caracterizar a superfície dos substratos plasmônicos foi usada a microscopia eletrônica de varredura. A influência da variação da periodicidade das nanoestruturas e a sensibilidade dos sensores foram estudadas através de espectros de transmissão normal UV-vis. A modificação da superfície das nanoestruturas foi realizada utilizando microcanais de fluxo, monitorada através da variação do índice de refração próximo à superfície, empregando-se medidas de

transmissão normal de luz UV-Vis. Os resultados mostraram que a periodicidade exerce influência sobre o espectro da luz transmitida, apresentando um deslocamento para o vermelho das bandas a medida que há um aumento na periodicidade das nanoestruturas. Os melhores resultados de sensibilidade foram de 463 nm/UIR e 198 nm/UIR para o arranjo de nanoburacos e superfície com grades em relevo, respectivamente. Foi verificado também que os substratos foram sensíveis à presença de biomoléculas imobilizadas na superfície das nanoestruturas, sendo observados deslocamentos das bandas de transmissão para o vermelho à medida que camadas moleculares foram sendo adsorvidas na superfície do substrato plasmônico. Este fato torna os substratos aptos para aplicação em biossensores que monitoram eventos de ligação entre moléculas que apresentam bioafinidade. Neste sentido procedeu-se também a detecção do antígeno p185 (usado como biomarcador de câncer de mama) utilizando um substrato contendo arranjos de nanoburacos acoplado ao sistema microfluídico. Essa proteína foi detectada com sucesso a uma concentração de 30 ng/mL o que torna esse tipo de sensor promissor no emprego da detecção precoce de câncer de mama.

1. Introdução

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes locais no corpo, sendo os mais incidentes, entre os homens, os cânceres de próstata, pulmão, estômago, cólon e reto. Entre as mulheres, os mais incidentes são os cânceres de mama, colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão. Desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde. Segundo um relatório recente da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC/OMS), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. A IARC/OMS estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorrerão nesses países.¹

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, que serão válidas também para o ano de 2011, apontam para aproximadamente 490 mil novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina.¹

Diante deste cenário fica clara a necessidade de maiores investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como por exemplo, na detecção precoce da doença. A detecção precoce de câncer significa um avanço muito importante na luta contra a doença, possibilitando a aplicação de tratamento no seu estágio inicial de desenvolvimento, aumentando assim a taxa de sobrevivência dos pacientes. Dados mostram que 95% de pacientes com câncer de ovário que tiveram a doença detectada precocemente sobreviveram. Isto significa um grande avanço no tratamento desta forma de câncer já que a detecção tardia, em quase 100% dos casos, impossibilita ações que poderiam levar à cura e evitar a morte do paciente.²

Para proporcionar aos médicos um perfil de biomarcadores (substâncias encontradas em pessoas com câncer), é necessário produzir um conjunto de biossensores. Levando-se em consideração a grande quantidade de novos casos de câncer, o benefício da diagnose precoce e a limitada disponibilidade de dinheiro do sistema de saúde, fica clara a necessidade de se desenvolver um biossensor integrado que tenha multiplicidade de respostas, ou seja, que possibilite a detecção de várias formas de câncer pelo mesmo sensor e que seja pequeno e de baixo custo. Um sistema de microfluidos chamado *Lab-on-Chip* tem sido adequadamente aplicado para este tipo de análise. Também chamados de sistemas completos de microanálise, estes dispositivos apresentam muitas vantagens sobre os dispositivos em macro escala em termos de velocidade de análise, custo, quantidade de reagente e amostras consumidas durante a análise, contaminação e eficiência.³ Uma vantagem a mais destes sistemas microfluidos é a possibilidade de serem integrados a biossensores baseados em Ressonância de Plasmon de Superfície

(SPR), e que exploram este efeito através de um conjunto de nanoburacos (*nanoholes array*), ou micro conjunto de nanoburacos.⁴

1.1. Sensores para detecção de moléculas químicas e biológicas

O estudo e desenvolvimento de biossensores para detecção de compostos químicos e biológicos têm atraído pesquisadores da área de química, física e de materiais. Estes sensores têm se mostrado ferramentas muito importantes para a análise de produtos químicos e biológicos que contaminam o meio ambiente, agentes patogênicos presentes em alimentos, vírus, etc.⁵⁻⁸ Estes dispositivos apresentam uma série de vantagens quando comparados aos métodos convencionais de cromatografia e métodos bioquímicos como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) e Análise Enzima Imuno Adsorvida (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Utilizando biossensores o tempo necessário para as análises é menor, os dispositivos são encontrados em tamanhos miniaturizados e a instrumentação é compacta; são fáceis de manusear, são portáteis o que facilita análises de campo e ainda apresentam baixo custo. Uma grande variedade de métodos ópticos tem sido investigada para uso em biossensores incluindo SPR, quimioluminescência, interferometria e elipsometria.⁹⁻¹²

Os sensores baseados em SPR são amplamente utilizados em pesquisas biomédicas e bioquímicas para caracterização e quantificação de eventos de ligação próximos a superfície.¹³ A técnica de SPR tem se mostrado extremamente sensível à mudanças de índice de refração de camadas moleculares presentes na superfície de um metal transdutor explorando o fenômeno de Ressonância de Plasmon de Superfície. Desta maneira, reações que ocorrem próximas a superfície podem ser analisadas immobilizando-se moléculas sobre a superfície do metal.¹⁴⁻¹⁶ Sensores

baseados em SPR têm sido amplamente empregados na caracterização de interações de moléculas que apresentem bioafinidade, como interação anticorpo-antígeno aplicada na detecção de câncer, complexos de proteínas de DNA e reações de enzimas com o substrato.^{17,18} Além disso, estes biossensores também têm sido usados para a detecção de morfina,¹⁹ metanfetamina²⁰ e benzo[a]pireno (carcinogênico encontrado em fumaça de cigarro e de carvão).²¹

1.1.1. Características buscadas em sensores:

- **Baixo limite de detecção:** é definido como a menor concentração de analito que pode ser detectada, mas não é necessariamente quantificada como sendo um valor exato. Para testes diretos, o limite de detecção é a função da razão entre sinal e ruído obtidos durante a medida e é determinado como uma relação estatística das variações dos valores de resposta obtidos para as medidas do branco (*background*). É requerido que sensores tenham baixos limites de detecção, ou seja, que sejam capazes de detectar concentrações muito baixa de analito.
- **Alta sensibilidade:** é a variação no sinal de resposta pela variação da unidade de concentração do analito. A sensibilidade é a inclinação da curva analítica (concentração do analito *versus* a resposta do sistema) e se a curva analítica for linear, a sensibilidade será constante e independente da concentração. Se a curva analítica não for linear, a sensibilidade variará com a concentração e não terá valor único.²² É desejado que sensores possuam elevada sensibilidade, isto é, que apresentem elevadas respostas frente a baixas concentrações de analito e que apresentem resposta linear.

- **Elevado tempo de vida:** é importante que o sensor tenha elevado tempo de vida para que o custo de operação seja viável na sua implementação.
- **Baixo tempo de resposta:** é requerido que o sensor possua pequeno tempo de resposta para que a análise se processe em um curto espaço de tempo e se torne conveniente, principalmente para análises rotineiras (análises de antígenos).
- **Alta especificidade:** é definida como a capacidade de medir com exatidão, unicamente, o analito ou componente ativo de interesse, em presença de outros componentes (interferentes) que possam estar presentes na matriz da amostra (impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz, etc.). Pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais.
- **Ampla Faixa de Linearidade:** é a habilidade do sensor de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa. Uma ampla faixa linear é o objetivo buscado em sensores.

1.2. Ressonância de Plasmon de Superfície

O fenômeno de Plasmons de Superfície (SPs) foi amplamente reconhecido na área de ciência de superfície seguindo o trabalho pioneiro de Ritchie na década de 1950.²³ Os SPs são ondas eletrostáticas presentes em uma interface metal/dielétrico e que tem a sua amplitude decaindo exponencialmente à medida que se distanciam da interface. Então os SPs podem ser vistos como ondas

coletivas não-propagantes de elétrons na superfície de um metal condutor. A excitação de SPs pela luz em superfícies planas metálicas gera pláritons de plasmon de superfície (SPP), que são ondas eletromagnéticas que se propagam na superfície do metal em contato com um dielétrico e permanecem confinadas em duas dimensões já que, assim como os SPs, sua amplitude decai exponencialmente à medida que se penetra em cada meio (tanto o dielétrico, quanto metálico).²⁴ Nesta interação, os elétrons respondem coletivamente por oscilação em ressonância com a onda luminosa. A interação ressonante entre a superfície carregada oscilante e o campo eletromagnético da luz constitui o SPR. O confinamento do campo eletromagnético dos SPPs nas proximidades da interface metal/dielétrico resulta em uma extraordinária sensibilidade dos SPPs às condições de superfície, como a alta sensibilidade a mudanças de índice de refração na superfície do metal.²⁵ A escolha do metal a ser usado é crítica, pois o metal deve exibir a propriedade de permitir a propagação da onda plasmônica na superfície. Para isso utilizam-se os metais que possuem constante dielétrica com parte imaginária positiva e pequena, e parte real negativa.²⁶ Os metais mais adequados são prata, ouro, cobre e alumínio, dentre os quais a prata e o ouro são os mais empregados.^{27,28} Algumas características fazem do ouro a melhor escolha, dentre elas se destacam o seu caráter razoavelmente inerte frente a processos oxidativos e muitas reações com agentes químicos, liga-se fortemente a tióis permitindo que a superfície seja modificada para imobilização de moléculas de interesse,²⁹ além de proporcionar a propagação dos SPs.³⁰

1.2.1. SPR através de métodos tradicionais

Para excitação do Plasmon de Superfície, dois diferentes sistemas experimentais foram inicialmente desenvolvidos, um por Otto³¹ e outro por

Kretschmann,³² porém a configuração de refletância total atenuada, desenvolvida por Kretschmann, é normalmente usada na maior parte dos instrumentos comerciais baseados em SPR.^{6,14} A configuração de Kretschmann, Figura 1, baseia-se no fenômeno de reflexão interna total. Este fenômeno ocorre quando a luz polarizada atravessa um meio óptico denso (ex. vidro) e alcança uma interface entre este meio e um meio de densidade óptica menor (ex. ar), e é refletida de volta para o meio mais denso. Embora a luz incidente seja totalmente refletida internamente, uma pequena parte desta radiação, onda ou campo evanescente, penetra na interface do meio menos denso até a distância de um comprimento de onda, 1λ . Em um determinado ângulo de incidência e em um determinado comprimento de onda, quando o vetor de onda do plasmon é igual ao vetor de onda do campo evanescente ($K_{SP}=K_{ev}$), parte da radiação acopla com os “elétrons livres” do filme fino metálico, fazendo com que eles oscilem em ressonância com o campo evanescente, ocorrendo a Ressonância de Plasmon de Superfície. Em conseqüência, ocorre uma perda de energia da luz incidente para o filme metálico, resultando na redução da intensidade da luz refletida, a qual pode ser detectada como um arranjo bidimensional de fotodiodos.³³ Desta maneira, no modo de detecção por ângulo fixo, uma luz polarizada é direcionada através de um prisma até uma interface filme metálico/solução dielétrica e a intensidade da luz refletida é medida contra o ângulo da luz incidente com um detector. Em certo ângulo e determinado comprimento de onda da luz incidente, um mínimo na refletividade é observada, na qual as ondas evanescentes são acopladas aos elétrons da banda de condução dos metais no lado oposto ao de incidência (SPR) na interface metal/isolante. Esse ângulo onde ocorre o mínimo de refletividade é chamado de ângulo SPR. Esse ângulo crítico é muito sensível a mudanças no meio dielétrico

adjacente ao metal e por isso as condições de SPR são influenciadas pela presença de biomoléculas immobilizadas sobre a superfície do metal.

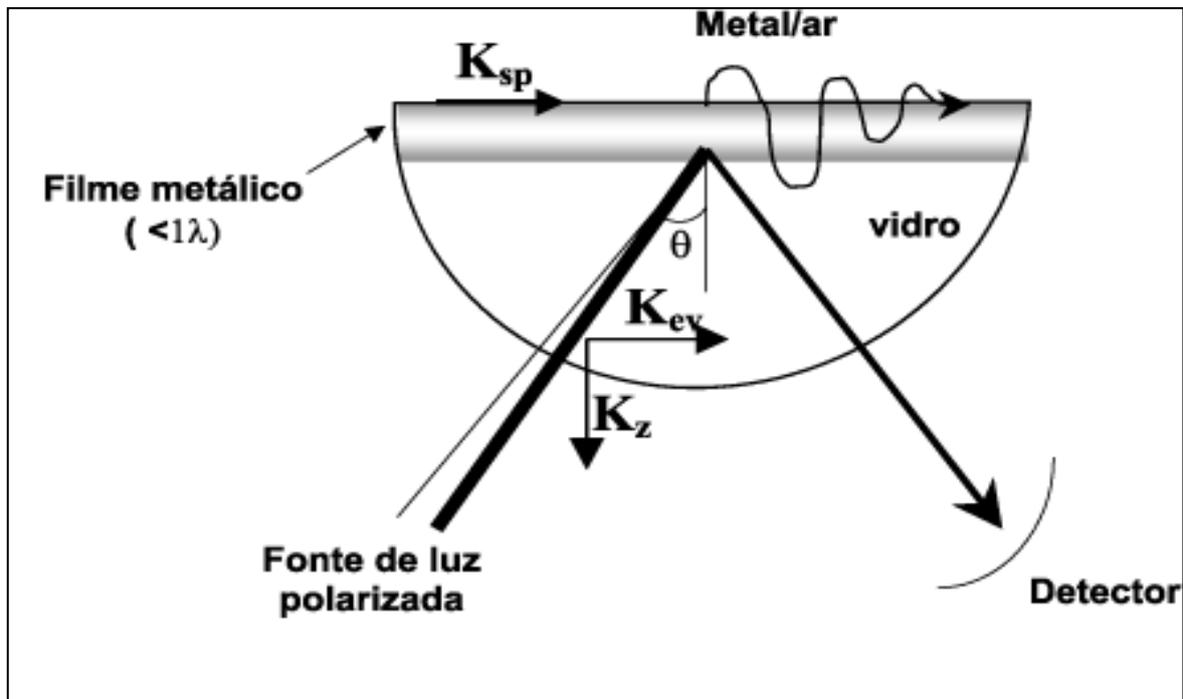


Figura 1. Configuração de Kretschmann para SPR. A Ressonância de Plasmon de Superfície é excitada na interface metal/ar quando o ângulo de incidência da luz é tal que a componente evanescente do próprio vetor onda (K_{ev}) é igual ao vetor onda da propagação do Plasmon de Superfície (K_{SP}).¹⁴Erro! Indicador não definido.

A desvantagem em se trabalhar com SPR convencional é a complexidade e a dificuldade em se alinhar o sistema óptico e encontrar o ângulo perfeito de incidência de luz. Apesar da grande sensibilidade dos sensores baseados em SPR, a dificuldade experimental da análise é um grande inconveniente que tem que ser levado em consideração e por isso outros métodos de acoplamento de luz em plasmon de superfície vem sendo pesquisados.

1.2.2. SPR através de arranjos de nanoburacos

Sensores baseados em SPR que utilizam um conjunto de nanoburacos é um sistema muito interessante que elimina os inconvenientes da técnica convencional. Este modo de análise é feito no modo de transmissão colinear para se coletar as respostas, isso facilita muito o alinhamento óptico do sistema, reduz o tamanho da área de trabalho e possibilita o uso de lentes com grande abertura numérica (NA, *numerical aperture*), ou seja, lentes que podem coletar ou emitir luz em vários ângulos facilitando o alinhamento do sistema e ainda reduzindo a perda de luz. A classe de nanoestruturas que tem sido um assunto de interesse recentemente é um arranjo de aberturas menores que o comprimento de onda^{25,34-41} em filmes metálicos opticamente densos, ou seja, o filme é espesso o suficiente para evitar transmissão de luz diretamente através deles. A transmissão extraordinária da luz (maior em intensidade do que previsto pela teoria clássica da difração através de um arranjo de aberturas menores que o comprimento de onda em um filme metálico opticamente denso) tem sido mostrada na literatura.⁴² Esta transmissão extraordinária da luz tem sido atribuída à excitação dos SPs sobre ambos os lados do filme metálico contendo o arranjo de nanoburacos. A Ressonância do Plasmon de Superfície através de nanoestruturas metálicas são dependentes do índice de refração do meio que as rodeia,⁴² e como o efeito da transmissão ressonante ocorre através da excitação e propagação de Plasmons de Superfície na interface metal/isolante, este efeito é sensível a mudanças de índice de refração próximos a superfície do metal.

A periodicidade do arranjo de nanoburacos (distância entre dois centros de buracos localizados lado a lado na escala x e y) age como uma grade de difração bidimensional acoplada que converte os fótons incidentes em SPs. Embora os

mecanismos exatos do efeito de transmissão óptica aumentada através dos tais nanoburacos estejam ainda sendo debatidos, geralmente se aceita a idéia de que os fótons incidentes acoplam com elétrons livres do metal, devido aos buracos periodicamente ordenados, sendo convertidos em SP. Esses são transmitidos através do filme metálico e, via processo reverso (desacoplam), são re-irradiados do lado oposto ao incidente.⁴³

1.2.3. SPR através de grades de difração

A fotoisomerização em filmes de azopolímeros (polímeros com grupamentos azobenzênicos que podem ou não estar quimicamente ligado à cadeia polimérica) tem sido explorada para a obtenção de grades de difração. A fotoisomerização ocorre quando grupos cromóforos azobenzenos são excitados de um estado de baixa energia (forma *trans*) para um estado de maior energia (forma *cis*) devido à absorção de luz. O processo reverso é térmico, mas também pode ser obtido através de excitação por luz.^{44,45} Ciclos de isomerização *trans-cis-trans* podem produzir diferentes espectros de absorção devido a características específicas de cada isômero, como momento de dipolo, índice de refração e volume espacial.⁴⁶ Quando uma luz polarizada é irradiada sobre o filme, a fotoisomerização induz alinhamento dos cromóforos produzindo dicroísmo e birrefringência, que podem ser usados para estocar dados e produzir grades de relevo (SRG - *surface relief gratings*).⁴⁷ As propriedades ópticas das grades de relevo podem ser variadas através das condições do experimento, como fonte utilizada (comprimento de onda e intensidade), ângulo entre os feixes incidentes e tempo de incidência, podendo ser obtidas profundidades de 0,60 até 0,80 μm e periodicidades variando entre 0,27 a 4,60 μm .⁴⁸ Além disso, múltiplas grades podem ser sobrepostas, resultando na

possibilidade de criar os mais complexos arranjos possíveis, com ondas se propagando em diferentes direções sobre o substrato. Na maioria das aplicações de eletrônica e fotônica, os azopolímeros são obtidos pelos métodos *casting* ou *spin coating*. Contudo as técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) e de automontagem por adsorção física (*layer-by-layer* em inglês, LbL) têm sido aplicadas com sucesso, proporcionando maior controle da espessura e arquitetura do filme.^{49,50} O mecanismo para a produção de SRGs é baseado no transporte de massa, sendo originalmente induzido por luz. No entanto, em alguns casos pode ser principalmente resultante de um processo térmico ou de fotodegradação.

Estes substratos podem ser explorados no controle da propagação dos plasmons de superfície em filmes metálicos depositados sobre o filme de azopolímero. Pode-se, com isso, obter um substrato com baixo custo, que atue como guia de ondas eletromagnéticas, resultando no aumento da intensidade dos plasmons de superfície e consequentemente na melhora da resposta de biossensores.⁵¹ A vantagem desta técnica é a possibilidade de se obter grandes áreas superficiais das grades de difração gerando, portanto, uma grande área excitada por SP, viabilizando a produção de dispositivos que atendem os requisitos de produção em larga escala.

1.2.4. Vantagens da técnica SPR

A técnica de SPR oferece várias vantagens quando comparada a outros métodos de detecção: i) Não há necessidade de se trabalhar com moléculas marcadas - este fator é muito importante, já que o processo de rotulação de uma proteína com uma molécula fluorescente ou radioativa pode modificar ou alterar a especificidade e a reatividade da mesma, reduzindo as informações qualitativas

(detectabilidade, especificidade, seletividade, etc.) e quantitativas (parâmetros cinéticos e termodinâmicos). Além disso, a natureza hidrofóbica dos compostos fluorescentes tende a gerar ligações com o sensor o que pode levar a geração de resposta falsa;⁵² ii) Sensores baseados em SPR são capazes de produzir respostas em tempo real, ou seja, as respostas são obtidas ao mesmo tempo em que as reações ou interações estão ocorrendo, proporcionando uma avaliação rápida através do sistema analítico; iii) O mesmo sensor pode ser utilizado para várias medidas, além disso, a análise de várias soluções contendo os analitos-alvo pode ser realizada em série, uma após a outra utilizando o mesmo sensor, através de sistemas de fluxo automático; iv) Os equipamentos necessários para as medidas através de sensores baseados em SPR podem ser miniaturizados e aplicados em detecção de multipontos, ou seja, em um mesmo sensor podem ser fabricadas estruturas que serão utilizadas para detectar diferentes espécies (multiplicidade) - esta propriedade é muito importante para fabricação de sensores portáteis utilizados em medidas *in situ*, possibilitando a detecção no local, seja um hospital, uma indústria ou um lago contaminado; v) Combinando-se as vantagens de especificidade de reconhecimento frente a reações biológicas, podem ser desenvolvidos sensores imunológicos de SPR para a detecção de qualquer analito através de medidas livres de erros, evitando assim complicações em diagnósticos médicos; vi) A aplicação mais significativa de biossensores baseados em SPR é o monitoramento de pequenas moléculas com grande sensibilidade o qual aumenta grandemente a utilidade dos biossensores para a detecção de drogas.⁵²

Em biossensores baseados em SPR o limite de detecção é normalmente definido como a concentração mínima do analito que produz uma resposta correspondente a 3 vezes o desvio padrão da resposta do sensor para a medida do

branco. **Erro! Indicador não definido.**⁵³ O limite de detecção pode ser obtido omente quando os parâmetros de interação entre o analito e o elemento de biorreconhecimento e o transporte de massa para o sensor são conhecidos. Contudo, a menor concentração que pode ser detectada na superfície pode ser determinada independentemente destes fatores. Trabalhos recentes mostram que limites de detecção da ordem de ng/ml podem ser obtidos através de biossensores baseados em SPR.^{6,7,14,54-57} Baixos limites de detecção possibilitam a detecção de concentrações mínimas de marcadores de câncer, tornando possível a detecção precoce da doença.

A sensibilidade de sensores baseados em SPR depende de dois fatores: i) sensibilidade da resposta do sensor a mudanças de índice de refração e ii) eficiência de conversão da ligação química (ou interação) relacionada a mudanças no índice de refração.⁵⁸ Biossensores com alta sensibilidade a mudanças de índice de refração sobre a superfície detectam eficientemente a ligação e a interação de analitos com as moléculas imobilizadas.

1.3. Sensores Baseados em SPR para Detecção de Moléculas Químicas e Biológicas

Sensores baseados em SPR tradicional (configuração de Kretschmann) têm sido empregados em vários campos, incluindo diagnose médica, monitoramento ambiental e análises de alimentos. Devido a variedade de aplicações, vários métodos de detecção têm sido empregados para a análise de espécies químicas e biológicas.^{52,59} Esses sensores SPR medem mudanças no índice de refração que ocorrem na superfície de um filme de metal que suporta um pláriton de plasmon de superfície. Um SP excitado por uma onda de luz se propaga ao longo da interface

filme metálico/isolante e seu campo pode ser usado para “examinar” o ambiente em contato com o filme metálico (amostra). Uma mudança no índice de refração efetivo no meio dielétrico dá origem a uma mudança nas condições de ressonância a qual altera o comprimento de onda da luz que é acoplada com os elétrons da superfície do metal conforme a Equação 1.

$$\Delta\lambda = S \eta_{eff} - \eta_d \quad (\text{Equação 1})$$

Onde S é a sensibilidade da superfície em detectar diferentes índices de refração, sendo definida como a razão entre a variação de comprimento de onda ($\Delta\lambda$) e variação do índice de refração. O η_{eff} é o índice de refração efetivo relativo à adsorção de moléculas sobre a superfície do sensor, alterações no η_{eff} ocorrem na região dos plasmons. O η_d é o índice de refração obtido após a passagem de uma solução que corresponde ao branco. O η_{eff} é obtido através da Equação 2. Essa equação considera o decaimento exponencial da intensidade do campo evanescente conforme há o afastamento da superfície metálica, isto é, a intensidade do campo eletromagnético é grande exatamente na interface metal/dielétrico e se torna mais fraco à medida que ele penetra no meio dielétrico.

$$\eta_{eff} = \frac{2}{I_d} \int_0^{\infty} \eta z \exp \frac{-2z}{I_d} dz \quad (\text{Equação 2})$$

Onde ηz é o índice de refração a uma distância z acima da interface metal/dielétrico e I_d é a constante que indica o comprimento de decaimento do campo eletromagnético do SP.⁶⁰

Essa técnica é utilizada em análises de biomoléculas, como em biossensores SPR de afinidade, que são dispositivos que consistem de um elemento de biorreconhecimento que identifica e está apto à interagir com um analito selecionado

e um transdutor SPR que traduz o evento de ligação em um sinal mensurável. Os elementos de biorreconhecimento são imobilizados nas proximidades da superfície do filme de metal que suporta os SPs. Moléculas de analito em uma amostra líquida em contato com um sensor SPR ligam-se aos elementos de biorreconhecimento, produzindo um incremento no índice de refração na superfície do sensor, o qual é opticamente medido devido a um deslocamento do comprimento de onda da luz transmitida pelo arranjo.

Em biossensores SPR de afinidade bioquímica, uma das moléculas de interação (elemento de biorreconhecimento ou molécula alvo) é imobilizada sobre a superfície do sensor de SPR e a outra está presente em uma amostra líquida. Qual das moléculas estará imobilizada depende do formato de detecção usado na análise. Este é escolhido considerando-se o tamanho do analito, as características de ligação do elemento de biorreconhecimento, a concentração do analito a ser medido e a amostra onde o sistema vai ser utilizado.⁶¹ Os modos de detecção mais comuns são: A) detecção direta, B) detecção em modo sanduíche, C) detecção em modo competitivo e D) detecção por inibição, Figura 2.

No formato de detecção direto, sanduíche e competitiva a molécula que precisa ser imobilizada é um elemento de biorreconhecimento; no formato de detecção por inibição a molécula imobilizada é a molécula alvo ou seu derivado. A escolha do elemento de biorreconhecimento apropriado ou método de imobilização é de importância crítica com impacto direto sobre importantes características de desempenho do sensor tal como sensibilidade, especificidade e limite de detecção.⁶²

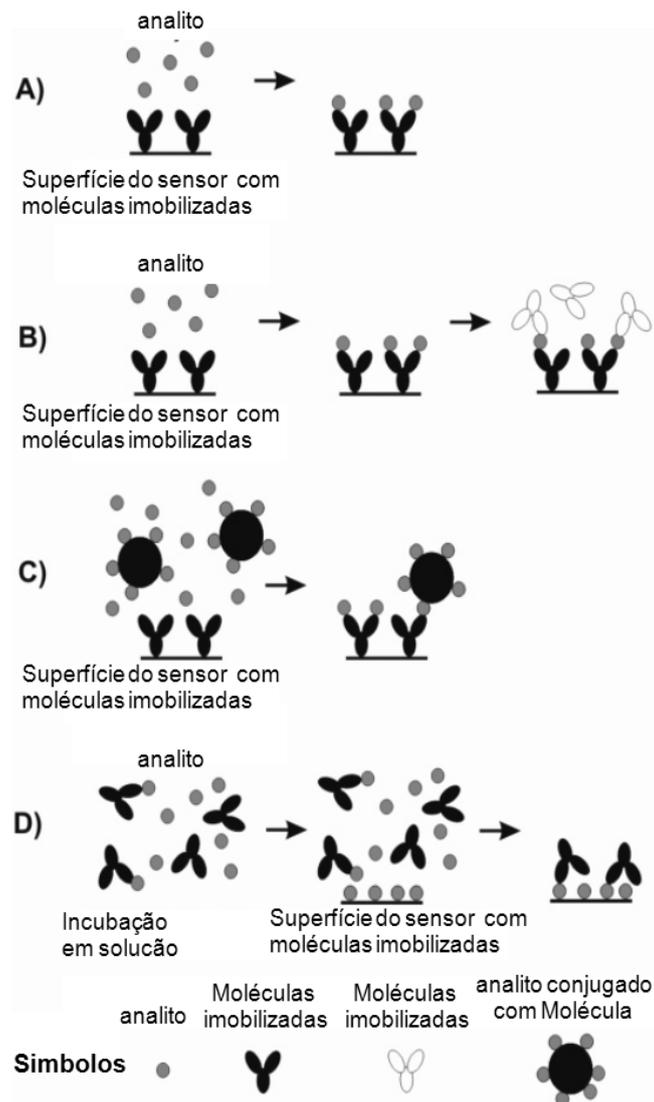


Figura 2. Principais modos de detecção usados em biossensores baseados em SPR: (A) detecção direta; (B) modo de detecção sanduíche; (C) modo competitivo; (D) modo de detecção por inibição.⁶²

No modo de detecção direta (Figura 2A), o elemento de biorreconhecimento (por exemplo, um anticorpo) é imobilizado sobre a superfície do sensor de SPR. O analito em solução se liga ao anticorpo produzindo uma mudança no índice de refração que é detectada pelo sensor baseado em SPR. Este modo de detecção é utilizado quando a ligação entre o analito em solução e o elemento de biorreconhecimento imobilizado na superfície do sensor produz uma resposta que

pode ser facilmente medida. A especificidade e o limite de detecção podem ser melhorados aplicando-se o modo sanduíche (Figura 2B); neste modo de detecção o analito em solução se liga a espécie imobilizada sobre a superfície do sensor (como um anticorpo, por exemplo), sendo então incubado por um segundo anticorpo. Geralmente, analitos pequenos, com massa molar menor que 5000 g/mol, não geram mudanças no índice de refração que sejam grandes o suficiente para serem detectadas através dos modos de detecção direta e sanduíche e, neste caso, os modos de detecção competitivo e de inibição são utilizados. No modo competitivo (Figura 2C) a superfície do sensor é coberta com um anticorpo que está interagindo com o analito; quando um analito conjugado com outra espécie é adicionado à amostra, o analito e o seu conjugado competem pelos sítios ativos sobre a superfície do sensor. A resposta relativa a ligação é inversamente proporcional a concentração do analito. No modo de detecção por inibição (Figura 2D), é utilizado uma solução contendo uma concentração conhecida de anticorpos e uma concentração desconhecida de analito. A solução é injetada em uma cela de fluxo contendo o sensor baseado em SPR, passando pela superfície do sensor onde o analito ou um análogo estão imobilizados. Anticorpos não complexados são analisados na medida que eles se ligam às moléculas de analito imobilizadas sobre a superfície do sensor e a resposta relativa à ligação é proporcional à concentração do analito.⁶³

1.3.1. Aplicações de sensores baseados em SPR para detecção e diagnóstico de câncer

O diagnóstico de câncer é uma das áreas mais pesquisadas em bioquímica analítica. Tem sido investigada uma grande variedade de métodos de detecção de

marcadores⁶⁴, sendo os chamados biossensores (sensores aplicados para detecção de biomoléculas) os mais utilizados.

Marcadores de câncer são substâncias produzidas por células cancerígenas e por outras células do corpo em resposta ao câncer ou tumores benignos (tumores benignos podem crescer muito, mas são localizados, não se espalham para outras partes do corpo). Estas substâncias podem ser encontradas no sangue, na urina, no tecido do tumor ou em outros tecidos. Tipos diferentes de marcadores de câncer são encontrados em diferentes tipos de câncer. Além disso, a concentração do mesmo marcador pode ser alterada em diferentes tipos de câncer. Contudo as concentrações de marcadores não se alteram em todos os pacientes com câncer, principalmente no estágio inicial da doença.

A forma de detecção de marcadores (antígenos) se baseia na sua interação química com anticorpos imobilizados sobre a superfície do sensor. A detecção da ligação é geralmente feita através de vários métodos utilizando-se moléculas marcadas com fluoróforos ou bioconjugados de nanopartículas onde os elétrons estão confinados em uma dimensão (*quantum dots*). A estratégia mais comum é a Análise Enzima Imuno Adsorvida (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Neste sistema a ligação anticorpo-antígeno é indicada por um anticorpo (detector) separado, que acoplado a uma enzima produz um sinal que então é detectado.⁶⁵ Um grande desafio nesta área é desenvolver um método que não precise de moléculas marcadas e que não precise de um anticorpo para detectar a presença do antígeno e que ao mesmo tempo possibilite um alto grau de sensibilidade e com baixo limite de detecção.

Os biossensores baseados em SPR são utilizados para monitorar interações biomoleculares. Através desta técnica, podem ser realizadas medidas em tempo

real para se estudar a ligação entre uma biomolécula (por exemplo, um anticorpo) imobilizada sobre a superfície do metal com um analito bioespecífico presente em solução (por exemplo, um antígeno), sem a necessidade de rotular/marcas as biomoléculas^{6,7,14,54-57} A literatura descreve vários estudos onde biossensores baseados em SPR que utilizam um conjunto de nanoburacos foram eficientemente aplicados na detecção de marcadores de câncer de pâncreas, mama, colo-retal, pulmão e câncer do trato gastrointestinal.⁶⁶⁻⁷¹

Atualmente se encontrou mais de 100 tipos de substâncias que podem ser encontradas em concentrações alteradas no organismo de pacientes portadores de algum tipo câncer. Pesquisadores já encontraram marcadores para todos os tipos de câncer, mas embora a medida de concentrações anormais destas substâncias sugira a presença de câncer, somente esta medida não é suficiente para diagnosticar a doença. Portanto, medidas das concentrações dos marcadores são combinadas com outros testes, como a biópsia, para um diagnóstico indubitável de câncer.⁷²

Considerando as várias formas de câncer e os mais de 100 tipos de marcadores que são encontrados em pacientes com diferentes tipos de câncer, a utilização de um circuito integrado contendo biossensores baseados em SPR com análise de multipontos, acoplado a um sistema microfluídico, possibilitaria que as espécies fossem eficientemente detectadas através de um dispositivo de fácil manuseio.⁴

1.6. Tecnologia de sensores baseados em SPR

1.6.1. Modificação química da superfície do metal transdutor

Em sensores baseados em SPR a superfície do sensor é geralmente ouro ou prata (metal transdutor).⁷³ Nesta superfície ocorrem interações biomoleculares e ligações são convertidas em sinais óptico-elétricos. A superfície do sensor é modificada com moléculas onde os analitos se ligam proporcionando resultados reproduzíveis e consistentes. Para se obter superfícies altamente sensíveis é necessária a formação de uma camada de moléculas receptoras que seja organizada de maneira a proporcionar sítios de ligação sem restrições de impedimento estérico para a molécula que será imobilizada. Diversos métodos de imobilização adequados para testes imunológicos baseados em SPR têm sido publicados. Anticorpos têm sido imobilizados através de suas cadeias glicol oxidadas,⁷⁴ ou através de suas ligações dissulfeto.⁷⁵ Ésteres N-hidroxissuccinimida (NHS) têm sido usados para a obtenção de monocamadas de alcanotióis de cadeia longa, que possuem em uma ponta grupos reativos adequados para a imobilização de biomoléculas e em outra ponta grupos tíóis que se ligam a superfície do ouro.^{76,77} Processos de silanização utilizando 3-aminopropiltriortosilano (3-APTOS) também têm sido usados para ligar anticorpos a superfície de ouro através do ligante glurraldeído.⁷⁸ Contudo, para a ligação de receptores mais específicos, o complexo biotina-streptavidina tem sido amplamente utilizado.⁷⁹

1.6.2. Elementos de biorreconhecimento

Vários tipos de elementos de biorreconhecimento têm sido empregados em biossensores SPR de afinidade. Os anticorpos são os elementos de biorreconhecimento mais frequentemente usados. Eles oferecem alta afinidade e

especificidade frente a analitos alvos. Além disso, anticorpos que reconhecem inúmeras moléculas alvos já estão disponíveis comercialmente. O desenvolvimento de anticorpos de alta qualidade é, contudo, um processo particularmente caro e difícil.⁸⁰ Recentemente, fragmentos de anticorpos de cadeia única têm sido também usado como elementos de biorreconhecimento.⁸¹ Fragmentos de anticorpos de cadeia única biotinilados encontrados em processo de fermentação podem ser identificados sobre a superfície de um sensor recoberto com estreptavidina diretamente da parte sobrenadante sem a necessidade de purificação.⁸² Outro tipo de elemento de biorreconhecimento que tem sido empregado em sensores de SPR são os peptídeos. Em comparação com os anticorpos, os peptídeos, em geral, são mais baratos, mais estáveis e fáceis de manipular. Contudo, os peptídeos às vezes necessitam de uma alta afinidade e especificidade frente ao alvo para que ocorra a ligação. Em biossensores SPR, os peptídeos têm sido aplicados principalmente para detecção de anticorpos, por exemplo, anticorpos da Hepatite G,⁸³ vírus da Herpes simples tipo 1 e tipo 2,⁸⁴ vírus *Epstein-Barr*⁸⁵ e para detecção de metais pesados.⁸⁶ Recentemente, aptâmeros (peptídeos ou ácidos nucleicos que se ligam a alvos específicos) surgiram como outro tipo promissor de elemento biomolecular de reconhecimento para biossensores SPR.^{87,88} Aptâmeros de DNA e RNA são sequências de oligonucleotídeos unicamente-retido, que podem ser produzidos se ligando à alvos moleculares tais como pequenas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos e células planas, tecidos e organismos.⁸⁹ Além disso, a síntese de aptâmeros é fácil e reprodutível.

1.6.3. Imobilização de elementos de biorreconhecimento

Em biossensores SPR, uma das moléculas de interação (na maioria das vezes o elemento de biorreconhecimento) é imobilizada sobre a superfície do sensor. A superfície química deve ser programada de tal forma que ela permita a imobilização de um número suficiente de elementos de biorreconhecimento sobre a superfície do sensor e ao mesmo tempo minimizando as ligações não-específicas na superfície. Além disso, os elementos de biorreconhecimento devem ser imobilizados na superfície do sensor sem que esta imobilização afete a sua atividade biológica. A princípio, as moléculas podem ser imobilizadas diretamente sobre a superfície ou em uma matriz tridimensional. A imobilização direta sobre a superfície é mais simples, contudo o número de elementos de biorreconhecimento que pode se ligar a superfície é limitado pela capacidade da superfície em suportar o elemento (se a densidade de elementos de biorreconhecimento é muito alta, a resposta do sistema pode ser prejudicada pelo impedimento estérico). Por outro lado, um sistema tridimensional geralmente proporciona um maior número de sítios de ligação para a imobilização das moléculas do que a superfície.⁹⁰ O sistema tridimensional mais comumente usado para imobilização de moléculas é obtido através de dextran carbometilado.⁷⁶ Para a imobilização em duas dimensões sobre superfícies de ouro, os métodos mais comuns envolvem o uso de camadas automontadas (SAMs) de alcanotiolatos ou dissulfetos.⁹¹

As proteínas representam a classe de moléculas que são mais comumente usadas como elementos de biorreconhecimento. O método mais utilizado para imobilização de proteínas é via ligação covalente formada entre grupos funcionais nucleofílicos presentes nos aminoácidos das proteínas e grupos eletrofílicos presentes na superfície do sensor.^{56,92} A imobilização através de ligação covalente

é estável, contudo devido a grande quantidade de grupos funcionais presentes nas proteínas, a imobilização através destes grupos leva a uma orientação randômica das proteínas sobre a superfície. Além disso, pode ocorrer imobilização através de vários grupos funcionais restringindo a flexibilidade conformacional da proteína.

Outro método utilizado para a imobilização de proteínas é baseado na afinidade bioquímica das espécies. O exemplo mais comum deste método é a reação avidina/estreptavidina-biotina. Através deste método de imobilização, a proteína avidina (ou a estreptavidina) é imobilizada sobre a superfície do sensor (imobilizada covalentemente ou via biotina pré-imobilizada) proporcionando sítios de ligação para subsequente ligação de proteínas conjugadas com a biotina. A proteína pode ser biotinizada através de vários métodos objetivando a detecção de diferentes grupos funcionais presentes nas proteínas. A orientação das proteínas imobilizadas depende da orientação das moléculas de avidina/estreptavidina, do método de biotinilação empregado e das propriedades da proteína.⁵⁷

A adsorção de proteínas sobre a superfície do sensor é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de biossensores para aplicações biológicas e biomédicas. Vários estudos têm mostrado que os processos de adsorção não específica de proteínas sobre a superfície é um problema chave e que deve ser corrigido para melhorar a interação entre a molécula imobilizada na superfície e o analito presente na solução.^{93,94} A formação de ligações não específicas é um inconveniente ainda maior quando se analisa amostras de sangue e fluidos com partes de células destruídas.⁹⁵ Em biossensores é extremamente importante a obtenção de superfícies com alta organização e que proporcionem um grande número de sítios de ligação para imobilização de elementos de biorreconhecimento (por exemplo, anticorpos). Portanto, é preciso se evitar processos de modificação da

superfície onde as moléculas ficam deitadas sobre o sensor, diminuindo a quantidade de sítios de ligação e afetando as propriedades do sensor.

Vários métodos têm sido aplicados no desenvolvimento de superfícies. Polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG) e seus derivados tem sido empregados no desenvolvimento de superfícies resistentes a proteínas, ou seja, superfícies que não permitem que as moléculas de proteína se liguem com a monocamada e que não se deitem sobre a superfície. Os fatores que influenciam as propriedades de organização geradas por superfícies cobertas com PEG são a barreira estérica e o alto grau de hidratação.⁹⁶ Pasche e cols.^{97,98} utilizaram poli(L-lisina) enxertado em polietileno glicol para minimizar adsorções não específicas de proteínas sobre a superfície. Através deste sistema eles observaram uma adsorção de soro sanguíneo em concentração menor que 2 ng/cm^2 . A imobilização de elementos de biorreconhecimento nestas amostras foi possível através da ligação de biotina com a superfície. As superfícies biotiniladas se mostraram muito resistentes a adsorções não específicas de moléculas presentes na amostra de soro, contudo permitiu a ligação das proteínas de ligação (por exemplo, estreptavidina e avidina) e posteriormente a ligação de elementos de biorreconhecimento biotinilados.⁹⁹⁻¹⁰¹

1.7. Nanofabricação

Nanofabricação é o processo de fabricação de estruturas funcionais com padrões tendo dimensões mínimas da ordem de no máximo algumas poucas centenas de nanômetros. Dispositivos e tecnologia de microeletrônicos tem melhorado e continuará melhorando devido à produção em larga escala e implementação comercial da nanofabricação. Muitos materiais com dimensões

mínimas em nano escala têm propriedades diferentes do que aquelas observadas para materiais macroscópicos.¹⁰² Os avanços no desenvolvimento de dispositivos microeletrônicos e na tecnologia de informação ocorrem em parte, devido aos processos de nanofabricação. A motivação para o estudo nesta área é a necessidade em se aumentar a densidade de componentes em menor espaço possível, diminuindo seu custo, e ao mesmo tempo aumentando a eficiência de cada dispositivo e de um circuito integrado de dispositivos.

Os métodos usados para gerar estruturas em nano escala e materiais nanoestruturados são comumente caracterizados como *top-down* e *bottom-up*. O processo *top-down* usa vários métodos de litografia para fabricar estruturas em nano escala. O processo *bottom-up* usa interações entre moléculas ou partículas coloidais para agregar estruturas em nano escalas discretas em duas ou três dimensões. As técnicas *top-down* incluem fotolitografia e litografia de feixe de varredura (litografia de feixe de elétrons e feixe de íons focados). A litografia de feixe de varredura é um processo lento relativamente à fotolitografia. Esta técnica pode, contudo, gerar características de alta resolução em modelos arbitrários. Há três classes principais de litografia de feixe de varredura: (i) feixes de varredura por laser tendo aproximadamente 250 nm de resolução, são as de menor preço; (ii) feixes de elétrons focados com resolução menor que 50 nm (dependendo do ajuste do equipamento e escolha do fotorresiste) apresentando alto custo de compra e manutenção; e (iii) sistemas de feixe de íons focados (FIB) com resolução menor que 50 nm são principalmente (e extensivamente) usados em pesquisas, e também de alto custo.¹⁰²

1.7.1. Feixe de Íons Focados (FIB)

Um sistema de feixe de íon focado (FIB) é uma ferramenta relativamente nova que tem um alto grau de analogia com um sistema de feixe de elétrons focados tal como um microscópico eletrônico de varredura (MEV). Nestes sistemas (MEV) o feixe de elétrons é direcionado rumo a amostra, e devido a esta interação são gerados sinais que são usados para criar imagens de altas ampliações da amostra. Como o feixe é bem controlado em tamanho e posição e os sinais são fortes o bastante para serem detectados sem ruídos excessivos, estas espécies de equipamentos são muito úteis para analisar amostra em grandes detalhes além de uma ampla faixa de ampliações.¹⁰³

A mais fundamental diferença entre MEV e FIB é o uso de íons (ao invés de elétrons) e este tem grandes conseqüências para as interações que ocorrem na superfície da amostra. No MEV, os elétrons são acelerados e focados sobre a superfície da amostra. O feixe pode varrer a superfície da amostra para criar uma imagem ou pode ser controlado de tal forma a desenhar uma estrutura na amostra como feito em litografia por feixe de elétrons. Estas mesmas funções básicas são encontradas no feixe de íons focados. Como os íons são muito maiores que os elétrons, eles não podem penetrar facilmente dentro da amostra. Conseqüentemente, a interação entre os íons e a amostra leva a ionização atômica e quebra das ligações químicas dos átomos da superfície. Os íons que estão incidindo sobre a amostra não alcançam os elétrons em níveis internos de energia nos átomos, desta forma não há excitação dos elétrons em níveis internos de energia. Portanto, ao contrário de um feixe de elétrons que pode penetrar na nuvem eletrônica de uma molécula alvo, no FIB não há emissão de raios-X quando o feixe de íons incide sobre a amostra. O tamanho do íon também indica que a

probabilidade de interação dos mesmos com os átomos da amostra é grande, levando a rápida perda de energia dos íons. Como resultado, a profundidade de penetração dos íons é muito menor que a profundidade de penetração dos elétrons. Após a perda de energia os íons ficam presos na matriz do material, ao contrário dos elétrons que desaparecem na banda de condução do material.¹⁰³

Além disso, íons são positivos (íons Ga^+), grandes, pesados e lentos enquanto que elétrons são negativos, pequenos, leves e rápidos. A mais importante consequência dessas propriedades listadas é que os feixes de íons removerão átomos do substrato e devido a posição do feixe, a proporção e tempo de residência são tão bem controladas que elas podem ser aplicadas para remover materiais localizados em um modo altamente controlado abaixo da escala nanométrica.¹⁰³

O processo “fresamento” (do inglês *milling*) é a mais poderosa capacidade do FIB e é diretamente relacionada com a escolha do íon, sua faixa de energia e o momento da partícula (seu peso). O fresamento é um processo de colisão atômica e permite a liberdade para manipular a amostra, perfura a sua superfície em três dimensões e criar uma seção-transversal, ou cria algumas possibilidades de formatos sendo como “esculpir em pedra”. Não somente a posição lateral, mas também a profundidade local pode ser controlada. A taxa de fresamento ($\mu\text{m}^3/\text{s}$) é proporcional (linear) à corrente do feixe e altas quantidades de material são removidos com altas correntes de feixe. Adicionalmente, é possível fazer um controle preciso pelo controle de pequenas áreas e correntes baixíssimas. Por exemplo, uma área retangular de $10 \times 5 \times 3 \mu\text{m}$ pode obtida por remoção do material em cerca de 10 minutos. Como a posição do feixe de íon é bem controlada, o fresamento pode ser usado para criar uma estrutura simples tal como um

quadrado ou buraco circular no material, mas também um modelo mais complexo como mostrado na Figura 3.

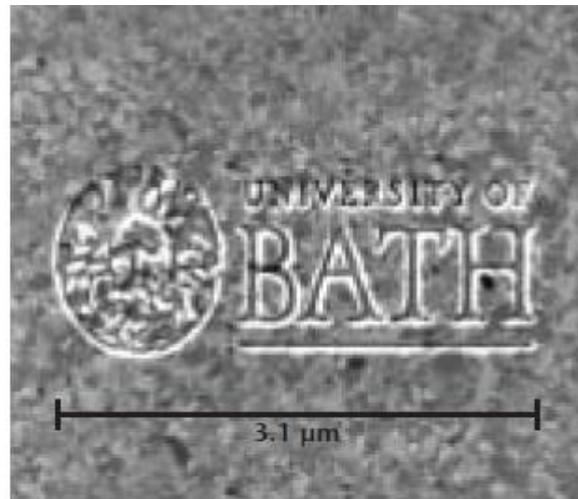


Figura 3. Imagem MEV de uma nanoestrutura obtida pelo uso de um feixe de íons focados. O tempo necessário para a fabricação desta amostra foi de 8 minutos.¹⁰³

Um feixe de íons focado (FIB) pode ser utilizado para fabricar estruturas em um fotorresiste ou diretamente em um substrato.¹⁰⁴ Esta técnica pode modelar (modo fresamento) substratos através da remoção seletiva de material por bombardeamento de íons, ou criar estruturas através de um processo aditivo pela deposição de íons ou uma deposição localizada de vapor químico.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Através desta técnica de litografia pode-se construir estruturas em um semicondutor (ou condutor) com resolução de 20 nm e com minúsculas dimensões laterais abaixo de 5 nm.¹⁰⁸ Devido a essas características o FIB tem sido aplicado na produção de arranjos de nanoburacos em filmes finos de metais nobres, como o ouro.^{43,109,110}

1.7.2. Otimização do arranjo de nanoburacos

Conjuntos de nanoburacos periodicamente ordenados são excelentes candidatos para aplicação em sensores baseados em SPR, uma vez que eles

podem acoplar a luz incidente em plasmons de superfície, tornando desnecessário o uso de primas acoplados usados no sistema convencional de SPR. Trabalhos recentes mostraram a aplicação de biossensores que utilizam conjuntos de nanoburacos para explorar o efeito SPR, sendo observado um deslocamento no espectro de transmissão da luz visível após a imobilização de moléculas sobre ouro utilizando uma fonte de emissão com ampla banda de emissão e um espectrofotômetro.¹¹¹

As propriedades únicas desses buracos estão relacionadas à presença de SPs; eles são por sua vez muito mais dependentes de fatores geométricos do que das propriedades dos metais. Os fatores geométricos que influenciam as propriedades ópticas dos buracos são vários: simetria da estrutura, a relação da posição e forma dos buracos, área da abertura e assim por diante. Essas variáveis determinam a distribuição do campo eletromagnético sobre a superfície, a dinâmica de propagação das ondas de superfície e suas eficiências de espalhamento assim como o acoplamento da luz no plano de entrada e no plano de saída.¹¹² Devido ao alto controle proporcionado pelo FIB durante a fabricação de nanoestruturas, algumas características dos arranjos podem ser manipuladas permitindo uma gama de variações passíveis de controle nos arranjos de nanoburacos.

1) Profundidade dos buracos (ou espessura do filme metálico): Se os filmes são muito finos, eles são transparentes a luz incidente e, portanto, a luz será transmitida mesmo sem a presença de buracos.^{113,114} Para substratos contendo nanoburacos é necessário que o filme metálico seja opticamente opaco, ou seja, a espessura do filme deve ser várias vezes a profundidade óptica do metal (*skin depth*); desta forma a luz não é transmitida através do filme onde não existe

nanoburacos. Normalmente, metais nobres apresentam profundidades ópticas da ordem de 20 nm para luz visível e por isso filmes com espessura de 100 nm são apropriados em sistemas quando a luz incidente tem comprimentos de onda na região do visível. Então, em tais espessuras de filmes, os modos de SP sobre cada lado de um filme de metal pode também interagir através dos buracos dando origem a novos modos de energia. Tal efeito é especialmente visível em arranjos de buracos e desaparecem quando a espessura do filme aumenta e os modos de cada lado são desconectados.^{115,116}

2) Periodicidade do arranjo: os arranjos de nanoburacos agem como filtros ajustáveis onde a energia da luz transmitida (pelo arranjo) pode ser selecionada através do controle da periodicidade dos buracos (distância entre centros de dois buracos localizados lado a lado, nas dimensões x e y). A Figura 4 mostra uma micrografia obtida por MEV e uma imagem de conjuntos de nanoburacos obtidos por FIB. A letra “h_v” mostra nanoburacos periodicamente ordenados, onde a periodicidade foi controlada de maneira a selecionar a energia da luz transmitida, que pode ser facilmente observada pelas cores da luz transmitida pelos arranjos.

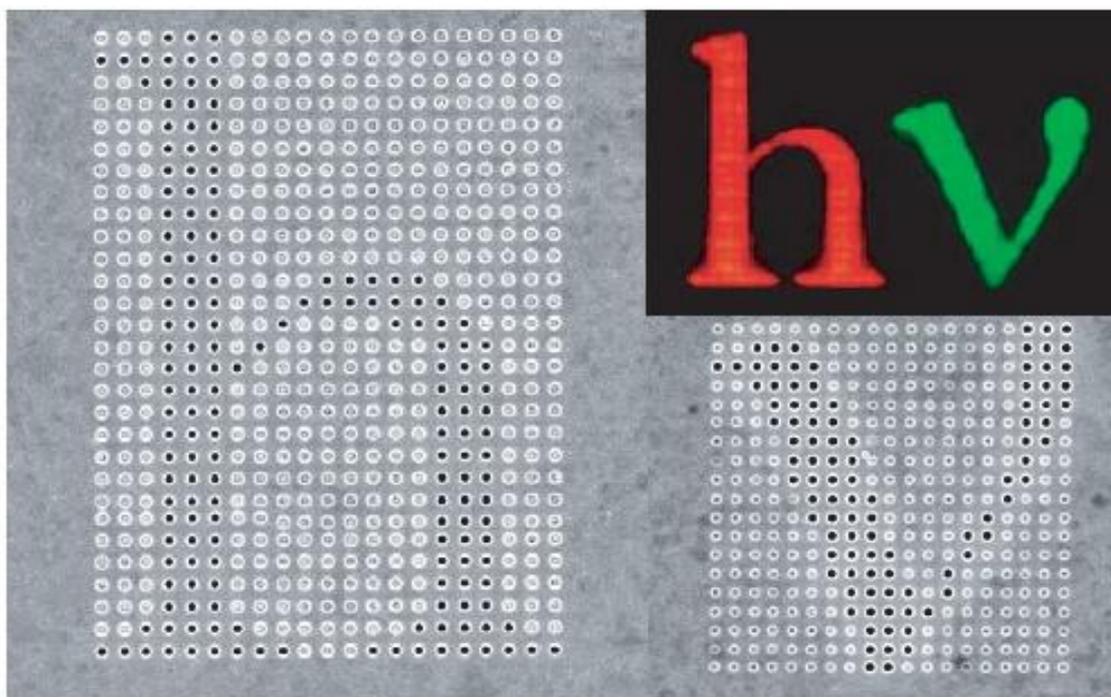


Figura 4. Imagens MEV de dois conjuntos de nanoburacos, gerando as letras 'hv'. Quando esta estrutura é iluminada com luz branca, a cor transmitida é determinada pela periodicidade do arranjo. Neste caso as periodicidades escolhidas foram 550 nm e 450 nm e geraram as cores vermelha e verde, respectivamente.¹¹²

3) Formato dos buracos: uma única abertura circular da Figura 5A tem um espectro de transmissão bem estreito, na forma de uma banda como mostrado na Figura 5B.^{117,118} Medidas similares podem ser feitas através de um buraco retangular (Figura 5C) quando o espectro torna-se sensível a polarização da luz incidente como pode ser visto em Figura 5D. O aparecimento de tais picos ressonantes pode ser entendido como a excitação das formas de SP nas bordas do buraco, um tipo conhecido como SP localizado que tem sido confirmado por estudos teóricos. Ajustando a polarização da luz incidente sobre o eixo menor ou maior do buraco retangular, pode-se selecionar a excitação do correspondente SP localizado. Trocar toda a frase por essa: Ajustando a polarização da luz

incidente sobre o eixo menor ou maior do buraco retangular pode-se selecionar a excitação do correspondente SP localizado, já que as formas de SP localizados são definidas pelas dimensões laterais da abertura (ou seja, os eixos maior e menor do buraco retangular).¹¹⁹

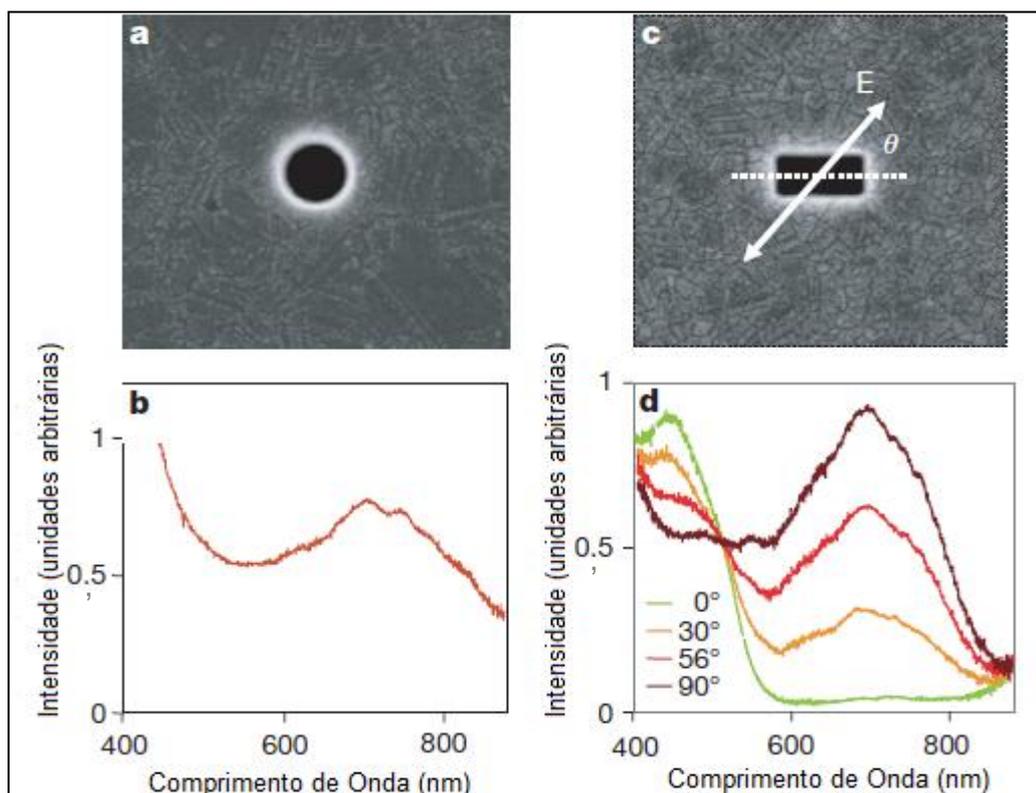


Figura 5. Nanoburacos fabricados em filmes espessos de prata e iluminados com luz branca. (A) abertura circular e (B) espectro de transmissão através do buraco com diâmetro 270 nm em um filme de 200 nm de espessura. (C) abertura retangular e (D) espectro de transmissão em função do ângulo de polarização θ para os seguintes parâmetros geométricos: 210 nm X 310 nm, espessura do filme 700 nm.¹²⁰

- 4) **Diâmetro dos buracos:** A interação da luz com filmes metálicos contendo arranjos de buracos com diâmetros menores que o comprimento de onda da radiação incidente foi estudado no trabalho de Canpean e Astilean.¹²¹ Eles

mostraram o espectro de transmissão de um filme liso de ouro e filme de ouro contendo um arranjo de nanoburacos buracos com diâmetros de 180 e 280 nm. De acordo com o estudo a resposta óptica das nanoestruturas é identificada por características bem definidas do espectro, com a posição espectral dos picos altamente dependente do tamanho dos buracos. espectro de transmissão do filme de ouro liso de 40 nm de espessura exibe um pico em cerca de 500 nm (atribuído a luz transmitida pelo filme de ouro). O espectro de transmissão do filme contendo os buracos de diâmetro 280 nm exibe um máximo de transmissão em 564 nm com intensidade de transmissão de 36%, enquanto que no filme com buracos com 180 nm de diâmetro o máximo de transmissão observado foi em 553 nm e a intensidade de transmissão foi de 33% como mostrado na Figura 6.

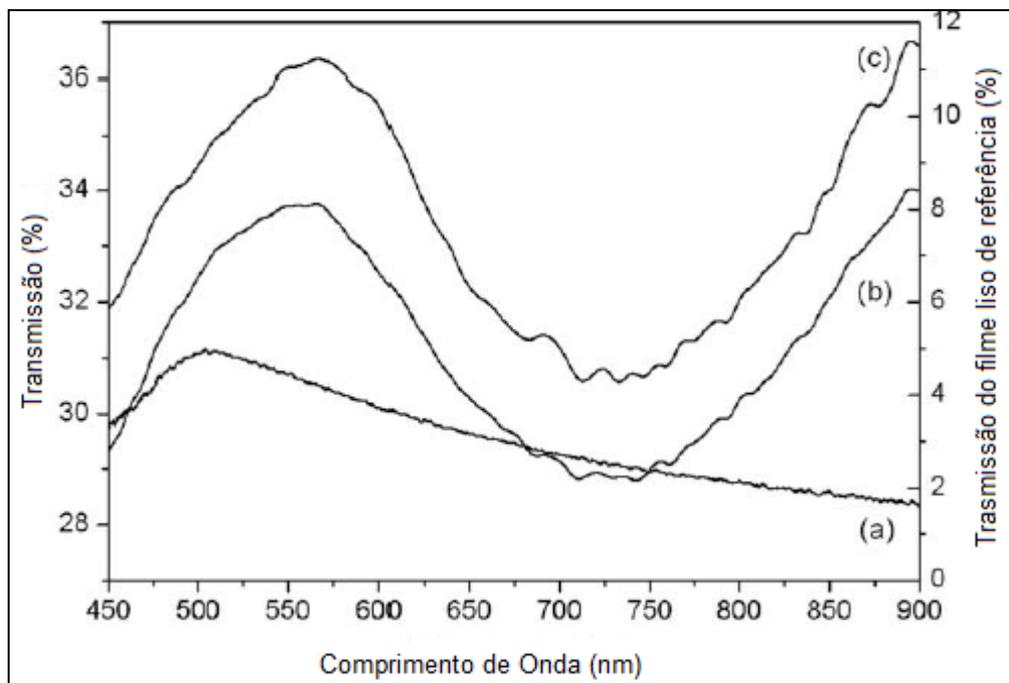


Figura 6. Espectro de transmissão normal de luz branca através do filme de ouro de 40 nm de espessura (A) liso e através do filme contendo um arranjos de buracos de (B) 180 nm e (C) 280 nm de diâmetro.¹²¹

1.7.3. Interferência de laser

A técnica de interferência de laser empregada na produção de SRGs se baseia na fotoisomerização de grupos azobenzenos presentes em grupos laterais de polímeros tais como (poly(4'-[2-(acriloiloxi)etil-amino]-4-nitrozobenzeno) (pDR1A)), cuja estrutura é apresentada na Figura 7.

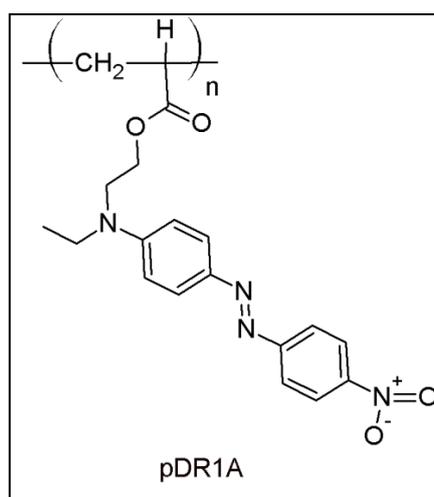


Figura 7. Estrutura molecular do azo polímero pDR1A.

Em um comprimento de onda específico é possível induzir uma mudança geométrica reversível em polímeros como o pDR1A, isto é, o polímero se rearranja da posição trans (mais estável) pra cis (menos estável) e vice-versa.¹²² Se um filme polimérico é irradiado por luz em comprimento de onda na qual o polímero com grupo “azo” absorve, a fotoisomerização ocorre e isso promove uma alteração de volume (devido a uma mudança no volume molecular dos isômeros) no local onde a luz é incidida, produzindo então um perfil na superfície, diferente dos locais que não são irradiados pela luz (que não sofrem alteração do volume). Assim, a partir de um arranjo experimental como descrito na Figura 8, é possível produzir um perfil de interferência em um feixe de laser no qual apenas algumas regiões de um filme polimérico sofrem irradiação de luz. Isso permite desenhar/imprimir grades estáveis

na superfície do filme polimérico. O espaçamento entre as grades (periodicidade), assim como outras propriedades podem ser facilmente controladas.¹²³

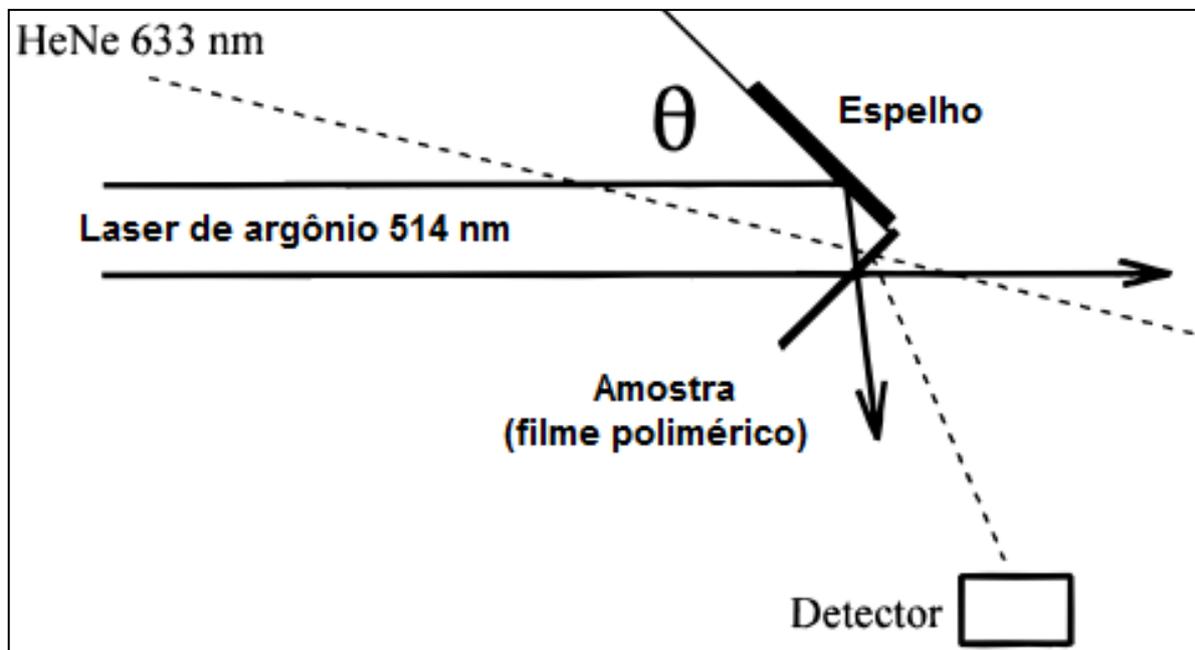


Figura 8. Arranjo experimental utilizado para produzir um feixe de luz com perfil de interferência ajustável que proporciona a formação de grades a partir da fotoisomerização do grupo azobenzeno presentes em um polímero.¹²²

O feixe de inscrição (ou impressão) é composto de um laser de argônio emitindo em 514 nm (comprimento de onda de absorção de um filme polimérico de pDR1A) com potência baixa para não destruir o polímero. O feixe de argônio tem uma porção direcionada para incidir diretamente na amostra e outra parte para incidir no espelho que se encontra em uma distância angular específica do porta-amostra. A porção do feixe que colide com o espelho é refletida na direção da amostra e interage com o feixe direcionado diretamente à amostra promovendo a formação de um padrão de interferência que então incide na superfície da amostra. O ângulo de incidência (θ) do feixe pode ser ajustado com o intuito de mudar o perfil de interferência e, portanto, as propriedades das grades geradas na superfície do

filme polimérico. O comprimento de onda do laser de inscrição também tem influência sobre a periodicidade das grades produzidas.¹²³ A evolução de produção das grades é monitorada por um laser de HeNe emitindo em 633 nm (comprimento de onda que não é absorvida pelo filme polimérico) colocado quase paralelo ao feixe de inscrição. Isso é feito com base na mudança de índice de refração causada pela fotoisomerização sofrida pelo filme polimérico que altera o ângulo de refração da luz que atravessa o filme. A superfície em forma de grades nanométricas produzidas por essa técnica é então coberta por um filme metálico e pode então ser usadas para a geração de plasmons.

1.7.4. Otimização das grades de relevo

As propriedades dos SPs em grades de relevo também são dependentes de fatores geométricos e das propriedades dos metais. Um fator que comprovadamente influencia as condições de ressonância é a periodicidade das grades. Trabalhos reportados na literatura mostram que para grades sendo utilizadas no modo reflexão e varredura angular em comprimento de onda fixo, tem o ângulo de refletância da luz fortemente dependente da periodicidade das grades em situação de excitação de SPs.¹²⁴ Na Figura 9 é apresentado essa dependência, sendo as grades de diferentes periodicidades imersas em dois diferentes índices de refração.

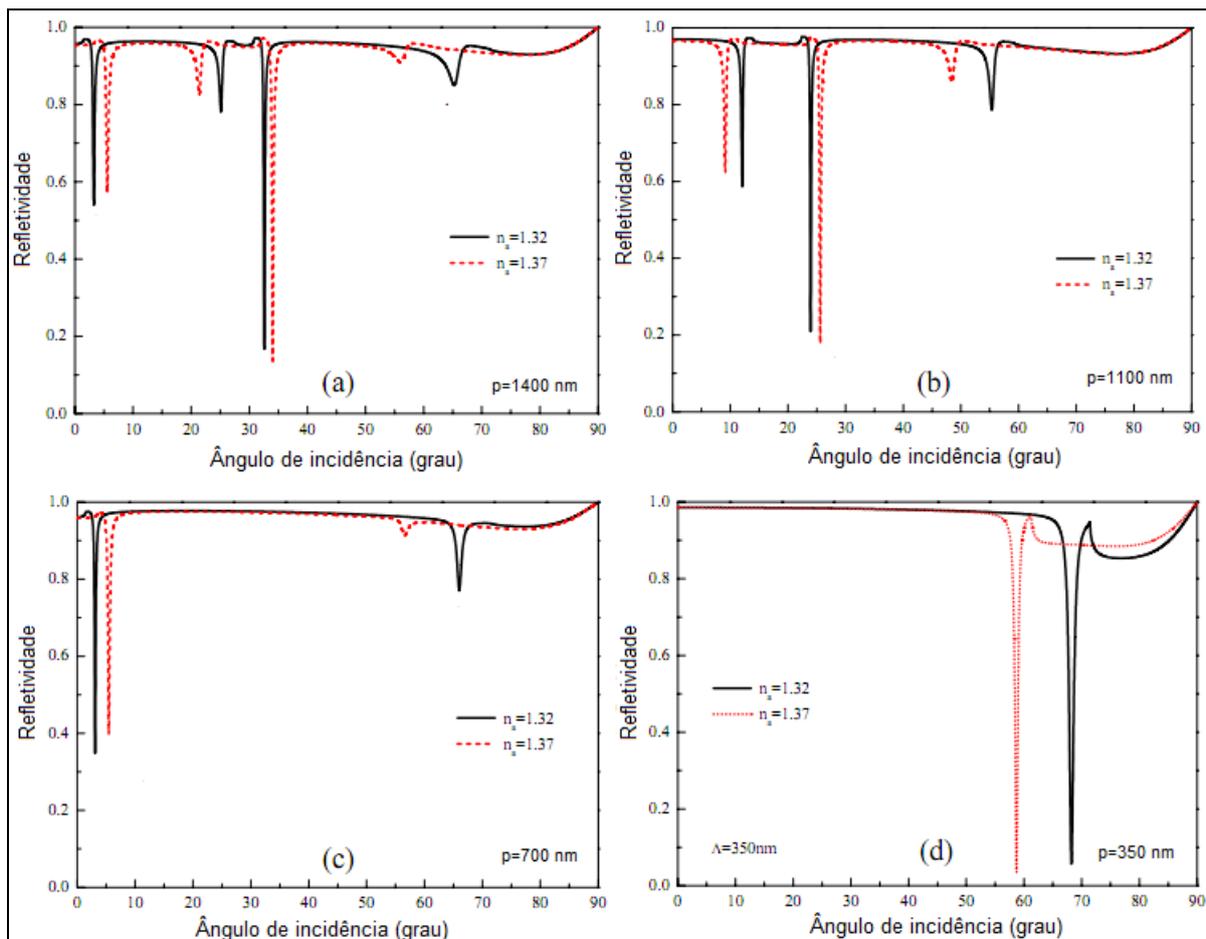


Figura 9. Refletividade de luz (em comprimento de onda fixo) incidindo sobre grades com quatro diferentes periodicidades ($p=350, 700, 1100$ e 1400 nm) imersas em dois diferentes índices de refração ($n_a=1,32$ e $1,37$).¹²⁴

Devido ao controle da periodicidade proporcionado pela técnica de interferência de lasers na fabricação das grades é possível obter estudos de variações do espaçamento das grades também utilizando o modo de transmissão de luz.

1.8. Sistema de microfluido

A microfluídica é uma tecnologia emergente e relativamente nova que requer uma aproximação multidisciplinar envolvendo a interface da física, química, engenharia e bioquímica. Dispositivos microfluídicos geralmente consistem de

estruturas fabricadas em escala micrométrica e podem ser projetados para integrar sistemas como em sensores. Sistemas baseados em operação de microfluidos possuem vantagens como a redução em custo de reagentes devido a pequena quantidade de amostra usada, aumento da velocidade da análise, e apresenta potencial para produção em massa de dispositivos de baixo custo. Outros benefícios de sistemas baseados em microfluidos incluem separações biológicas, onde é obtido um alto rendimento através de processamento paralelo de múltiplas amostras realizadas em múltiplos caminhos fluidicos.

Os dispositivos de microfluidos podem ser fabricados de uma variedade de materiais e técnicas. A tecnologia de fabricação em polidimetilsiloxano (PDMS), algumas vezes chamadas de *soft lithography*, foi desenvolvida por Whitesides e cols. e tem sido amplamente adotada para a fabricação de diferentes redes de microfluidos.¹²⁵⁻¹²⁹ Um biossensor SPR, baseado em arranjos de nanoburacos, também pode incorporar um sistema microfluidico como mostrado esquematicamente na Figura 10.

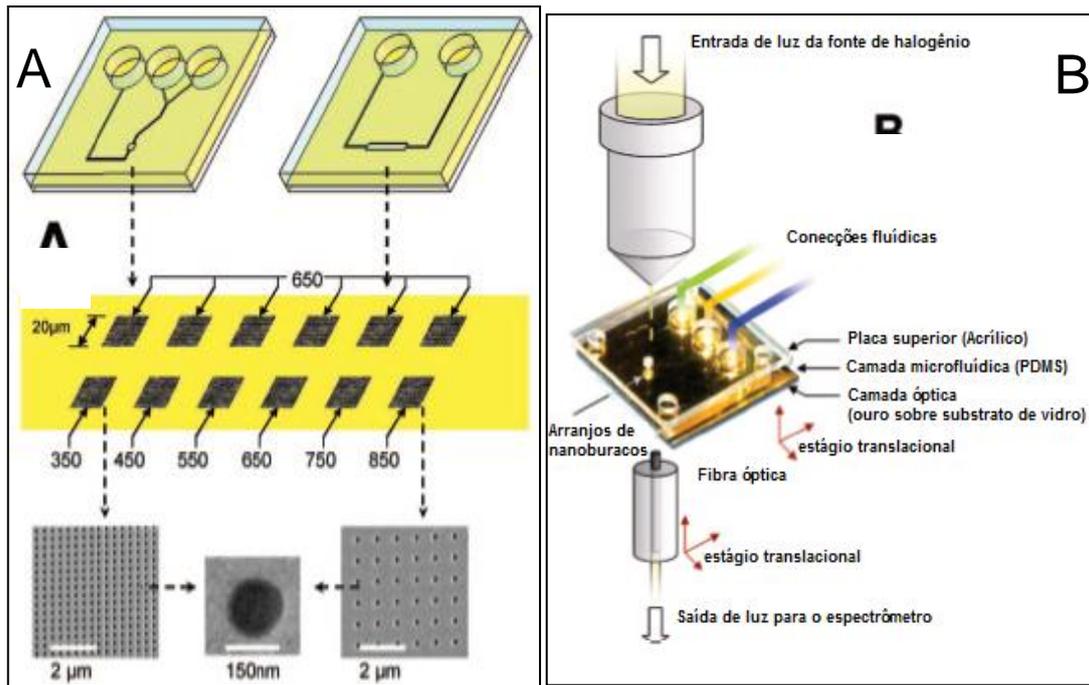


Figura 10. (A) esquema e imagens de microscopia eletrônica de varredura ilustrando a arquitetura do *chip* de microfluido com arranjo de nanoburacos embutido e em (B) estrutura experimental usada para medir o efeito da transmissão óptica extraordinária (EOT). O filme metálico (depositado sobre um substrato de vidro) contendo arranjos de nanoburacos obtidos por FIB é exposto a solventes distribuídos utilizando o sistema de microfluídos.¹¹¹

2. Objetivos

- Estudar o efeito da periodicidade nos espectros de transmissão dos substratos baseados em arranjos de nanoburacos e grades de relevo;
- Estudar a sensibilidade das amostras, baseados em arranjo de nanoburacos e grades de relevo, frente a soluções com diferentes índices de refração;
- Estudar a influência da periodicidade dos arranjos de nanoburacos na sensibilidade do substrato;
- Produzir um sistema microfluídico para acoplar com arranjos de nanoburacos;
- Imobilizar estreptavidina via esquema cisteamina/biotina, sobre os arranjos de nanoburacos e estudar sua biossensibilidade;
- Imobilizar albumina do soro bovino (BSA, *bovine serum albumin*), através de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) ativado com grupos N-hidroxisuccinimida (NHS), sobre as grades de relevo e estudar sua biossensibilidade;
- Imobilizar sobre substratos contendo arranjo de nanoburacos, previamente modificado com o sistema cisteamina/biotina/estreptavidina, os anticorpos (anti-HER2) e o antígeno (HER2 ou mais comumente conhecida como p185), biomarcador do câncer de mama;
- Aplicar o sistema microfluídico para promover análises em tempo real da interação anticorpo-antígeno no modo de detecção sanduíche;

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

- Lâminas de vidros 2,5 x 2,5 x 0,1 cm cobertas com filmes de ouro de 100 nm de espessura (sendo usado como adesivo um filme de cromo de 5 nm de espessura), contendo arranjos nanoburacos de diferentes periodicidades
- Lâminas de vidros 2,5 x 2,5 x 0,1 cm cobertas com uma camada de pDR1A formando grades de relevo de diferentes periodicidades. A camada de azopolímero é ainda coberta com filme de ouro de 100 nm de espessura.
- Solução tampão de Fosfato (PBS), formada de NaCl 0,1370 mol/L (Sigma, 99,5%); KCl $2,804 \times 10^{-03}$ mol/L (Sigma-Aldrich, 99,0%); Na_2HPO_4 $8,101 \times 10^{-03}$ mol/L (Sigma-Aldrich, 99%); KH_2PO_4 $1,497 \times 10^{-03}$ mol/L (Sigma, 98%).
- Polidimetilsiloxano elastômero (PDMS) e agente de cura (Sylgard[®] 184).
- Fotorresiste, SU-8[®] 50 (Microchem).
- Revelador de SU-8[®] (Microchem).
- Glicose (Sigma, 99,5%).
- Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, 99,9%).
- N-hidroxisuccinimida (Aldrich, 97%).
- N-etil-N-(3-dietilaminopropil) carbodiimida (EDC, Fluka, 99%).

Preparação das monocamadas automontadas (SAMs)

- Cisteamina (Aldrich, 95%).
- Ácido 11-mercaptoundecanóico (Aldrich, 95%).

Ligante

- Biotina N-hidroxisuccinamida éster (Biotina-NHS, Sigma, 98%).

Proteínas

- Estreptavidina, (Sigma, 65%).
- Albumina de soro bovino (Sigma, 96%).

Antígenos e anticorpos

- Antígeno biomarcador do câncer de mama HER-2 (Invitrogen, 70%)
- Anticorpo biotilado biomarcador do câncer de mama HER-2 (Invitrogen, 95%)
- Anticorpo secundário biomarcador do câncer de mama HER-2 (Invitrogen, 75 mg.mL⁻¹)

3.2. Métodos

3.2.1. Substrato contendo nanoburacos

Os arranjos de nanoburacos foram fabricados por feixe de íons focados (*Focused Ion Beam*, FIB) com um equipamento FEI 235 *dual-beam*, utilizando uma fonte de íons Gálio, e doados pela professora. Karen Kavanagh (*Simon Fraser University*, Victoria, Canadá). O diâmetro de cada nanoburaco foi de 200 nm e as periodicidades foram de 365 a 555 nm. Os substratos recebidos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Shimadzu Superscan SSX-550).

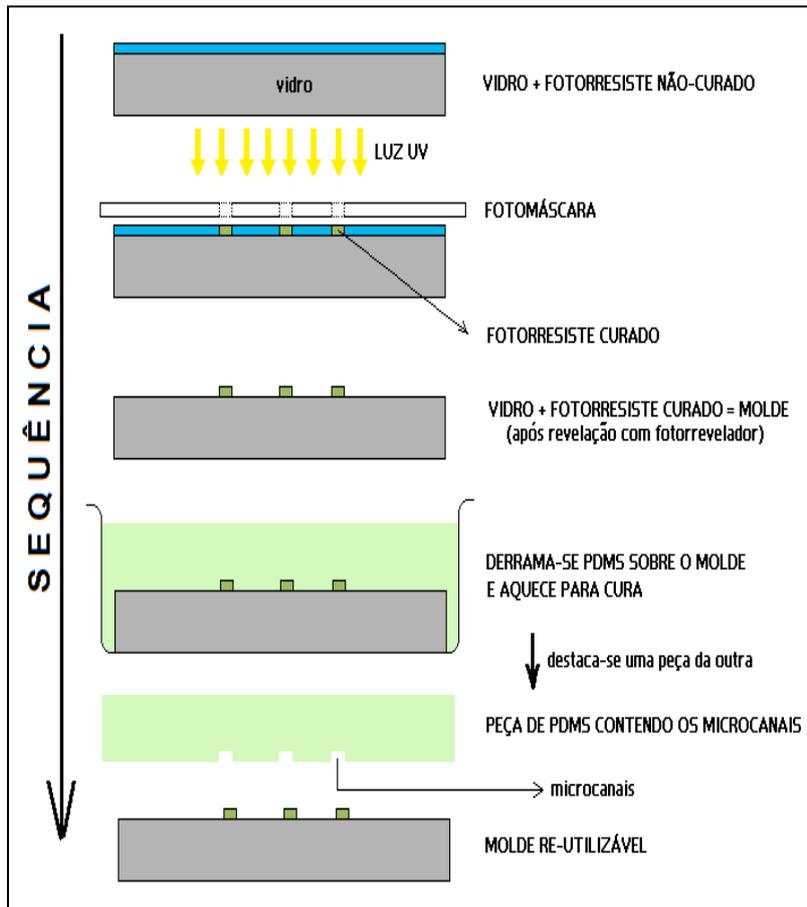
3.2.2. Grades de relevo

Os filmes do azopolímero pDR1A foram depositados sobre lâminas de vidro por *spinning*. A grade de relevo foi obtida através de um padrão de interferência de dois lasers de argônio com potência de 80 mW/cm². Um filme fino de ouro foi depositado sobre as grades, para possibilitar a geração dos plasmons de superfície. As grades de relevo foram fabricadas e doadas pelo Prof. Paul Rochon (*Royal Military College of Canada*, Ontario, Canadá).

3.2.3. Cella de microflúido

Como substratos foram utilizadas placas de vidro comum (2,5 x 2,5 cm e 1,0mm de espessura), que foram limpas com acetona e solução piranha H₂SO₄/H₂O₂ (1:3) de modo a remover todos os resíduos orgânicos e para promover uma melhor aderência do fotorresiste com o substrato. O recobrimento dos substratos com o material fotossensível (fotorresiste) foi feito usando um *spin coater* (Spincoating Systems, G3P-8). Para a fotogração, uma fotomáscara desenhada através de um *software* apropriado e impressa em uma folha de politereftalato de

etileno (PET) foi alinhada com o substrato contendo o fotorresiste e o conjunto foi levado para o sistema de exposição à luz UV com auxílio de uma fotocolidadora (Tamarack Scientific, 2110CP). Para a revelação, mergulhou-se o substrato de vidro contendo o fotorresiste fotogravado em uma solução do Revelador SU-8[®] (solução a base de lactato de etila) com agitação magnética a temperatura ambiente, obtendo-se assim a peça-mestre para confecção dos microcanais em uma peça de PDMS. Uma solução de PDMS foi então dispensada sobre o molde e o sistema foi levado para cura sobre chapas de aquecimento. Após a termo-cura do PDMS, a peça já no estado sólido e flexível, foi removida do molde criando-se assim o sistema de microcanais. A peça de PDMS criada de acordo com este procedimento apresentou espessura de aproximadamente 4,0 mm e microcanais com largura de aproximadamente 70 μm e espaçamento da ordem de 350 μm . Todo esquema de obtenção da peça de microfluidos está ilustrada na Figura 11.



Passo 1: exposição do fotorresiste (SU-8) usando luz UV que passa através de uma transparência na fotomáscara, com o desenho desejado

Passo 2: o fotorresiste não exposto é dissolvido com, revelador apropriado, levando a um modelo positivo do desenho em um substrato.

Passo 3: sobre o modelo positivo é colocado o polímero PDMS e levado para cura através de aquecimento.

Passo 4: a remoção do molde leva a estrutura negativa, onde os canais estão presentes no PDMS.

Figura 11. Esquema e descrição do método de obtenção dos microcanais por litografia *soft*.

O fluxo de solução pelos canais foi executado por uma bomba de seringa (Harvard Apparatus, 11 Plus). A peça de PDMS contendo os microcanais, bem como o seu alinhamento sobre o substrato de ouro e o sistema final de microfluidos obtido está mostrado nas Figuras 12A, 12B e 12C, respectivamente.

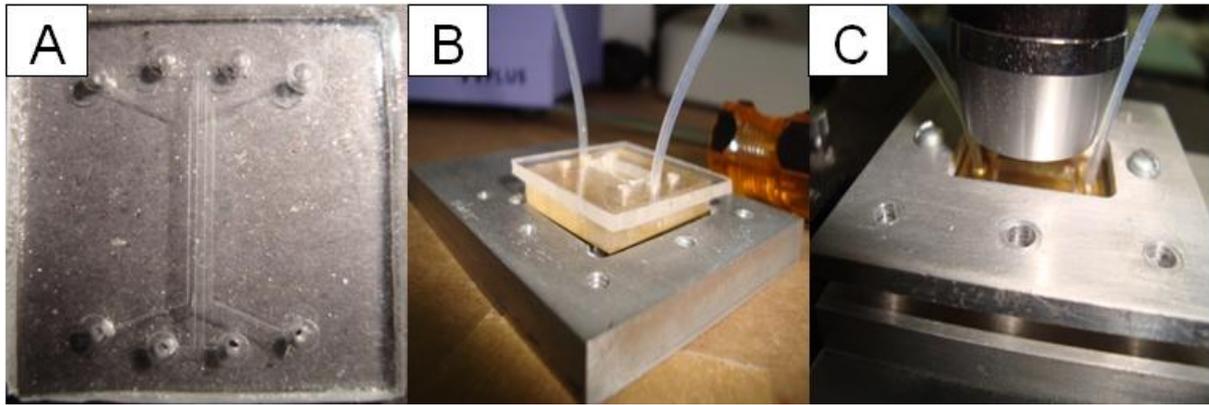


Figura 12. (A) Peça de PDMS contendo os microcanais. (B) microcanais alinhados com o substrato contendo arranjos de nanoburacos. (C) Montagem final do sistema utilizando microfluidos integrado com substrato contendo arranjo de nanoburacos.

3.2.4. Caracterização da sensibilidade do arranjo de nanoburacos e das grades de relevo frente a diferentes soluções de glicose

A caracterização da sensibilidade é feita com o objetivo de verificar se o substrato é sensível a mudanças de índice de refração sobre o metal, onde se encontram os SPs. Isso permitirá dizer se o substrato poderá ser usado para aplicação em biossensores, uma vez que uma elevada sensibilidade a mudanças de índice de refração próximo a superfície é requerida para detecção de biomoléculas. Além disso, esse parâmetro quantitativo permite efetuar comparações com outros substratos de mesma natureza.

Para as medidas de mudança do índice de refração foi acoplada ao sistema uma lâmpada de halogênio com ampla banda de emissão. A luz, direcionada através de uma fibra óptica, foi incidida perpendicularmente (normal) à superfície da amostra que continha o arranjo de nanoburacos, focalizando um arranjo por vez. Para isso utilizou-se uma lente objetiva de 50x acoplada a um microscópio (Meiji Techno, WD 7,5 mm) e uma lente com 10x de magnificação, para as grades de

relevo. A luz transmitida foi coletada pelo cabo de fibra óptica (Ocean Optics, P600-2-UV-Vis) posicionado debaixo do arranjo de nanoburacos ou das grades de relevo. Este cabo ainda encontra-se acoplado a um espectrofotômetro UV-vis (Ocean Optics, USB2000) e assim, espectros de transmissão foram registrados e armazenados em um computador. Foram registrados espectros após a passagem, sobre o sensor (Figura 13), de diferentes soluções de glicose com índices de refração conhecidos. Os índices de refração das soluções foram medidos em refratômetro portátil digital (Atago, 3850 PAL-RI). Para fluir as soluções sobre os substratos foi utilizada uma célula de fluxo construída em teflon acoplada a uma bomba peristáltica (Milan, 202).

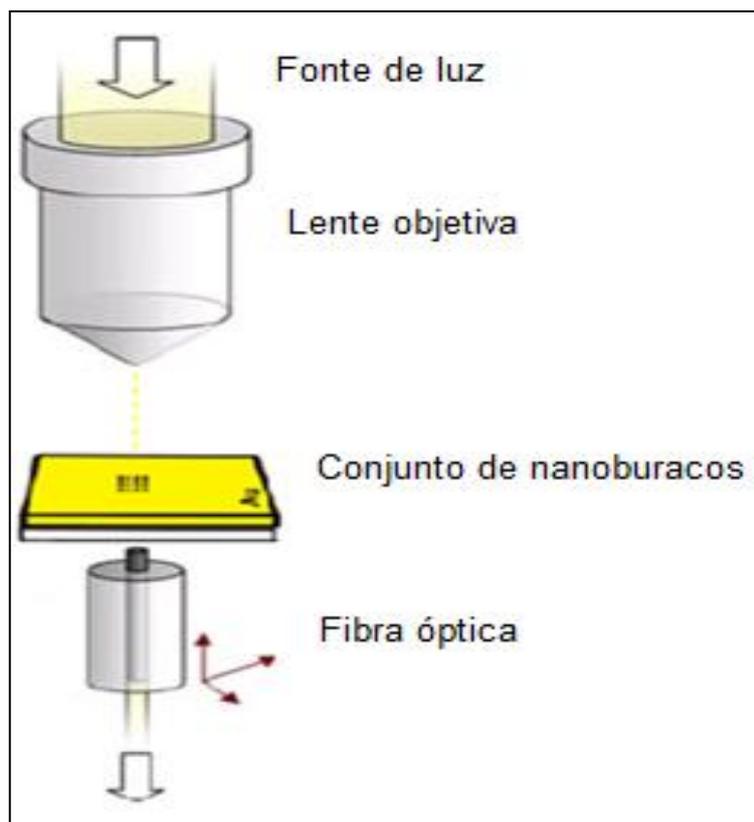


Figura 13. Esquema utilizado para medidas de sensibilidade dos arranjos de nanoburacos frente às soluções de glicose de diferentes índices de refração.

Para as grades de relevo foi utilizado um polarizador entre a amostra e a fibra óptica de modo que fossem coletados espectros de transmissão com luz s-polarizada. Uma luz s-polarizada tem o vetor campo elétrico direcionado perpendicularmente ao plano de incidência da luz (s vem da palavra alemã *senkrecht*, que significa perpendicular). Por outro lado a luz p-polarizada tem o vetor campo elétrico paralelo ao plano de incidência (p vem da palavra inglesa *parallel*, que significa paralelo). Para uma grade sem defeitos e com incidência normal espera-se ter o fenômeno SPR apenas com luz s-polarizada, uma vez que nesse estado de polarização percebe-se uma diminuição da intensidade da luz transmitida em relação à luz p-polarizada ou não-polarizada. Isso ocorre pois parte da luz acopla com os elétrons “livres” da superfície (origem dos SPs) e, em razão disso, a luz é absorvida (por acoplamento com os elétrons) na superfície do substrato plasmônico resultando em menor intensidade das bandas de transmissão quando a luz está s-polarizada. O arranjo experimental resultante é muito semelhante ao utilizado para os arranjos de nanoburacos e está representado na Figura 14.

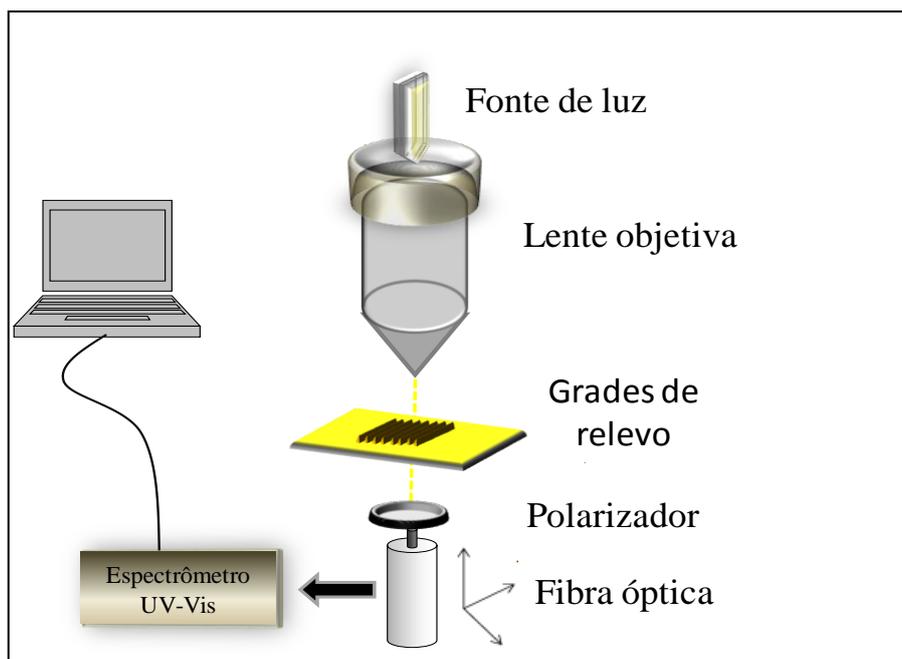


Figura 14. Esquema utilizado para medidas de sensibilidade das grades de relevo, frente às soluções de glicose de diferentes índices de refração.

3.2.5. Preparação da superfície do ouro com alcanotióis

A superfície do ouro foi modificada com cisteamina e ácido 11-mercaptoundecanóico segundo a metodologia abaixo:

- *Cisteamina*: a amostra contendo o conjunto de buracos foi imersa em metanol e limpa em banho ultra-sônico por 5 minutos. A amostra foi então imersa na solução aquosa de cisteamina $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ por 72 horas para que ocorra a organização da monocamada. A amostra foi retirada da solução e lavada com etanol e água destilada para remover as moléculas não adsorvidas. Após isso o espectro de transmissão foi registrado em PBS utilizando a célula de fluxo para a passagem do tampão sobre a amostra.

- *Ácido 11-mercaptoundecanóico*: a amostra contendo as grades de relevo foi imersa em metanol e limpa em banho ultra-sônico por 5 minutos. A amostra foi então imersa na solução 5 mmol/L de MUA, em etanol, por 24 horas para que ocorresse a formação da monocamada. Em seguida a amostra foi retirada da solução e lavada com etanol e água destilada para remover moléculas não imobilizadas.

3.2.6. Preparação da camada ligante (*linker*) para imobilização de proteínas

A superfície do substrato preparada com cisteamina apresenta grupos amina orientados na superfície do metal. Esses grupos interagem covalentemente com os grupos éster de succinamida da biotina-NHS, permitindo que ela seja imobilizada na superfície. A biotina serve como *linker* para a imobilização da estreptavidina (proteína) via ligação bioespecífica.

- *Biotinilação da superfície*: Inicialmente preparou-se uma solução contendo 12 mg de biotina (biotina-NHS) em 2,0 mL de DMSO. O substrato de ouro contendo a monocamada de cisteamina foi então usado na montagem da cela de microfluido. Em seguida a solução de biotina foi passada pelos microcanais utilizando uma bomba de seringa, por 45 minutos a uma velocidade de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Em seguida o sistema foi lavado com PBS (velocidade de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$) e o espectro de transmissão foi registrado com canais preenchidos com o tampão. O sistema foi lavado com fluxo maior para que as moléculas não adsorvidas fossem retiradas com mais facilidade.

3.2.7. Imobilização de proteínas

Os seguintes procedimentos experimentais foram utilizados para imobilização de proteínas na superfície dos substratos:

- *Imobilização de estreptavidina:* Inicialmente foi preparada uma solução contendo 1,0 mg de estreptavidina em 4 mL de PBS. O substrato contendo o sistema cisteamina/biotina foi então usado na montagem da cela de microfluido. Então, a solução de estreptavidina foi passada pelos microcanais utilizando uma bomba de seringa, por 15 minutos a uma velocidade de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Posteriormente o sistema foi lavado com PBS (velocidade de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$) e o espectro de transmissão foi registrado.
- *Imobilização de BSA:* O substrato preparado com MUA foi mergulhado em solução 1:1 de NHS/EDC 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por 3 horas e em seguida enxaguado abundantemente com água, seco com sopro de N_2 e levado para registro do espectro de transmissão, em ar. O substrato contendo o sistema MUA/NHS/EDC foi então usado na montagem da cela de fluxo. Então uma solução 6,67 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BSA em água foi passada pela amostra utilizando uma bomba peristáltica, por 95 minutos. Então a célula foi lavada com água, desmontada, e o substrato foi seco com sopro de N_2 para registro do espectro de transmissão em ar.

3.2.8. Imobilização de anticorpo biotilado e detecção de antígeno p185

Um novo substrato contendo um arranjo de nanoburacos (periodicidade de 400 nm, diâmetro do buraco de 200 nm) teve sua sensibilidade caracterizada usando soluções de glicose de diferentes índices de refração (conforme

procedimento já descrito). Teve a superfície do ouro modificada com a monocamada de cisteamina, imobilização da camada de biotina, e finalmente da imobilização de estreptavidina de forma que se tornou apta para a imobilização do anticorpo biotilado. Isto porque este tipo de anticorpo é conjugado com a molécula de biotina e, por isso, também pode ser imobilizado via ligação específica da parte biotilada à estreptavidina previamente imobilizada. Então, a estratégia para detecção do antígeno p185 foi utilizar o modo de detecção sanduíche (Olhar Figura 2A). Para isso imobilizou-se o anti-HER-2 biotilado (anticorpo que reage especificamente com o antígeno HER-2) na superfície do ouro via interação específica com a estreptavidina previamente imobilizada. Uma solução de 50 $\mu\text{L/mL}$ em PBS, de anti-HER-2 biotilado foi preparada e passada, utilizando o sistema microfluídico, sobre o sensor em uma velocidade lenta de 10 $\mu\text{L/min}$ para que não houvesse muita turbulência e a interação entre o anticorpo e estreptavidina ocorresse de maneira efetiva. Após a passagem de 0,5 mL de solução, a mesma foi incubada sobre a superfície do ouro por 2 horas. Então o sistema foi lavado com PBS (velocidade de 30 $\mu\text{L/min}$ por 30 minutos) para remover as moléculas não-ligadas e o espectro de transmissão foi registrado. Uma solução de BSA (100 $\mu\text{g/mL}$) foi injetada sobre a superfície do ouro a uma taxa de 20 $\mu\text{L/min}$ por um período de 2 horas, após a imobilização do anticorpo. Isto é necessário para que sítios de ligações não específicas sejam bloqueados.

Na próxima etapa, o antígeno p185 (ou proteína HER-2) foi passado sobre a superfície do substrato que já continha os anticorpos imobilizados. As moléculas do antígeno se ligam aos anticorpos promovendo uma mudança do índice de refração na região dos SPs e, conseqüentemente, ocorre um deslocamento das bandas do espectro de transmissão. Diante disso, uma solução de 30 ng/mL , em PBS, do

antígeno p185 foi preparada. Utilizando o sistema microfluídico a solução foi passada sobre a amostra a uma taxa de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ até a passagem de 0,5 mL de solução. Então o sistema foi deixado em repouso sobre o ouro por 30 minutos (para que as reações bioquímicas se completassem). Após isso, o sistema foi lavado com PBS (velocidade de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 30 min) e o espectro de transmissão foi novamente registrado.

Finalmente, foi utilizado um segundo anticorpo não-biotinilado que reage especificamente com o antígeno p185. Para isso foi preparada uma solução de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do anti-HER-2 secundário em PBS. Esta solução foi passada sobre a superfície do substrato (previamente modificado com o anticorpo primário e pelo antígeno p185) a uma velocidade de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ por um período de 40 min. Então a solução foi deixada incubar por 30 min. Após isso o sistema foi lavado com PBS (velocidade de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 30 min) e o espectro de transmissão foi registrado.

4. Resultados e Discussões

4.1. Caracterização dos substratos não-modificados

O substrato de nanoburacos utilizado para obtenção dos resultados que serão mostrados a seguir apresenta arranjos distribuídos conforme esquema mostrado no *upper set* da Figura 15.

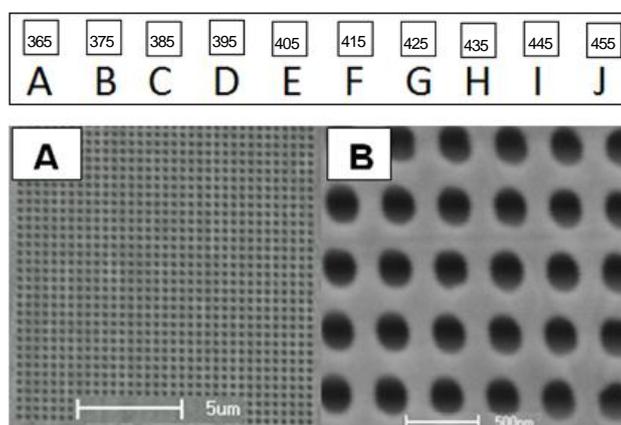


Figura 15. *Upper set*: representação esquemática dos arranjos de nanoburacos (200 nm de diâmetro) no substrato com periodicidades de 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445 e 455 nm, percorrendo os arranjos “A” para “J”, respectivamente. A e B são imagens obtidas por MEV, de um arranjo quadrado de nanoburacos com periodicidade de 455 nm em ampliações de (A) 2.000x e (B) 20.000x.

Os arranjos foram identificados por letras de “A” à “J”. Todos os arranjos são quadrados, tendo dimensões de 16x16 μm , buracos com profundidade de 100 nm (espessura do filme de ouro), diâmetro de 200 nm e se diferenciam apenas quanto à periodicidade (distância entre os centros de dois buracos vizinhos). A periodicidade aumenta do arranjo “A” ao “J”, isto é, a distância entre os buracos é menor no arranjo “A” e aumenta, à medida que se percorre os arranjos em direção a “J”.

Nas Figuras 16A e 16B são apresentadas imagens, obtidas por MEV, de uma amostra de grades de relevo em diferentes ampliações. Duas amostras SRG foram utilizadas neste trabalho, sendo fabricadas por toda a superfície de uma placa de vidro quadrada de 2,5x2,5 cm. As grades de azopolímeros recobertas com filme de ouro possuem 120 nm de profundidade e periodicidades de 400 e 410 nm.

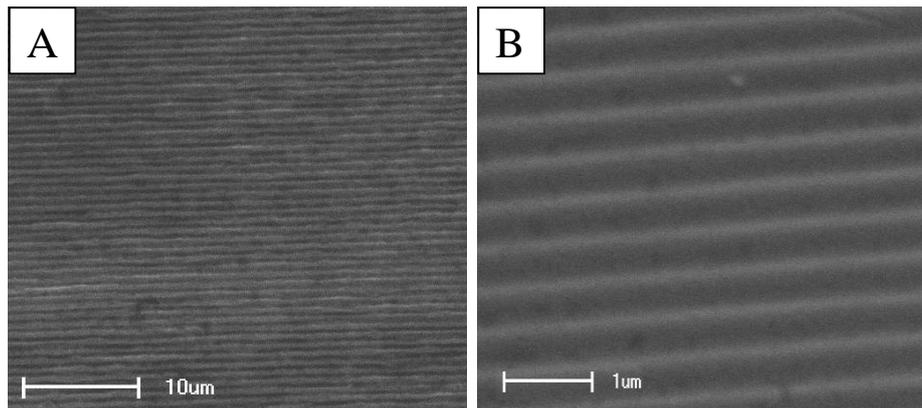


Figura 16. Imagens obtidas por MEV de uma SRG em filme de azopolímero recoberta com filme de ouro com periodicidade de 400 nm, em ampliações de (A) 2.000x e (B) 10.000x.

4.2. Efeito da periodicidade

O primeiro efeito estudado foi quanto à influência da mudança da periodicidade nos espectros de transmissão dos arranjos de nanoburacos e SRGs. Na Figura 17A é mostrado o espectro de transmissão obtido para os arranjos de nanoburacos, imersos em água, com periodicidades que variam entre 365 e 455 nm. Para o registro dos espectros de transmissão foi utilizada a configuração experimental mostrada na Figura 13. É possível verificar a presença de duas bandas plasmônicas, sendo a primeira situada na região de 580 nm (banda 1) e a segunda na região de 680 nm (banda 2). Essas bandas aparecem normalizadas na Figura 17B. Podemos observar que as bandas se deslocaram para o vermelho

(maiores comprimentos de onda) em função do aumento da periodicidade dos arranjos. Isto é um comportamento esperado, uma vez que o comprimento de onda de uma banda plâsmonica é diretamente proporcional à periodicidade de um arranjo quadrado de nanoburacos, como pode ser evidenciado através da Equação 3. Onde a_0 é a periodicidade do arranjo de nanoburacos, i e j são números inteiros que representam o modo plasmônico e ϵ_d e ϵ_m são as constantes dielétricas do meio isolante (dielétrico) e do metal, respectivamente.¹³⁰

$$\lambda_{(máx)} = \frac{a_0}{\sqrt{i^2 + j^2}} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (\text{Equação 3})$$

Um acréscimo de 90 nm na periodicidade, do primeiro para o último arranjo, promoveu um deslocamento total de 43,0 nm para a banda 1 e de 90,6 nm para a banda 2.

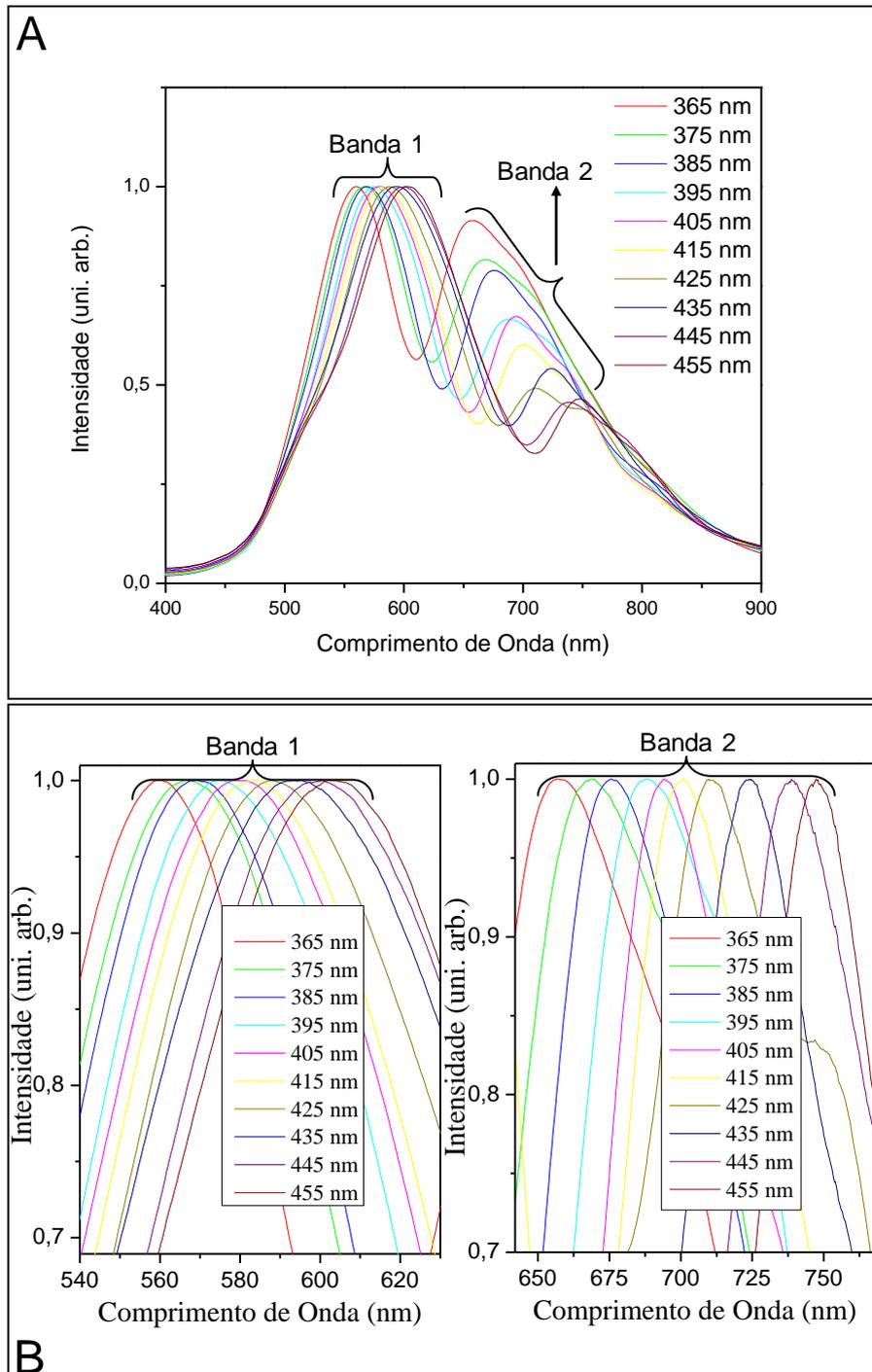


Figura 17. (A) Espectros de transmissão normal de luz branca para os arranjos de nanoburacos imersos em água em função da periodicidade dos arranjos. (B) Ampliação das bandas 1 e 2 normalizadas.

O mesmo estudo foi feito para as SRGs e para isso utilizou-se o esquema experimental descrito na Figura 14. O espectro de transmissão para as duas

amostras de SRG utilizadas está apresentado na Figura 18A. Os espectros foram obtidos em ar e com incidência de luz s-polarizada. Também foram verificadas duas bandas plasmônicas para os substratos de grades de relevo. A primeira banda se encontra na região de 600 nm (banda 1) e a segunda encontra-se na região de 680 nm (banda 2). Do mesmo modo que foi observado para os substratos contendo os arranjos de nanoburacos, as bandas, como esperado, se deslocaram para o vermelho ao passo que as periodicidades das grades aumentaram. Um deslocamento de 14,3 nm foi verificado para a banda 1 e de 15,3 nm para a banda 2. Estes deslocamentos são mais bem visualizados através das figuras inseridas, Figuras 18B (bandas 1 e 2 normalizadas).

Quando há uma incidência de luz sobre um filme metálico fino contendo nanoestruturas, como as mostradas neste trabalho, vários modos de SPs podem ser excitados na superfície do metal. Cada modo resulta em uma banda específica no espectro da luz transmitida e esses modos apresentam diferentes sensibilidades espectrais ($S = \Delta\lambda/\Delta n$, onde λ é o comprimento de onda, n é o índice de refração do meio em contato com o metal e S é a sensibilidade espectral). Para um sensor SPR baseado em um arranjo de nanoburacos 2-D em coordenadas cartesianas, os modos de SPs excitados são representados por dois números inteiros (i, j), sendo que a soma do quadrado destes dois números inteiros ($i^2 + j^2$) representa a ordem de cada modo SP. A sensibilidade espectral desses modos diminui com o aumento da ordem do modo SP, como pode ser mostrado através da Equação 4.

$$S = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n} = \frac{a_0}{\sqrt{i^2 + j^2}} \sqrt{\frac{\epsilon_2}{n^2 + \epsilon_2}} \quad (\text{Equação 4})$$

Isto quer dizer que os modos SPs de ordens menores são mais sensíveis do que os de ordens maiores.¹³¹

Para ambos os substratos a banda 2 apresentou maior sensibilidade do que a banda 1 frente a mudanças na periodicidade das nanoestruturas. Esta diferença de sensibilidade é muito mais evidente para os substratos contendo arranjos de nanoburacos, onde o deslocamento do espectro (devido a variação de periodicidade) para banda 2 foi mais que o dobro do deslocamento obtido para a banda 1. A explicação para essa sensibilidade maior da banda 2 é que possivelmente ela deva representar um modo de SP de ordem menor que o modo representado pela banda 1 (sabendo que bandas com valores de $i^2 + j^2$ menores são as mais sensíveis, como explicado acima tendo como base a Equação 3). Por esse motivo, sugere-se que da mesma forma que a banda 2 apresenta maior sensibilidade espectral que a banda 1, ela também apresente maior sensibilidade com relação a variação da periodicidade dos arranjos.

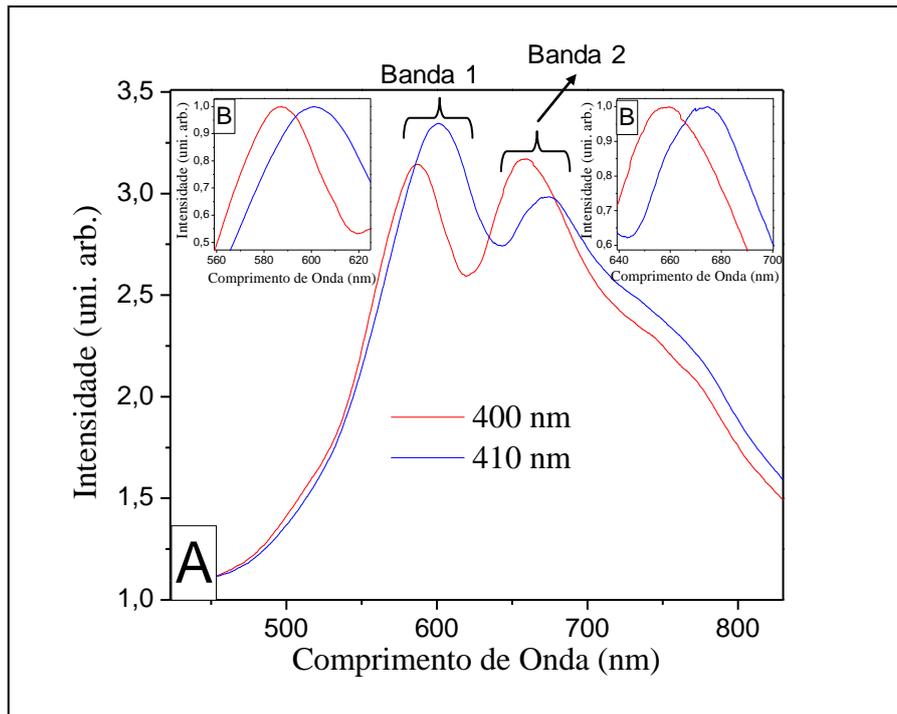


Figura 18. (A) Espectros de transmissão normal de luz branca s-polarizada para os substratos SRG com periodicidade de 400 e 410 nm e profundidade de 120 nm. (B) Ampliação das bandas 1 e 2 normalizadas.

4.3. Sensibilidade em função do índice de refração

Este ensaio foi feito no intuito de testar a capacidade do substrato em ter sua onda plasmônica perturbada ou não em função de alterações físicas na superfície do metal. Caso não haja uma alteração significativa o substrato não possui potencial para aplicação em sensores baseados em SPR. Para verificar a sensibilidade dos substratos frente às alterações no índice de refração, promoveu-se o fluxo de soluções de glicose de diferentes concentrações sobre os substratos utilizando uma cela de fluxo, e então se registrou o espectro de transmissão para cada solução. Na Figura 19A são mostrados os espectros de transmissão para o arranjo “J” (455 nm de periodicidade). Do mesmo modo, a Figura 20A e 20C apresenta os espectros de transmissão para as SRGs utilizadas. Foram observados deslocamentos para a

região do vermelho e isso é um comportamento esperado para substratos contendo nanoestruturas.^{132,133} O máximo das bandas de transmissão (para cada substrato), em função do índice de refração, é então plotado e a inclinação da curva resultante é definida como a sensibilidade dos substratos.¹³¹ As Figuras 19B, 20B e 20D apresentam os gráficos usados para determinação da sensibilidade do arranjo de nanoburacos “J” (periodicidade de 455 nm) e das SRGs. Os destaques nestas figuras são as respectivas bandas plasmônicas normalizadas.

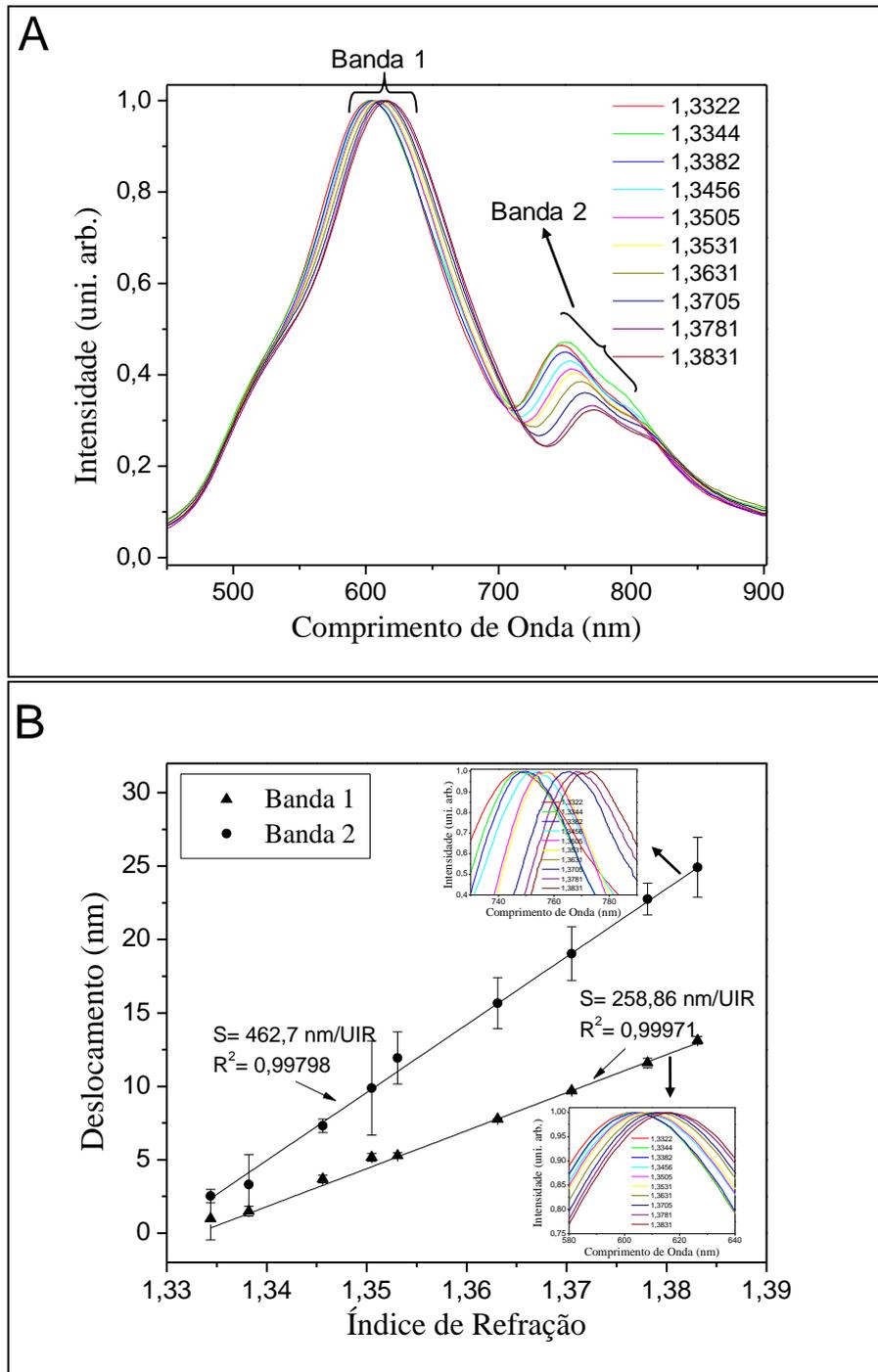


Figura 19. (A) Espectros de transmissão normal de luz branca em função do índice de refração para o arranjo de nanoburacos "J" com periodicidade de 455 nm. (B) Curvas de deslocamento dos comprimentos de onda das bandas de transmissão ($\lambda_{\text{máximos}}$) em função do índice de refração, para bandas 1 e 2. Em destaque são mostradas ampliações da região de interesse dos respectivos espectros, normalizados.

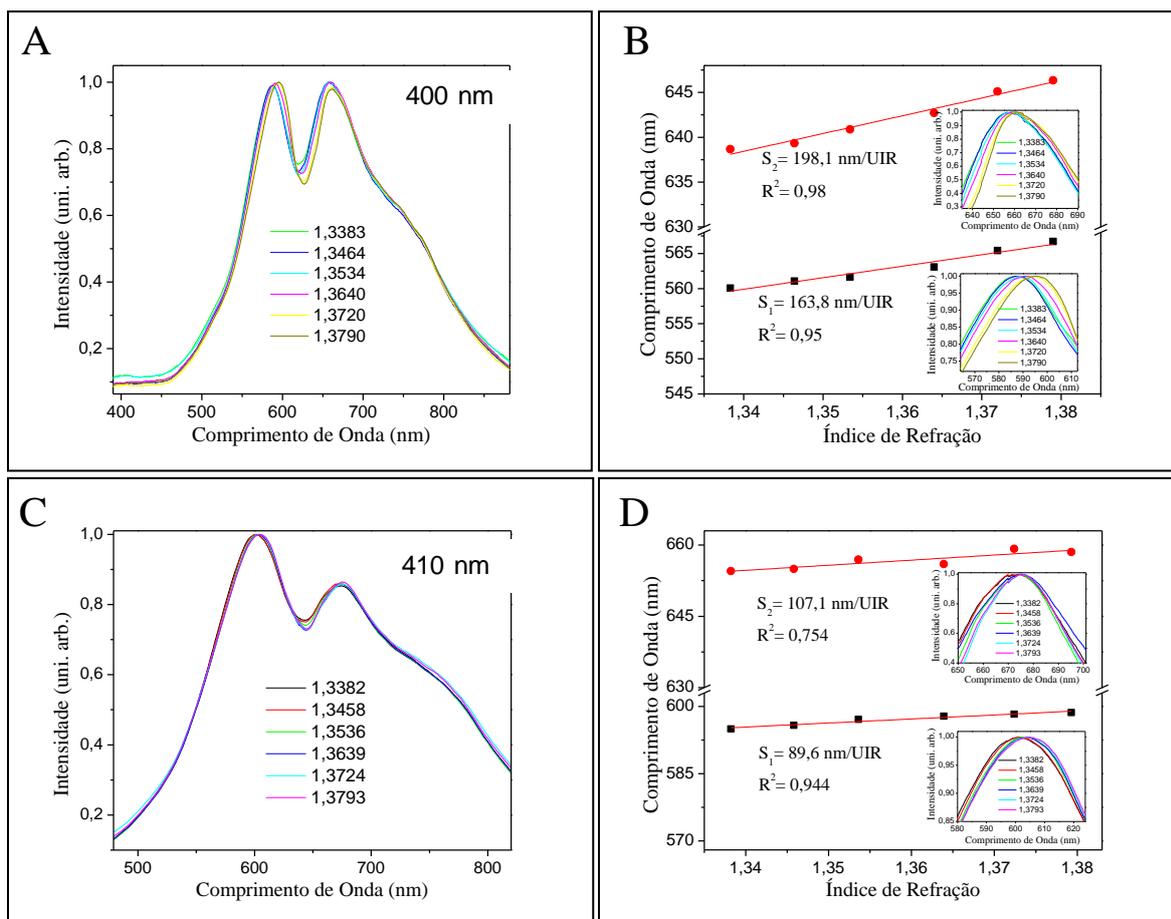


Figura 20. (A) e (C) Espectros de transmissão normal de luz branca em função do índice de refração para as SRGs de diferentes periodicidades (400 e 410 nm, respectivamente) e profundidade de 120 nm. (B) e (D) Curvas de deslocamento dos comprimentos de onda das bandas de transmissão ($\lambda_{\text{máximos}}$) em função do índice de refração, para bandas 1 e 2. Em destaque são apresentadas ampliações da região de interesse dos respectivos espectros, normalizadas.

Analisando as Figuras 19 e 20 foi possível verificar que o arranjo de nanoburacos “J” apresenta uma sensibilidade superior àquela obtida para as SRGs. Para o arranjo de nanoburacos o valor da sensibilidade foi de 258,9 nm/UIR para a banda 1 e 462,7 nm/UIR para a banda 2, enquanto que para as SRGs com periodicidade de 400 nm e 410 nm foram obtidos valores de sensibilidade iguais a 163,8 nm/UIR e 89,6 nm/UIR para a banda 1 e 198,1 nm/UIR e 107,1 nm/UIR para a

banda 2, respectivamente. A sensibilidade obtida para os arranjos de nanoburacos é semelhante à de outros substratos reportados na literatura.^{134,135} Para as grades de relevo, os resultados são comparáveis a de outros dispositivos de mesma natureza. Dados reportados na literatura mostram que a sensibilidade de substratos SPR baseados em grades de relevo varia entre 300 e 630 nm/UIR, dependendo do comprimento de onda utilizado para a análise.¹³³ Outro sensor baseado em grades de relevo mostrado na literatura apresentou sensibilidade de 600 nm/UIR trabalhando no modo transmissão (mesmo arranjo experimental utilizado neste trabalho) e luz *p*-polarizada, mas sem incidência de luz normal à superfície do substrato onde é avaliada também a influência do ângulo de incidência de luz sobre as grades.¹³⁶

Apesar do substrato contendo os arranjos de nanoburacos ser mais sensível, a sua fabricação é bastante onerosa. Para obtê-los são necessários equipamentos de alto custo (inclusive de operação), como é o caso do FIB. Por outro lado, as grades de relevo são obtidas por métodos mais simples (interferência de lasers), de forma que o custo de produção é reduzido e, por isso, se torna uma excelente alternativa de substrato plasmônico.

Notou-se ainda que a maior parte das bandas plasmônicas apresentadas pelos substratos nanoestruturados se ajustou bem a um comportamento linear, haja visto valores de R^2 próximos a 1. Isto é favorável para aplicação em sensores, uma vez que uma resposta diretamente proporcional a quantidade do analito é mais vantajosa.

Verificou-se também que, para ambas as amostras, a banda 2 é mais sensível que a banda 1, com relação à variação de índices de refração na superfície das nanoestruturas (como já verificado a banda 2 tem maior sensibilidade também

com relação a variação de periodicidade). Como já mencionado, quando há uma incidência de luz sobre um filme metálico fino contendo nanoestruturas, como as mostradas neste trabalho, vários modos SPs podem ser excitados na superfície do metal. Cada modo resulta em uma banda específica no espectro da luz transmitida e esses modos apresentam diferentes sensibilidades espectrais (S). Para um sensor SPR baseado em um arranjo de nanoburacos 2-D os modos SPs excitados são representados por dois números inteiros (i,j), sendo estes a ordem de cada modo de SP. A sensibilidade espectral desses modos diminui com o aumento da ordem (Equação 4). Isto quer dizer que os modos SPs de ordens menores (modos cuja soma $i^2 + j^2$ apresenta valores menores) são mais sensíveis do que os de maiores ordens.¹³¹ Dessa forma, por ter maior sensibilidade espectral, possivelmente a banda 2 representa um modo de SPs de ordem menor, para os substratos utilizados neste trabalho.

Outro estudo feito aqui foi verificar a influência da periodicidade na sensibilidade dos arranjos de nanoburacos. A Figura 21 apresenta a sensibilidade em função dos arranjos de diferentes periodicidades. A periodicidade aumenta de 365 até 455 nm. É possível notar que a sensibilidade dos arranjos se torna maior, para as bandas 1 e 2, com o aumento da distância entre os buracos do arranjo. Desta forma, temos o arranjo de periodicidade de 455 nm como o mais sensível dentre os arranjos da amostra. Dados reportados na literatura revelam que a sensibilidade das bandas é dependente da periodicidade de um sensor SPR baseado em um arranjo de nanoburacos e que esta é diretamente proporcional ao período do arranjo.¹³¹ Por isso, os resultados aqui obtidos estão em perfeito acordo com a teoria.

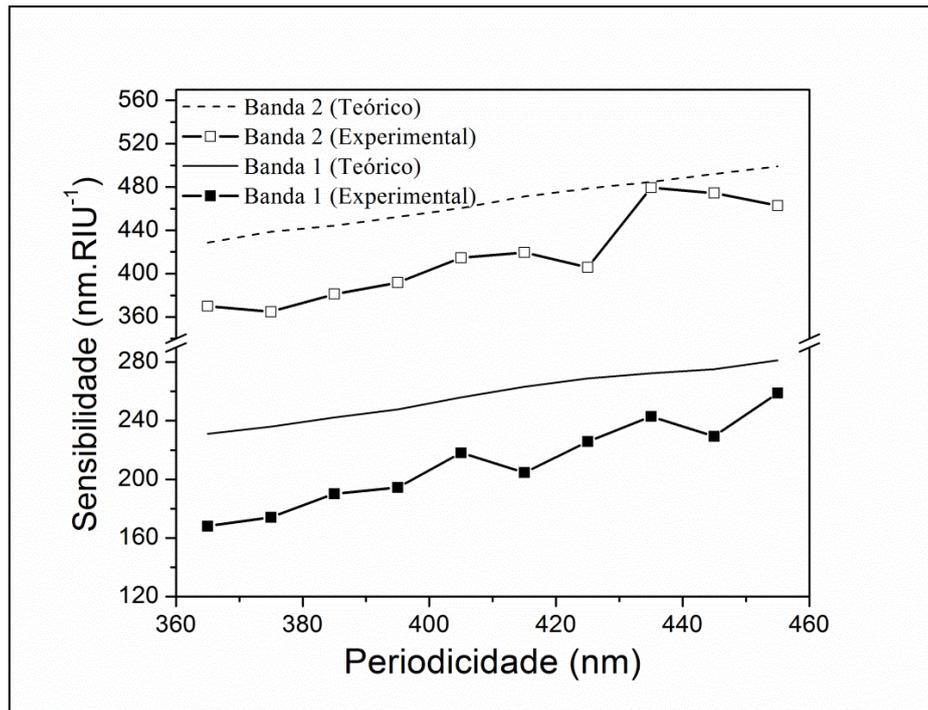


Figura 21. Sensibilidades teóricas e experimentais em função da periodicidade dos arranjos, para as bandas 1 e 2. As periodicidades dos arranjos são 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445 e 455 nm.

As bandas de transmissão 1 e 2 obtidas para os arranjos de nanoburacos representam os modos (2,0) e (1,0) respectivamente, obtidas a partir da Equação 3. Isto corrobora com o fato de a banda 2 ser mais sensível que a banda 1, como já mencionado (modo mais baixo). Vale comentar que a sensibilidade teórica foi obtida utilizando a Equação 4 e que constante dielétrica do ouro é um número complexo na forma de $\epsilon_m = \epsilon_1 + i\epsilon_2$. As partes real e imaginária (valores de ϵ_1 e ϵ_2) são fortemente dependentes do comprimento de onda das bandas.¹³⁷ Assim os valores para ϵ_1 e ϵ_2 foram obtidos a partir do gráfico que os relaciona com o comprimento de onda, conforme Figura 22.

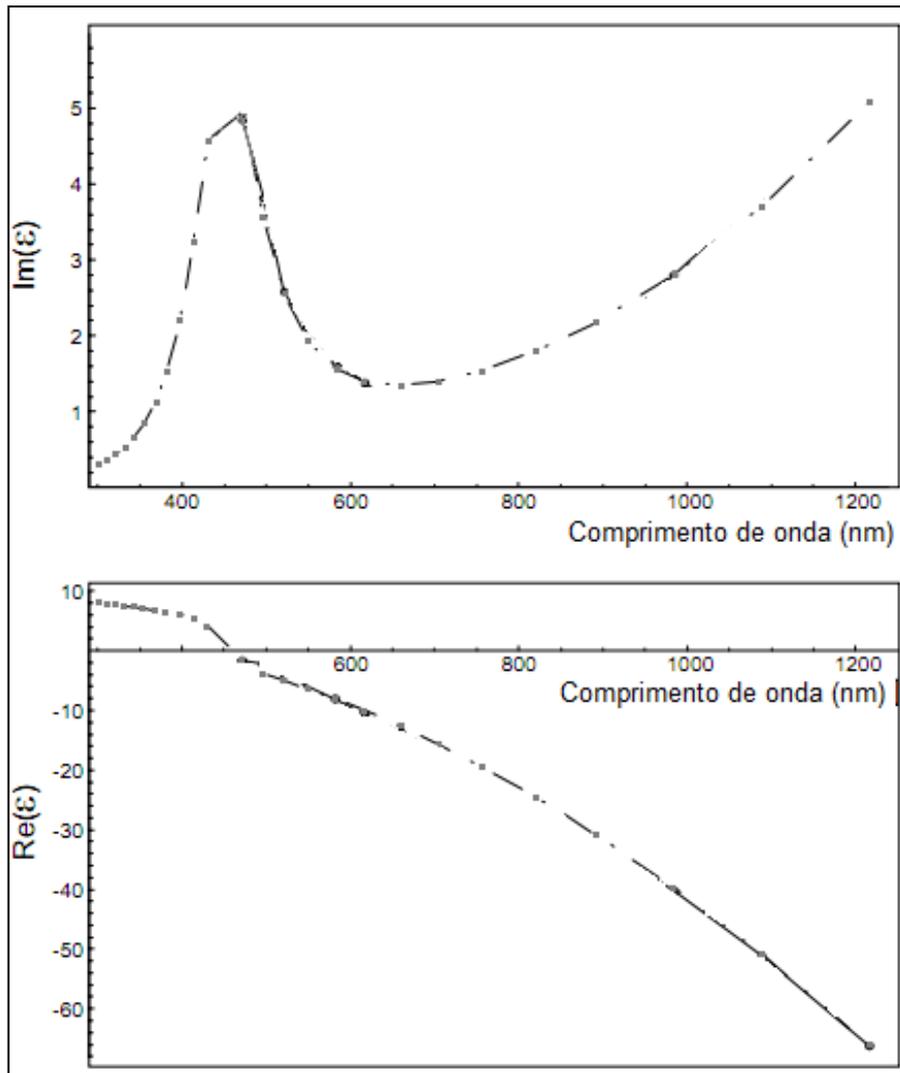


Figura 22. Partes imaginária (ϵ_2) e real (ϵ_1) da função dielétrica complexa do ouro em função do comprimento de onda.¹³⁷

Assim, para os comprimentos de onda dos máximos de transmissão das bandas (modos (2,0) e (1,0)) em cada arranjo foram obtidos um valor específico de ϵ_m , que então foram utilizados para o cálculo da sensibilidade. Os valores de n usados no cálculo foram àqueles referentes a cada solução de glicose utilizada para a obtenção das sensibilidades experimentais (1,3322, 1,3344, 1,3382, 1,3456, 1,3505, 1,3531, 1,3631, 1,3705, 1,3781 e 1,3831). A previsão teórica de sensibilidade das bandas 1 e 2 estão também apresentadas na Figura 21 para cada arranjo de periodicidades distintas (365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445 e

455 nm). É possível perceber que o comportamento experimental realmente segue a mesma tendência teórica. Contudo uma simples previsão analítica não se adapta perfeitamente com os resultados experimentais. Isto ocorre pois a Equação 4 pode ser tomada como uma aproximação em termos de previsão da ressonância dos SPs. Outros efeitos, tais como a forma do buraco e rugosidade não são levados em conta pela equação analítica. Contudo, a mesma tendência é observada entre os valores de sensibilidade experimental e teórica e a Equação 4 captura qualitativamente bem a tendência experimental, ou seja, maiores periodicidades dos arranjos resultam em maiores sensibilidades.

4.4. Imobilização de biomoléculas - biossensibilidade

Após a determinação da sensibilidade, a superfície de ouro das amostras foi modificada com biomoléculas, para que pudesse ser feito o estudo da influência delas nos SPs. Esse trabalho foi feito utilizando o sistema de microfluidos (para amostras contendo o arranjo de nanoburacos) e uma célula de fluxo (para as que continham grades de relevo).

O metal normalmente empregado como transdutor em sensores SPR é o ouro que, devido a sua propriedade inerte, pode ser utilizado em processos eletroquímicos. Em geral, as estratégias conhecidas para imobilização de biomoléculas sobre superfícies de ouro são baseadas nas fortes ligações químicas entre os grupos tiol (SH ou SS) com o ouro.¹³⁸

Os métodos de formação de monocamadas auto montadas (SAMs) baseados em vários derivados tióis têm sido aplicados para a biotinição de superfícies de ouro. Entre estes métodos, a modificação pode ser feita imobilizando monocamadas de cisteamina ou ácido 11-mercaptoundecanóico sobre a superfície do sensor.¹³⁹ A

modificação da superfície do metal com esses alcanotóis leva a formação de SAMs de moléculas na superfície do ouro, com grupos funcionais livres na superfície do substrato metálico. Esses grupos permitem a formação de interações com grupos de outras biomoléculas como a biotina e/ou proteínas, de modo que essas também sejam adsorvidas na superfície, de modo organizado. Dependendo da proteína a ser imobilizada na superfície, um ou outro alcanotiol deve ser selecionado para possibilitar a reação da proteína de interesse, isto é, gerando sítios reativos para que a molécula protéica possa interagir.

Nos substratos contendo arranjos de nanoburacos a modificação da superfície foi executada utilizando o esquema cisteamina (alcanotiol)/biotina/estreptavidina. A biotina interage através do grupo éster succinamida com aminas primárias presentes na monocamada previamente imobilizada (reação apresentada na Figura 23). A biotina atua como *linker* para possibilitar a imobilização de estreptavidina.

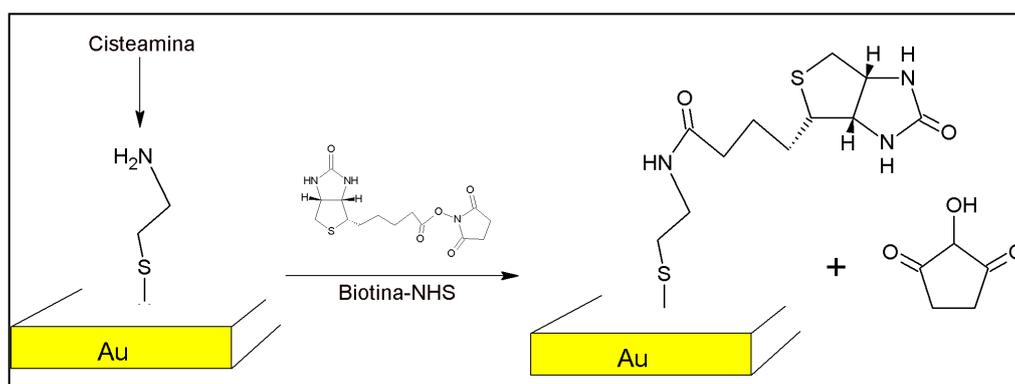


Figura 23. Reação de acoplamento via amina entre biotina-NHS e grupos aminas primárias da cisteamina.

Essa estratégia foi escolhida pois a biossensibilidade dos sensores é determinada em função da perturbação provocada na onda plasmônica quando ocorre interação (ligação química) com biomoléculas e para sua caracterização provocamos a modificação da superfície com uma biomolécula conhecida, a

estreptavidina, de modo a simular uma situação real. Nesse sentido, o substrato de ouro com a superfície modificada com o sistema cisteamina/biotina (FIGURA 23), foi utilizada para imobilizar a biomolécula protéica estreptavidina, via interação bioespecífica com a biotina. Esta proteína foi escolhida por apresentar uma grande afinidade por moléculas de biotina (é uma das interações não-covalentes mais fortes conhecidas até então), sendo um sistema que imita uma interação real entre um anticorpo e antígeno que também apresenta alta bioespecificidade. Após esse procedimento de modificação a superfície do substrato ficou conforme mostrado na Figura 24.

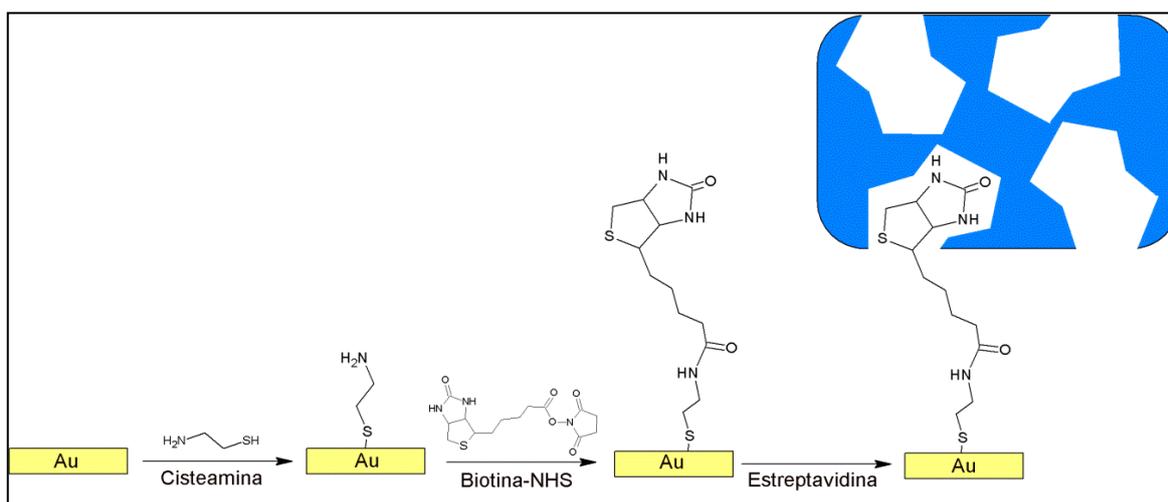


Figura 24. Esquema da estratégia de ligação entre biotina e estreptavidina.

Com base nisso foram obtidos espectros de transmissão dos arranjos imersos em PBS, após cada etapa de modificação. Um deslocamento para o vermelho da banda de transmissão é esperado à medida que camadas de moléculas vão sendo imobilizadas sobre a superfície do arranjo, uma vez que o índice de refração imediatamente sobre o substrato também é alterado devido à presença dessas moléculas. Os espectros para as bandas de transmissão normalizados obtidos para o arranjo de periodicidade de 455 nm estão mostrados na Figura 25. Como já mencionado, este arranjo foi o mais sensível dentre aqueles

estudados aqui e por esse motivo apresentamos somente os resultados para este arranjo, embora o comportamento para os demais arranjos tenha sido semelhante.

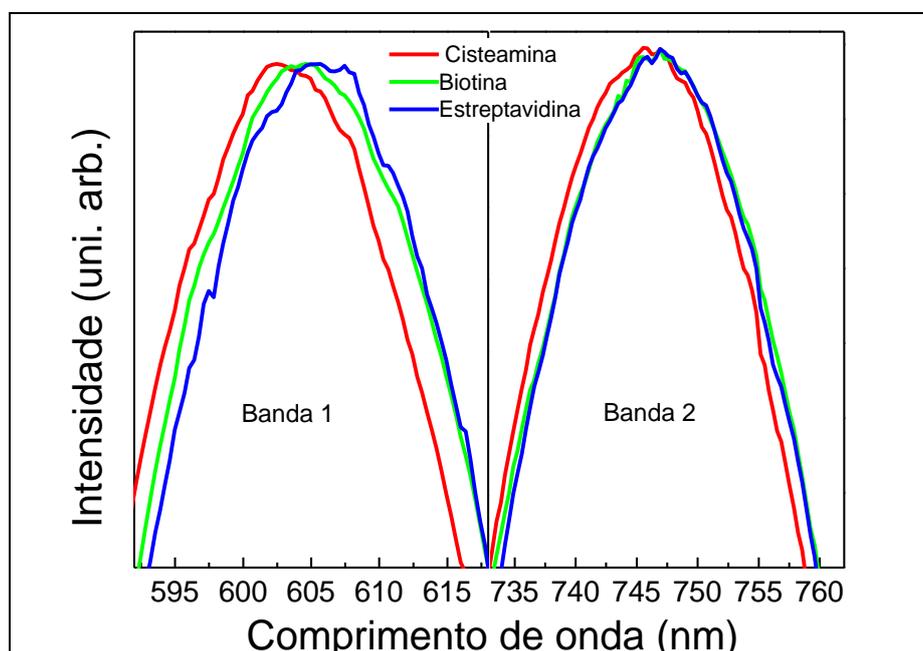


Figura 25. Regiões ampliadas dos espectros normalizados das bandas de transmissão para cada etapa de modificação para um arranjo de nanoburacos de 455 nm de periodicidade.

Além de maior sensibilidade do *bulk*, outro parâmetro importante que caracteriza o desempenho de um biossensor SPR é a resolução, a qual corresponde ao mínimo de variação de índice de refração que pode ser detectada e isto está relacionado com o limite de detecção do sistema.¹³¹ Assim, quanto menor a resolução, melhores resultados serão obtidos com o sensor. Considerando que o deslocamento do comprimento de onda (devido à variação de índice de refração na superfície do sensor) em nosso sistema é medido com precisão de 0,1 nm, então a resolução para a banda 1 e 2 é aproximadamente 4×10^{-4} e 2×10^{-4} UIR. Assim, apesar da banda 2 ter maior sensibilidade em relação ao *bulk* (relativamente grandes variações de índices de refração) e maior resolução do que a banda 1

(462,7 nm/UIR e 2×10^{-4} UIR contra 258,9 nm/UIR e 2×10^{-4} UIR), os maiores deslocamentos foram obtidos para banda 1 em testes com biomoléculas onde são envolvidas pequenas variações de índice de refração devidas à adsorção de biomoléculas. Isto ocorre pois o desempenho de um biossensor SPR depende ainda da intensidade e da largura do sinal a meia altura (FWHM, do inglês *full width at half maximum*) da banda no espectro de transmissão, uma vez que eles podem afetar a razão sinal/ruído das medidas. A banda 1 tem intensidade de luz transmitida 56% maior e um valor de FWHM 64% menor (ver Figura 19A), que gera vantagens adicionais com relação a sinal/ruído apresentado pela banda 1 em relação a banda 2 e a torna a melhor escolha para análise nos testes de biossensibilidade. Além disso, a banda 2 (maiores comprimentos de onda) se estende para mais longe da superfície do que a banda 1 (menores comprimentos de onda), isto é, ela penetra mais no meio dielétrico.⁶ Isto diminui sua sensibilidade na superfície onde as biomoléculas encontram-se adsorvidas. Com base nisso é possível verificar que somente a resolução e sensibilidade do *bulk* não podem ser considerados como únicos indicadores para análise do desempenho de um banda plasmônica.

Após a modificação com biotina foi verificado um deslocamento para o vermelho de ca. 1,0 nm da banda 1, em relação a modificação com a camada prévia de cisteamina. Em seguida foi observado um deslocamento de 1,2 nm para a mesma banda após a adsorção de estreptavidina na superfície do sensor via interação com a biotina (Figura 26). No total, foi observado um deslocamento de 2,2 nm após a imobilização de biomoléculas na superfície do sensor.

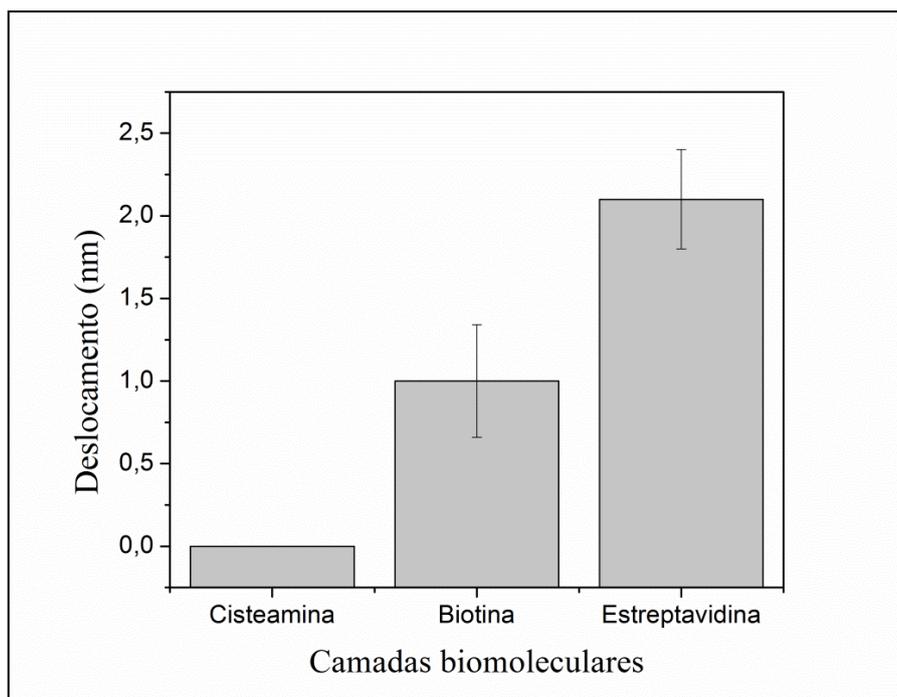


Figura 26. Deslocamentos obtidas para a banda 1 (Figura 25) observadas após cada etapa de modificação da superfície do ouro contendo arranjos de nanoburacos (455 nm de periodicidade)

Outro procedimento que pode ser usado para testar a biossensibilidade de sensores SPR consiste na preparação da superfície do ouro com MUA ao invés de cisteamina, seguida de imobilização de BSA (biomolécula protéica). O MUA é uma escolha conveniente para imobilização covalente de proteínas usando um método de acoplamento *via* amina.¹⁴⁰ Mas para permitir a imobilização covalente de proteínas a monocamada de MUA deve ser ativada. O MUA apresenta grupos ácidos carboxílicos orientados na superfície do substrato quando imobilizado na superfície do ouro e para que seja possível imobilizar proteínas nesta monocamada os grupos ácidos devem ser modificados utilizando uma mistura de NHS/EDC. Esta reação resulta na formação de ésteres succinamidas reativos na superfície, a qual pode combinar com grupos amins primárias de uma molécula de proteína (como o BSA) e formar uma ligação peptídica com a camada de MUA na superfície. Neste

caso não é necessária a etapa de biotinylação, uma vez que o BSA (proteína) interage diretamente com a monocamada de MUA ativada, sem a necessidade do *linker*. O esquema de ativação da monocamada de MUA, a fim de produzir sítios ativos para ligação com aminas presentes no BSA, está descrito na Figura 27.

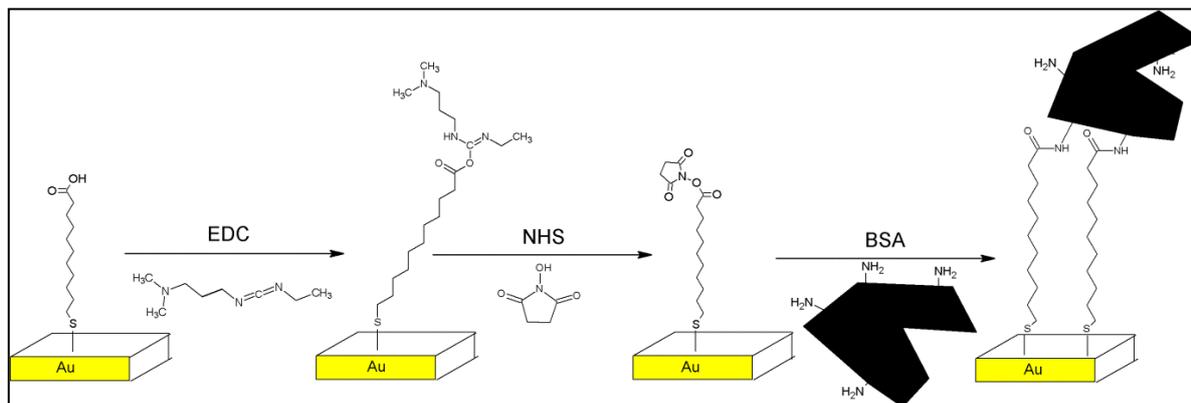


Figura 27. Esquema de ativação do grupo carboxílico do MUA usando EDC/NHS e acoplamento da molécula de BSA.

Para os testes de biossensibilidade nas grades de relevo a superfície do substrato foi modificada com MUA/BSA. Um novo substrato contendo grades com periodicidade de 410 nm e profundidade de 120 nm foi utilizado (apesar de ter menor sensibilidade que as grades com periodicidade de 400 nm como mostrado na Figura 20, esta precisou ser utilizada pois a grade mais sensível sofreu danos irreparáveis enquanto era manipulada no laboratório). Os espectros de transmissão, em solução aquosa, foram obtidos após cada etapa da modificação e são mostrados na Figura 28. Duas bandas foram obtidas neste espectro, uma na região de 590 nm (banda 1) e outra em ca. 660 nm (banda 2). Um deslocamento para o vermelho do máximo das bandas de transmissão foi observado após modificação com BSA. Os comprimentos de onda no máximo das bandas 1 e 2 em função das etapas de modificação estão apresentados nas Figuras 28A e 28B, respectivamente. São apresentadas ainda, as bandas de transmissão normalizadas

de luz s-polarizada como destaques nessas figuras, evidenciando os deslocamentos sofridos pelas bandas quando o BSA foi adsorvido na superfície do substrato previamente modificado com MUA e ativado com grupos NHS.

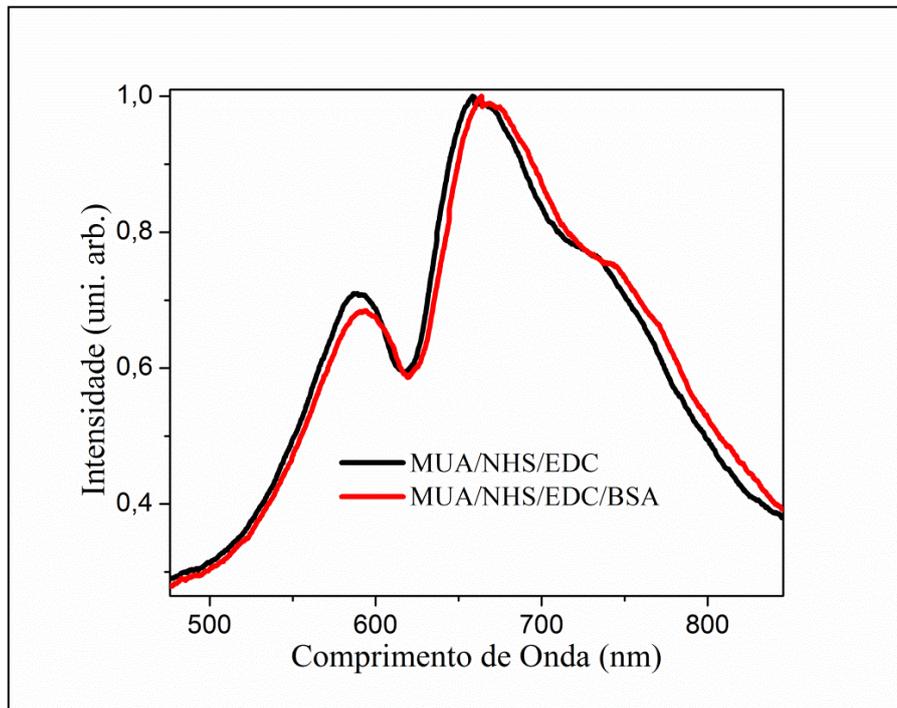


Figura 28. Espectros de transmissão normal de luz s-polarizada para a SRG com periodicidade de 410 nm e profundidade 120 nm após a modificação da superfície com MUA/BSA.

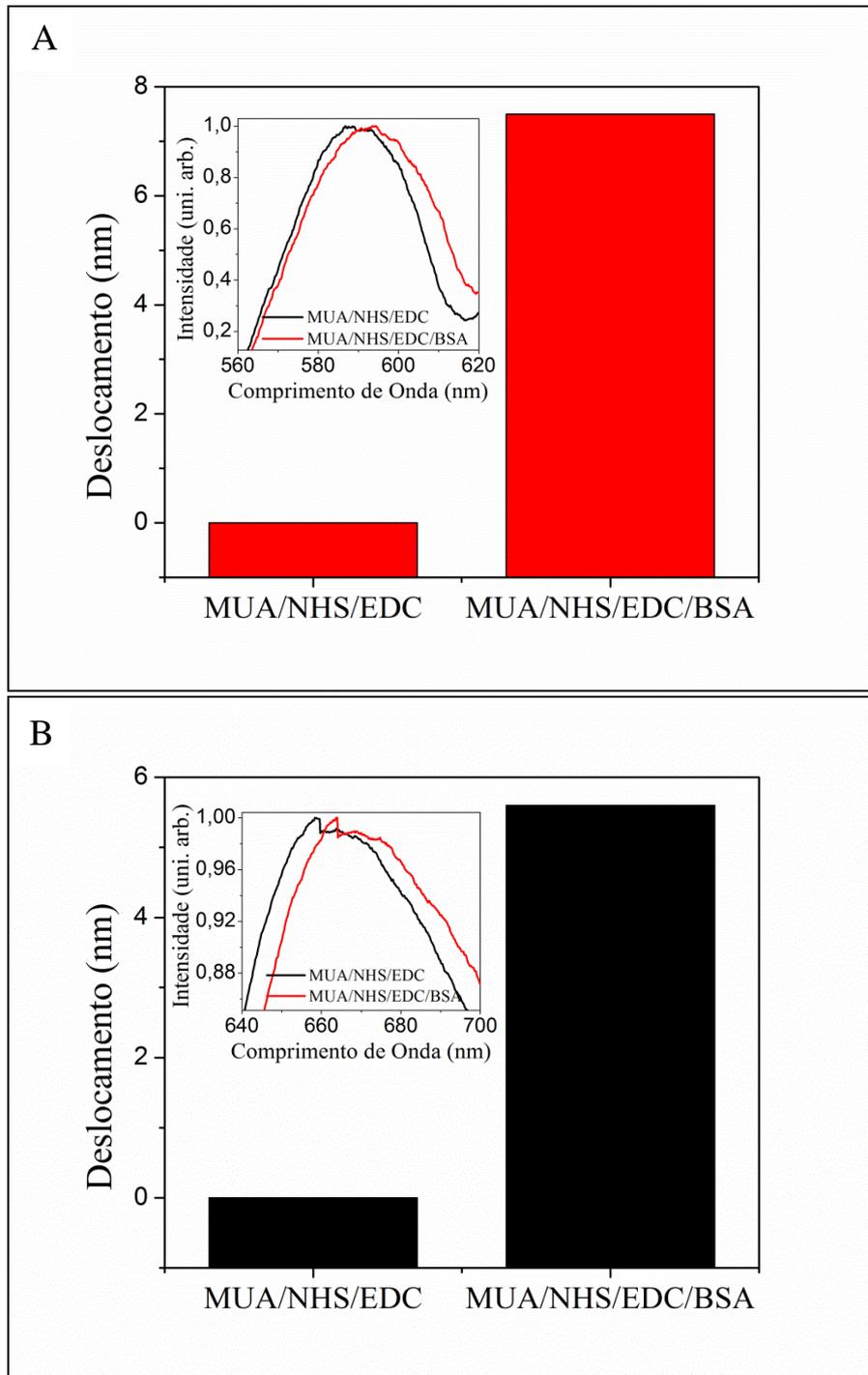


Figura 29. Deslocamento dos máximos de transmissão normal em função das etapas de modificação da superfície para (A) banda 1 e (B) banda 2 apresentadas na Figura 28. Em destaque (*inset*): regiões ampliadas dos espectros de transmissão normal de luz s-polarizada (Figura 27) para cada etapa de modificação, normalizadas.

Analisando a Figura 29, verifica-se um deslocamento de ca. 7,5 nm para a banda 1 e de ca. 5,6 nm para a banda 2. Para esse substrato a sensibilidade em relação ao *bulk* para a banda 2 (107,1 nm/UIR) foi maior que aquela obtida para a banda 1 (89,6 nm/UIR), como mostrado na Figura 20. Contudo a regressão linear para a sensibilidade da banda 2 apresenta um valor de $R^2=0,754$, um valor muito baixo que indica que um modelo linear não é o mais adequado para descrever o comprimento de onda dessa banda com relação ao índice de refração. Por esse motivo esse valor de sensibilidade não é confiável e a banda 1 deve ser a melhor escolha para análise em teste de biossensibilidade. As bandas obtidas são estreitas e apresentaram deslocamentos próximos a de sensores baseados em arranjos de nanoburacos com superfície modificada com BSA e até mesmo de outros sensores baseados em grades de difração metálica.^{133,136}

4.5. Imobilização de anticorpos e detecção do antígeno p185

O oncogene HER-2/Neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) é um gene humano (relacionado com aparecimento de tumores e por isso chamado de oncogene) que codifica uma glicoproteína de massa molecular de 185.000 Da conhecida como p185 (ou proteína HER-2/Neu), a qual contém 1255 resíduos de aminoácidos.¹⁴¹ A amplificação do gene HER-2 tem sido observado devido a processos mutagênicos que leva a superexpressão (*overexpression*) da proteína HER-2 (ou p185).¹⁴² Embora o gene esteja presente em células sadias,¹⁴³ a observação da superexpressão da proteína tem levado ao uso da p185, ou seus fragmentos, como analitos marcadores para detecção precoce de câncer de mama (um dos tipos de câncer mais incidentes entre as mulheres segundo o INCA).^{144,145} Alguns estudos clínicos têm relacionado as mudanças na manifestação

do gene HER-2 a muitos cânceres humanos, mais notavelmente nos cânceres de mama, ovário e gástricos.¹⁴⁶ Mais recentemente, estudos têm sugerido o envolvimento do gene HER-2/Neu ao câncer humano de próstata também.¹⁴⁷ Mas o interesse maior é na ocorrência do HER-2 como um marcador tumoral para carcinomas de mama agressivos e resistentes a tratamentos. O arranjo utilizado no estudo de detecção do antígeno p185 foi o de periodicidade 400 nm, contendo nanoburacos com 200 nm de diâmetro em um arranjo quadrado de 16 x 16 μm . Os espectros de transmissão obtidos para esse arranjo, imerso de soluções de glicose com diferentes índices de refração, está mostrado na Figura 30. Foi observada a presença de duas bandas plasmônicas (banda 1 e 2), que é o comportamento verificado para os outros arranjos já descritos neste trabalho. Observa-se que a banda 2 é bem mais intensa e sensível que a banda 1 (comportamento semelhante aos dos arranjos já estudados).

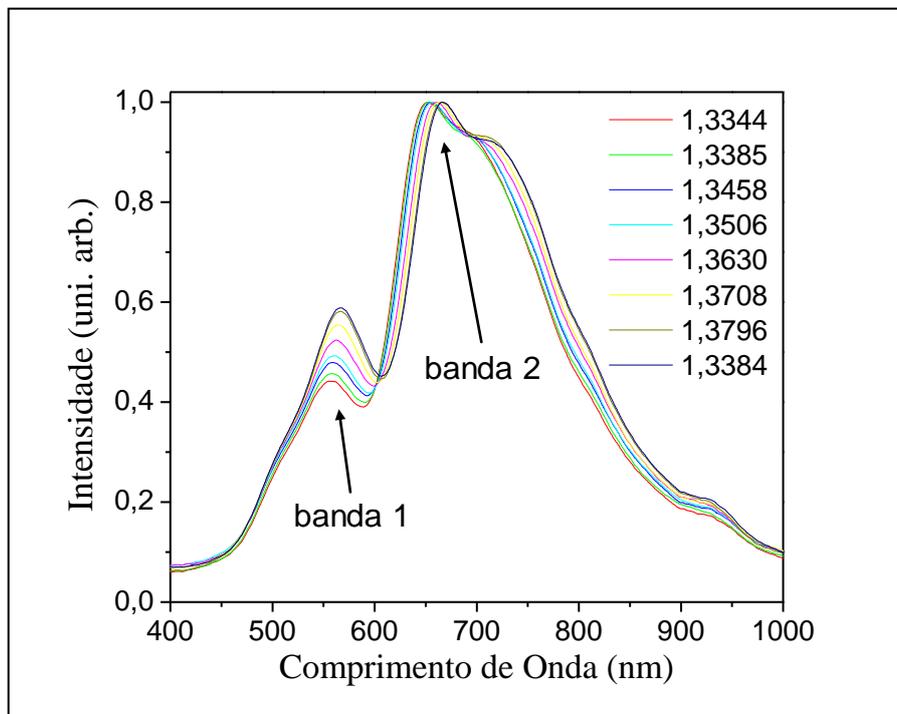


Figura 30. Espectros de transmissão normal de luz branca em função do índice de refração para o arranjo de periodicidade de 400 nm.

A partir destes espectros obteve-se a curva de calibração (Figura 31), para a banda 2 que é a mais sensível, de onde foi possível obter a sensibilidade a partir da inclinação da curva. Em destaque na Figura 31 é mostrada a banda 2 normalizada e ampliada. O resultado da sensibilidade obtida foi de 304,5 nm/UIR (a banda 1 teve sensibilidade de apenas 147,8 nm/UIR), com bom comportamento linear visto o elevado valor de $R^2=0,99758$. Esse valor de sensibilidade foi semelhante àqueles obtidos para os arranjos de nanoburacos já analisados neste trabalho e, portanto, um arranjo com potencial para detectar a presença de biomoléculas.

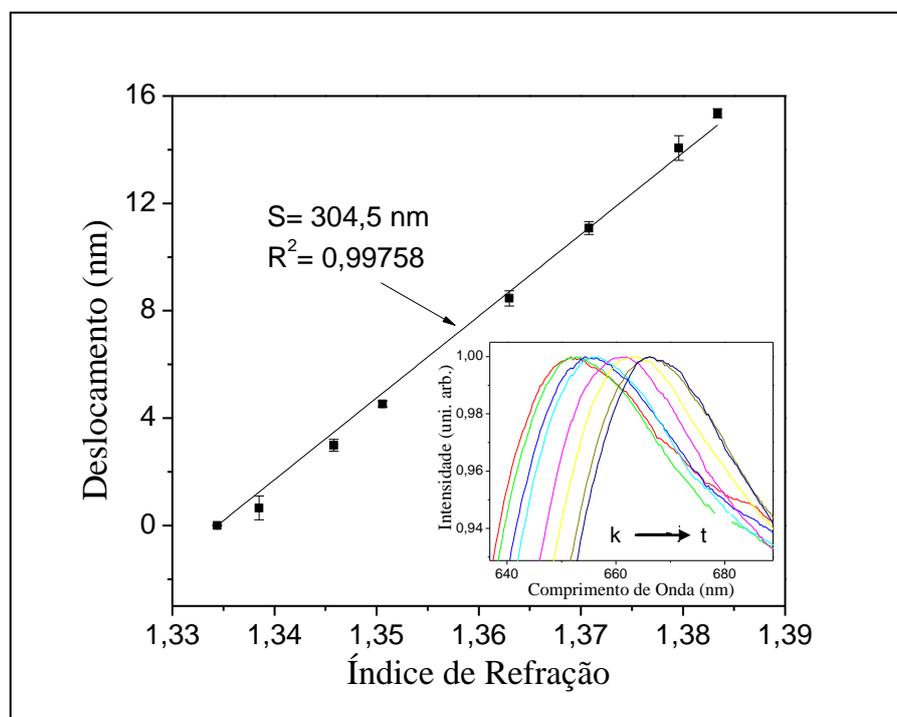


Figura 31. Deslocamento do $\lambda_{\text{máximo}}$ de transmissão normal para a banda 2 da Figura 30 em função do índice de refração, obtidos para o arranjo de nanoburacos com periodicidade de 400 nm. Em destaque é apresentada a banda 2 (Figura 30) normalizada e ampliada. De k para t corresponde aos espectros de transmissão relativos aos diferentes índices de refração.

A superfície da amostra contendo o arranjo de nanoburacos foi modificada inicialmente com cisteamina, após isso, com moléculas de biotina e estreptavidina. Em uma segunda fase da modificação, a superfície recebeu moléculas do anticorpo biotinilado (que reage especificamente com o antígeno p185) através da interação da parte biotinilada deste anticorpo com moléculas de estreptavidina já imobilizada. Em seguida, a superfície recebeu o antígeno p 185 e finalmente foi passado sobre a superfície do sistema o anticorpo secundário que também reage especificamente com o antígeno p185. A presença de um anticorpo secundário (o caracteriza o modo de detecção sanduíche) melhora a sensibilidade do sensor, uma vez que os antígenos são moléculas de relativa baixa massa molar (baixo volume) o que não gera mudanças significativas no índice de refração, tornando os deslocamentos das bandas difíceis de serem observados. Contudo, moléculas do antígeno ligadas a moléculas de um anticorpo secundário causam uma mudança relativamente maior no índice de refração o que pode ser mais bem observado através dos espectros de transmissão.

A Figura 32 apresenta o deslocamento obtido para a banda 2 do espectro de transmissão para o arranjo descrito acima para cada etapa da segunda fase da modificação. Esta banda apresentou maior intensidade e sensibilidade com relação a banda 1. O destaque nesta Figura 32 apresenta a banda 2 normalizada e ampliada.

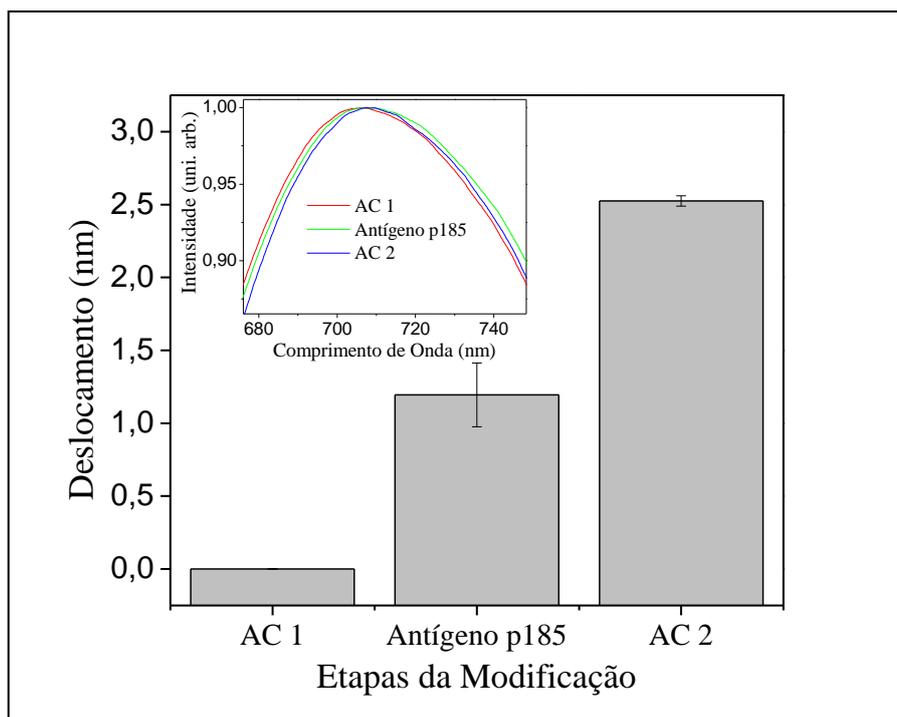


Figura 32. Deslocamento da banda 2 como função das etapas de modificação para o arranjo de nanoburacos utilizado para imobilização das biomoléculas. Em destaque: banda 2, do espectro de transmissão, normalizada e ampliada. AC 1 e AC 2 correspondem aos anticorpos biotinizado e secundário, respectivamente.

Como pode ser observado através da Figura 31, foram observados deslocamentos crescentes para maiores comprimentos de onda para a banda 2 a medida que se foi prosseguindo com as etapas de modificação. Isso é um comportamento coerente, uma vez que à medida que moléculas vão sendo imobilizadas na superfície, o índice de refração efetivo é aumentado e por isso o *red-shift* é verificado (comportamento já evidenciado para outros arranjos neste trabalho). Um deslocamento de ca. 1,2 nm foi observado quando o antígeno p185 foi adsorvido na superfície, em relação a superfície contendo apenas o anticorpo biotinizado. Um deslocamento extra de 1,3 nm, em relação à amostra contendo o antígeno (2,5 nm em relação à superfície contendo o anticorpo biotinizado), foi

observado quando o anticorpo secundário se ligou ao antígeno anteriormente imobilizado.

O deslocamento obtido para o AC 2 em relação ao p185 foi semelhante ao deslocamento obtido para p185 em relação ao AC 1 (1,3 nm e 1,2 nm). Porém o AC 2 é uma molécula bem mais volumosa que o p185 e por isso deveria causar um deslocamento mais intenso na banda de transmissão, mas isso não foi observado. Para explicar este fato, devemos lembrar que os SPPs são confinados na superfície do metal e tem amplitude do campo eletromagnético decaindo exponencialmente à medida que se distancia da interface metal/dielétrico.²⁴ Como as moléculas de AC 2 estão relativamente mais distantes que as moléculas de p185 da interface, elas estão em uma região de menor intensidade do campo dos SPPs e, portanto de menor sensibilidade. Por isso, apesar de mais volumosas, as moléculas de AC 2 quando adsorvidas na superfície do sensor apresentam um deslocamento semelhante ao das moléculas de p185.

O modo de detecção sanduíche promoveu uma melhor sensibilidade à presença de biomoléculas na superfície do arranjo, uma vez que o deslocamento observado para a banda de transmissão em questão, em relação ao anticorpo biotilado, foi duas vezes maior devido ao uso de um anticorpo secundário. Dessa forma foi possível verificar que o sensor baseado em arranjos de nanoburacos estudado neste trabalho foi sensível a presença do biomarcador do câncer de mama em baixa concentração (30 ng/mL). Com pacientes com câncer de mama com HER-2 positivo apresentam concentrações superiores a 20 ng/mL da proteína HER-2 no plasma sanguíneo¹⁴⁸, podemos destacar que o biossensor estudado neste trabalho apresenta grande potencial na detecção do câncer de mama.

5. Conclusões

Foi possível mostrar que a periodicidade exerce influência sobre o espectro da luz transmitida, observando um deslocamento para o vermelho das bandas à medida que há um aumento na periodicidade das nanoestruturas e é possível ajustar as condições de ressonância alterando esse parâmetro. Em ambos os casos, entre as duas bandas observadas nos espectros de transmissão das amostras estudadas, a banda situada em maiores comprimentos de onda se mostrou mais sensível à mudança de periodicidade e este fato é mais relevante para os substratos contendo os arranjos de nanoburacos, onde o deslocamento da banda mais sensível é duas vezes maior que a banda situada em menores comprimentos de onda.

Notou-se também que a maior sensibilidade para os arranjos de nanoburacos (462,7 nm/UIR) para a banda 2 do arranjo com periodicidade de 455 nm, é maior do que a máxima sensibilidade obtida para as grades de relevo (198,1 nm/UIR para a banda 2 da grade com periodicidade de 400 nm). Contudo as grades de relevo são substratos mais simples de serem fabricados e por isso podem ser usados como alternativa para substratos plasmônicos de baixo custo. A banda situada em maiores comprimentos de onda é mais sensível para ambos os substratos do que a banda localizada na região de menores comprimentos de onda.

Conclui-se ainda que ambos os substratos (nanoburacos e SGRs) se mostraram sensíveis quanto a presença de biomoléculas imobilizadas na superfície das nanoestruturas. Este fato, somado à capacidade de integração com o sistema microfluídico (no caso das amostras contendo arranjos de nanoburacos), torna os substratos com grande potencial para aplicação como biossensores que monitoram

eventos de ligação entre moléculas que apresentam bioafinidade, por exemplo, a interação anticorpo-antígeno usada para a detecção precoce de câncer.

As amostras contendo o arranjo de nanoburacos se mostraram sensíveis a presença do antígeno p185 no modo de detecção sanduíche, que é uma proteína usada como biomarcador de câncer de mama agressivo. Essa proteína foi detectada em uma concentração de 30 ng/mL, concentração próxima aquelas encontradas em pacientes com carcinoma de mama. Por esse motivo, um sensor baseado em arranjo de nanoburacos periodicamente ordenados feitos em filme de ouro tem grande potencial para aplicação na detecção precoce de câncer de mama, uma vez que é possível promover estudos de otimização da periodicidade do arranjo de forma a produzir nanoestruturas com maior sensibilidade e obter menores limites de detecção.

7. Referências Bibliográficas

-
- [1] Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional do Câncer – Rio de Janeiro, *INCA*, **2009**.
- [2] Global Cancer, Facts and Figures. *American Cancer Society, Inc.*, **2007**.
- [3] Reyes, D.R.; Lossifidis, D.; Auroux, P.A.; Manz, A. *Anal. Chem.* **2003**, 74, 2623-2636.
- [4] Situma, C.; Hashimoto, M.; Soper, S.A. *Biomol. Eng.* **2006**, 23, 213-231.
- [5] Gauglitz, G.; In: Baltes, H.; Gopel, W.; Hesse, J. *Sensors Update*, Wiley-VCH: Weinheim, **1996**, pp. 1–45.
- [6] Homola, J.; Yee, S.S.; Gauglitz, G. *Sens. Actuators B* **1999**, 54, 3-15.
- [7] Myszka, D. G. *Journal of Mol. Recogn.* **1999**, 12, 390-408.
- [8] Oh, B.K.; Kim, Y.K.; Lee, W.; Bae, Y.M.; Lee, W.H; Choi, J.W. 2003. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 18, 605-611.
- [9] Jonsson, U.; Fagerstam, L.; Lofas, S.; Stenberg, E.; Karlsson, R.; Frostell, A.; Markey, F.; Schindler, F. *Ann. Biol. Clin.* **1993**, 51, 19-26.
- [10] Mouvet, C.; Harris, R.D.; Maciag, C.; Luff, B.J.; Wilkinson, J.S.; Piehler, J.; Brecht, A.; Gauglitz, G.; Abuknesha, R.; Ismail, G. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 338, 109-117.
- [11] Bier, F.F.; Kleinjung, F.; Scheller, F.W. *Sens. Actuators B* **1997**, 38, 78-82.
- [12] Cooper, M.A.; Try, A.C.; Carroll, J.; Ellar, D.J.; Williams, D.H. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1373, 101-111.
- [13] Brolo, A.G.; Gordon, R.; Leathem, B.; Kavanagh, K.L.J. *Langmuir* **2004**, 20, 4813-4815.
- [14] Green, R.J.; Frazier, R.A.; Shakesheff, K.M.; Davies, M.C.; Roberts, C.J.; Tandler, S.J.B. *Biomaterials* **2000**, 21, 1823-1835.
- [15] Nahalkova, J.; Svitel, J.; Gemeiner, P.; Danielsson, B.; Pribulova, B.; Petrus, L. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, 52, 11-18.
- [16] Van Regenmortel, M.H.V.; Altschuh, D.; Chatellier, J.; Christensen, L.; Rauffer, B.N.; Richalet, S.P.; Witz, J.; Zeder, L.G. *J. Mol. Recogn.* **1998**, 11, 163-167.
- [17] Zako, T.; Harada, K.; Mannen, S.; Yamaguchi, S.; Kitayama, A.; Ueda, H.; Nagamune, T. *J. Biochem.* **2001**, 129, 1-4.

-
- [18] Hide, M.; Tsutsui, T.; Sato, H.; Nishimura, T.; Morimoto, K.; Yamamoto, S.; Yoshizato, K. *Anal. Biochem.* **2002**, 302, 28-37.
- [19] Sakai, G.; Ogata, K.; Uda, T.; Miura, N.; Yamazoe, N. *Sens. Actuators B* **1998**, 49, 5-12.
- [20] Sakai, G.; Nakata, S.; Uda, T.; Miura, N.; Yamazoe, N. *Electrochim. Acta* **1999**, 44, 3849-3854.
- [21] Miura, N.; Sasaki, M.; Gobi, K.V.; Kataoka, C.; Shoyama, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 18, 953-959.
- [22] Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8^a ed., Pioneira Thomson Learning: São Paulo, **2006**, pp. 199-200.
- [23] Ritchie, R. H. *Physical Review* **1957**, 106, 874-881.
- [24] Zayats, A.V.; Smolyaninov, I.I.; Maradudin, A.A. *Physics Reports* **2005**, 408, 131–314.
- [25] Barnes, W. L.; Dereux, A.; Ebbesen, T. W. *Nature* **2003**, 424, 824-830.
- [26] Willets, K.A.; Van Duyne, R.P. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, 58, 267–297.
- [27] Rich, L.R.; Myszka, D. G. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 54-61.
- [28] Steiner, G.; Sablinskas, V.; Hübner, A.; Kuhne, C.; Salzer, R. *Journal of Mol. Struct.* **1999**, 109, 265-273.
- [29] Love, J.C.; Estroff, L.A.; Kriebel, J.K.; Nuzzo, R.G.; Whitesides, G.M. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103–1169.
- [30] Lamprecht, B.; Krenn, J.R.; Schider, G.; Dittbacher, H.; Salerno, M.; Felidj, N.; Leitner, A.; Aussenegg F.R. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 79, 51-53.
- [31] Otto, A. *Phys. Status Solidi* **1967**, 22, 401-&.
- [32] Kretschmann, E.; Kroger, E. *J. Opt. Soc. Am.* **1975**, 65, 150-154.
- [33] Carvalho, R.M.; Rath, S.; Kubota, L.T. *Quím. Nova* **2003**, 26, 98-104.
- [34] Ebbesen, T.W.; Lezec, H.J.; Ghaemi, H.F.; Thio, T.; Wolff, P.A. *Nature* **1998**, 391, 667–669.
- [35] Benabbas, A.; Halté, V.; Bigot, J.-Y. *Opt. Express* **2005**, 13, 8730–8745.
- [36] Cao, H.; Nahata, A. *Opt. Express* **2004**, 12, 1000–1004.
- [37] Kim, J.H.; Moyer, P.J. *Opt. Express* **2006**, 14, 6595–6602.
- [38] Kim, T.J.; Thio, T.; Ebbesen, T.W.; Grupp, D.E.; Lezec, H. *J. Opt. Lett.* **1999**, 24, 256–258.
- [39] Dintinger, J.; Klein, S.; Ebbesen, T.W. *Adv. Mater.* **2006**, 18, 1267–1270.

-
- [40] Lezec, H.J.; Thio, T. *Opt. Express* **2004**, 12, 3629–3651.
- [41] Degiron A.; Ebbesen, T.W. *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* **2005**, 7, S90–S96.
- [42] Dhawan, A.; Gerhold, M.D.; Muth, J.F. *IEEE Sensors Journal* **2008**, 8, 942-950.
- [43] Lesuffleur, A.; Im, H.; Lindquist, N.C.; Lim, K.S.; Oh, S. *Opt. Express* **2008**, 16, 219-224.
- [44] Wyman, G.M. *Chem. Rev.* **1995**, 55, 625-657.
- [45] Dugave, C.D.; Demange, L. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2475-2532.
- [46] Kumar, G.S, Neckers, D.C. *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1915-1925.
- [47] Delaire, J.A.; Nakatani, K. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1817-1845.
- [48] Rochon, P.; Batalla, E.; Natansohn, A. *Appl. Phys. Lett.*, **1995**, 66, 136-138.
- [49] He, J.A.; Bian, S.P.; Li, L.; Kumar, J.; Tripathy, S.K.; Samuelson, L.A. *Appl. Phys. Lett.*, **2000**, 76, 3233-3235.
- [50] Bian, S.; He, J.A.; Li, L.; Kumar, J.; Tripathy, S.K. *Adv. Mat.*, **2000**, 12, 1202-1205.
- [51] Informação pessoal Prof. Paul Rochon (Royal Military College of Canada).
- [52] Shankaran, D.R.; Gobi, K.V.; Miura, N. *Sensors Actuat. B-Chem.* **2007**, 121, 158-177.
- [53] Thomsen, V.; Schatzlein, D.; Mercurio, D. *Spectroscopy* **2003**, 18, 112-114.
- [54] Mullett, W.M.; Lai, E.P.C.; Yeung, J.M. *Methods* **2000**, 22, 77-91.
- [55] Karlsson, R. *J. Mol. Recognit.* **2004**, 17, 151-161.
- [56] Homola, J.; Yee, S.; Myszka, D.; in: Ligler, S.; Taitt, C.A.R. (Eds.) *Surface Plasmon Resonance Biosensors*. Elsevier: The Netherlands, **2002**, pp. 207–251.
- [57] Englebienne, P.; Hoonacker, A.V.; Verhas, M. *Spectroscopy* **2003**, 17, 255-273.
- [58] Homola, J. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Springer: Berlin, **2006**.
- [59] Habauzit, D.; Chopineau, J.; Roig, B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387, 1215-1223.
- [60] Jung, L.S.; Campbell, C.T.; Chinowsky, T.M.; Mar, M.N.; Yee, S.S. *Langmuir* **1998**, 14, 5636-5648.
- [61] Brolo, A.G. *Langmuir* **2004**, 20, 4813-4815.
- [62] Homola, J. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 462-493.
- [63] Seydack, M. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 2454-2469.
- [64] Sanchez-Carbayo, M. *Clin. Chem.* **2006**, 52, 1651-1659.

-
- [65] Soper, S.A.; Brown, K.; Ellington, A.; Frazier, B.; Garcia-Manero, G.; Gau, V.; Gutman, S.I.; Hayes, D.F.; Korte, B.; Landers, J.; Larson, L.D.; Ligler, F.; Majumdar, A.; Mascini, M.; Nolte, D.; Rosenzweig, Z.; Jwang, O.; Wilson, D. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 1932-1942.
- [66] Cao, C.; Kim, J.P.; Kim, B.W.; Chae, H.; Yoon, H.C.; Yang, S.S.; Sim, S.J. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 2106-2113.
- [67] Healy, D.A.; Hayes, C.J.; Leonard, P.; McKenna, L.; O'Kennedy, R. *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 125-131.
- [68] Besselink, G.A.; Kooyman, R.P.; van Os, P.J.; Engbers, G.H.; Schasfoort, R.B. *Anal. Biochem.* **2004**, 333, 165-173.
- [69] Wu, L.P.; Li, Y.F.; Huang, C.Z.; Zhang, Q. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5570-5577.
- [70] Chung, J.W.; Bernhardt, R.; Pyun, J.C. *Sens. Actuators B-Chem.* **2006**, 118, 28-32.
- [71] Tang, D.P.; Yuan, R.; Chai, Y.Q. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2006**, 28, 315-321.
- [72] <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/tumor-markers>
- [73] Ordal, M.A.; Long, L.L.; Bell, R.J.; Bell, S.E.; Bell, R.R.; Alexander, R.W.; Ward, J.; Ward, C.A. *Appl. Opt.* **1983**, 11, 1099-1119.
- [74] Oshannessy, D.J.; Wilchek, M. *Anal. Biochem.* **1990**, 191, 1-8.
- [75] Hermansson, G.T.; Mallia, A.K.; Smith, P.K. *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. Academic Press: Hopeland, **1992**, pp. 226.
- [76] Lofas, S.; Johnsson, B.; Edstrom, A.; Hansson, A.; Lindquist, G.; Hillgren, R.M.M.; Stigh, L. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10, 813-822.
- [77] Johnsson, B.; Lofas, S.; Lindquist, G. *Anal. Biochem.* **1991**, 198, 268-277.
- [78] Sasaki, S.; Nagata, R.; Hock, B.; Karube, I. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 368, 71-76.
- [79] Morgan, H.; Taylor, D.M.; D'Silva, C. *Thin Solid Films* **1992**, 209, 122-126.
- [80] Tomizaki, K.Y.; Usui, K.; Mihara, H. *ChemBioChem* **2005**, 6, 783-799.
- [81] Dunne, L.; Daly, S.; Baxter, A.; Haughey, S.; O'Kennedy, R. *Spectrosc. Lett.* **2005**, 38, 229-245.
- [82] Scholler, N.; Garvik, B.; Quarles, T.; Jiang, S.; Urban, N. *J. Immunol. Methods* **2006**, 317, 132-143.
- [83] Rojo, N.; Ercilla, G.; Haro, I. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, 4, 291-298.
- [84] Wittekindt, C.; Fleckenstein, B.; Wiesmuller, K.; Eing, B.R.; Kuhn, J.E. *J. Virol. Methods* **2000**, 87, 133-144.

-
- [85] Vaisocherova, H.; Mrkvova, K.; Piliarik, M.; Jinoch, P.; Steinbachova, M.; Homola, J. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1020-1026.
- [86] Forzani, E.S.; Zhang, H.Q.; Chen, W.; Tao, N.J. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1257-1262.
- [87] Win, M.N.; Klein, J.S.; Smolke, C.D. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5670-5682
- [88] Wang, Z.; Wilkop, T.; Xu, D.; Dong, Y.; Ma, G.; Cheng, Q. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 819-825.
- [89] Jayasena, S.D. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628-1650.
- [90] Zhang, S.G. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 7-8.
- [91] Knoll, W.; Liley, M.; Piscevic, D.; Spinke, J.; Tarlov, M.J. *Adv. Biophys.* **1997**, *34*, 231-251.
- [92] Oshannessy, D.J.; Brighamburke, M.; Peck, K. *Anal. Biochem.* **1992**, *205*, 132-136.
- [93] Joos, T.O.; Schrenk, M.; Hopfl, P.; Kroger, K.; Chowdhury, U.; Stoll, D.; Schorner, D.; Durr, M.; Herick, K.; Rupp, S.; Sohn, K.; Hammerle, H. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2641-2650.
- [94] Calvo, K.R.; Liotta, L.A.; Petricoin, E.F. *Biosci. Rep.* **2005**, *25*, 107-125.
- [95] Figeys, D. *Proteomics* **2002**, *2*, 373-382.
- [96] Blattler, T.M.; Pasche, S.; Textor, M.; Griesser, H.J. *Langmuir* **2006**, *22*, 5760-5769.
- [97] Pasche, S.; De Paul, S.M.; Voros, J.; Spencer, N.D.; Textor, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 9216-9225.
- [98] Pasche, S.; Textor, M.; Meagher, L.; Spencer, N.D.; Griesser, H.J. *Langmuir* **2005**, *21*, 6508-6520.
- [99] Huang, N.P.; Voros, J.; De Paul, S.M.; Textor, M.; Spencer, N.D. *Langmuir* **2002**, *18*, 220-230.
- [100] Marie, R.; Dahlin, A.B.; Tegenfeldt, J.O.; Hook, F. *Biointerphases* **2007**, *2*, 49-55.
- [101] Fei, X.; Guoliang, Z.; Marcus, T.; Wolfgang, K. *Biointerphases* **2006**, *1*, 73-81.
- [102] Gates, B.D.; Xu, Q.B.; Stewart, M.; Ryan, D.; Willson, C.G.; Whitesides, G.M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1171-1196.
- [103] Informações sobre FIB. FEI Company – Tools for Nanotech (Focused ion beam technology, capabilities and applications) www.feicompany.com.

-
- [104] Gamo, K. *Microelectron. Eng.* **1996**, 32, 159-171.
- [105] Morita, T.; Kometani, R.; Watanabe, K.; Kanda, K.; Haruyama, Y.; Hoshino, T.; Kondo, K.; Kaito, T.; Ichihashi, T.; Fujita, J.; Ishida, M.; Ochiai, Y.; Tajima, T.; Matsui, S. *J. Vac. Sci. Technol. B* **2003**, 21, 2737-2741.
- [106] Prewett, P.D.; Gentili, M.; Maggiora, R.; Mastrogiacomo, L.; Watson, J.G.; Turner, G.S.; Brown, G.W.; Plumb, D.; Leonard, Q.; Cerrina, F. *Microelectron. Eng.* **1992**, 17, 249-253.
- [107] Blauner, P.G.; Ro, J.S.; Butt, Y.; Thompson, C.V.; Melngailis, J. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1989**, 129, 483-488.
- [108] Kubena, R.L. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1993**, 279, 567-576.
- [109] Gordon, R.; Sinton, D.; Kavanagh, K.L.; Brolo, A. G. *Accounts of chemical research.* **2008**, 41, 1049-1057.
- [110] Ferreira, J.; Santos, M.J.L.; Rahman, M.M.; Brolo, A.G.; Gordon, R.; Sinton, D.; Girotto, E.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 436-437.
- [111] De Leebeek, A.; Kumar, L. K. S.; de Lange, V.; Sinton, D.; Gordon, R.; Brolo, A. G. *Anal. Chem.*, 4094–4100, 79, 2007.
- [112] Genet, C.; Ebbesen, T.W. *Nature* **2007**, 445, 39-46.
- [113] Gruhlke, R.; Hod, W.; Hall, D. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 2838–2841.
- [114] Bonod, N.; Enoch, S.; Li, L.; Popov, E.; Neviere, M. *Opt. Express* **2003**, 11, 482–490.
- [115] Degiron, A.; Lezec, H.J.; Barnes, W.L.; Ebbesen, T.W. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 81, 4327–4329.
- [116] Martin-Moreno, L.; García-Vidal, F.J.; Lezec, H.J.; Pellerin, K.M.; Thio, T.; Pendry, J.B.; Ebbesen, T.W. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 86, 1114–1117.
- [117] Bethe, H.A. *Phys. Rev.* **1944**, 66, 163–182.
- [118] Roberts, A. *J. Opt. Soc. Am. A* **1987**, 4, 1970–1983.
- [119] Popov, E.; Bonod, N.; Neviere, M.; Rigneault, H.; Lenne, P.F.; Chaumet, P. *Appl. Opt.* **2005**, 44, 2332–2337.
- [120] Degiron, A.; Lezec, H.J.; Yamamoto, N.; Ebbesen, T.W. *Opt. Commun.* **2004**, 239, 61–66.
- [121] Canpean, V.; Astilean, S. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B-Beam interactions with materials and atoms* **2009**, 267, 397-399.

-
- [122] Barrett, C.J.; Natansohn, A.L.; Rochon, P.L. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 8836-8842.
- [123] Rochon, P.; Batalla, E.; Natansohn, A. *Appl. Phys. Lett.* **1995**, 66, 136-138.
- [124] Hu, C.; Liu, D. *Modern Applied Science* **2010**, 4, 8-13.
- [125] Anderson, J.R., Chiu, D.T., Jackman, R.J., Cherniavskaya, O., McDonald, J.C., Wu, H., Whitesides, S.H., Whitesides, G.M. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3158–3164.
- [126] Duffy, D.C.; McDonald, J.C.; Schueller, O.J. A.; Whitesides, G.M. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4974–4984.
- [127] Duffy, D.C.; Schueller, O.J.A.; Brittain, S.T.; Whitesides, G.M.J. *Micromech. Microeng.* **1999**, 9, 211–217.
- [128] McDonald, J.C.; Whitesides, G.M. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 491–499.
- [129] Sia, S.K.; Whitesides, G.M. *Electrophoresis* **2003**, 24, 3563–3576.
- [130] Ghaemi, H.F.; Thio, T.; Grupp, D.E.; Ebbesen, T.W.; Lezec, H. *J. Phys. Rev. B.* **1998**, 58, 6779-6782.
- [131] Pang, L.; Hwang, G.M.; Slutsky, B.; Fainman, Y. *Applied Physics Letters.* **2007**, 91, 123112.
- [132] Leebeeck, A.D.; Kumar, L.K.S.; Lange, V.; Sinton, D.; Gordon, R.; Brolo, A.G. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4094-4100.
- [133] Homola, J.; Yee, S.S.; Gauglitz, G. *Sensor Actuat. B-Chem.* **1999**, 54, 3–15.
- [134] Gordon, R.; Sinton, D.; Kavanagh, K.L.; Brolo A.G. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1049-1057.
- [135] Brolo, A.G.; Gordon, R.; Leathem, B.; Kavanagh, K.L. *Langmuir* **2004**, 20, 4813-4815.
- [136] Singh, B.K.; Hillier, A.C. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 3803–3810.
- [137] Novotny, L.; Hecht, B. *Principles of nano-optics*, first ed., Cambridge: New York, **2006**.
- [138] Karyakin, A.A.; Presnova, G.V.; Rubtsova, M.Y.; Egorov, A.M. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3805-3811.
- [139] Gyurcsanyi, R.E.; Pretsch, T.V.E. *Chem. Commun.* **2003**, 20, 2560-2561.
- [140] Johnsson, B.; Lofas, S.; Lindquist, G. *Anal. Biochem.* **1991**, 198, 268–277.
- [141] Mansour, O.A.; Zekri, A.R.; Harvey, J.; Teramoto, Y.; ElAhmady, O. *Anticancer Res.* **1997**, 17, 3101-3105.
- [142] Hynes, N.E.; Stern, D.F. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1198, 165-184.

-
- [143] Gullick, W.J.; Berger, M.S.; Bennett, P.L.; Rothbard, J.B.; Waterfield, M.D. *Int. J. Cancer* **1987**, 40, 246-254.
- [144] Suzuki, T.; Tazawa, C.; Miura, H.; Nakabayashi, M.; Moriya, T.; Sasano, H. *Acta Histochem. Cytochem.* **2003**, 36, 1-7.
- [145] Lohrisch, C.; Piccart, M. *Clin. Breast Cancer* **2001**, 2, 129-135.
- [146] Marx, D.; Fattahi-Meibodi, A.; Kudelka, R.; Uebel, T.; Kuhn, W.; Meden, H. *Anticancer Res.* **1998**, 18, 2891-2894.
- [147] Edwards, J.; Mukherjee, R.; Munro, A.F.; Wells, A.C.; Almushatat, A.; Bartlett, J.M S. *Eur. J. Cancer* **2004**, 40, 50-55.
- [148] Pereira, D.A.; Matos, C.S.; Areias, V.R.; Santos, M.M.; Azevedo, C.M.; Alves, G. Detecção da proteína HER-2 na saliva de pessoas com risco de câncer de mama. INCA.