

Biosensores: Tecnologia e Aplicações

Cleumar S. Moreira¹, Antonio M.N. Lima², H. Neff^{2,3}, Arlindo G. Barreto Neto^{2,4}, Fernanda C. C. L. Loureiro², Carlos A. De Souza Filho^{2,5} e Luis H. C. Lima Junior^{1,2}

¹Instituto Federal de Alagoas, Coordenadoria de Eletrônica, Maceió, AL, E-mail: cleumar@gmail.com

²Universidade Federal de Campina Grande, Departamento de Engenharia Elétrica Campina Grande, PB

³LINCS / CETENE, Recife, PE

⁴Instituto Federal da Paraíba, Coordenadoria de Eletrotécnica, Cajazeiras, PB

⁵Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB

Resumo

Biosensores são ferramentas analíticas que utilizam um elemento bioativo e um transdutor para a detecção/quantificação de substâncias bioquímicas nas mais variadas aplicações. Neste trabalho são evidenciados as classificações, características básicas e diferenças com métodos analíticos convencionais. Biosensores baseados no princípio de ressonância de plásmos de superfície (SPR) serão detalhados em sua operação, funcionamento, componentes e aplicações. Exemplos de biosensores SPR serão apresentados, assim como perspectivas futuras desses dispositivos.

1. INTRODUÇÃO

Métodos analíticos para identificação e determinação quantitativa e qualitativa de compostos bioquímicos são utilizados nas mais variadas aplicações, tais como no diagnóstico de doenças provocadas por vírus e bactérias, na detecção de patógenos em bebidas lácteas, na detecção de substâncias químicas para os sistemas de defesa e segurança e no monitoramento do meio ambiente. Os métodos analíticos convencionais (gravimetria, titulometria, espectroscopias de massa e Raman, interferometria, fotometria, refratometria) são bastante precisos e muito utilizados [1]. Todavia apresentam, normalmente, as seguintes desvantagens inerentes à análise bioquímica: a realização é feita em laboratório e a análise, desde a coleta da amostra até a divulgação do resultado, tem a duração de dias; o processo completo da análise é geralmente muito oneroso, requerendo profissionais experientes e qualificados para a operação, manutenção e análise dos resultados.

Os métodos baseados nos imunoenaios são métodos normalmente utilizados para a detecção / quantificação de patógenos em alimentos, doenças provocadas por vírus e bactérias e poluentes na água destinada ao consumo. O imunoenai é um método de diagnóstico que utiliza a capacidade de um anticorpo ligar-se química e especificamente a uma única molécula ou um grupo muito limitado de moléculas, que é denominada de antígeno.

Num imunoenai, a ligação antígeno-anticorpo, altamente específica e sensível, é utilizada para a detecção de proteínas, vírus, bactérias entre outras substâncias que estão presentes em uma amostra fluídica, que pode ser sangue, saliva, solução aquosa, entre outras. Neste sentido, o anticorpo ou antígeno do vírus, bactéria, etc., é imobilizado e o antígeno ou o anticorpo a ser detectado é imerso ou entra em contato e uma ligação não-covalente ocorre. Para identificação e quantificação da substância em análise (analito), normalmente é associado um marcador fosforescente, luminescente, radioativo, enzimático, molecular e nano-particular, que se liga a um substrato e geralmente uma mudança físico-química é observada, como a alteração da cor. Utilizando esse procedimento, a presença ou não do analito e a quantidade (massa ou concentração) da mesma pode ser medida [2,3].

A principal etapa na realização de um imunoenai corresponde à **funcionalização da superfície**, na qual sobre uma superfície plástica ou vítrea, os anticorpos de detecção ou captura são imobilizados. Tal imobilização envolve, normalmente, etapas anteriores de limpeza da superfície, imobilização dos anticorpos, e retirada de excesso de material de captura. Isso se realiza usando

processos de lavagem com soluções aquosas adequadas para a determinada aplicação. Nessa etapa também pode ser realizada a captura do antígeno na solução analítica.

Vários métodos e técnicas de diagnóstico são baseadas nos procedimentos dos imunoenaios. Entre eles, o teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), ou simplesmente ELISA, é o método tradicional de diagnóstico e o mais preciso e sensível [4]. A simplicidade, a especificidade e a sensibilidade associadas ao processo de ligar uma enzima a um anticorpo de detecção e produzir uma reação colorida na solução, tem levado, ao longo dos anos, o ELISA a ser amplamente explorado para as mais variadas aplicações [4]. Apesar dessas vantagens, algumas restrições são associadas ao ELISA:

- O tempo de diagnóstico é alto (em torno de dias, desde a coleta da amostra), requerendo múltiplas etapas de lavagem e incubação;
- A superfície do poliestireno não é homogênea e as proteínas podem ter ligações diferentes em poços do mesmo prato;
- A presença de materiais contaminantes na amostra pode levar a erros no sistema de detecção;
- Há a necessidade de se ter um equipamento (espectrômetro, fluorímetro, entre outros) para quantificar o patógeno detectado limita sua utilização para aplicações portáteis e *online*, além de ter um custo relativamente alto;
- Os marcadores modificam a medida precisa das constantes cinéticas, como o equilíbrio químico e interferem nas ligações ou outras interações moleculares. Podem, inclusive, ser tóxicas para as células (células tronco ou primárias, por exemplo), além de promover reações cruzadas de anticorpos;
- Para medidas repetitivas, como as necessárias para a detecção de certos patógenos, os poços podem ser deteriorados ou mesmo as substâncias em análise podem sofrer alterações. Neste caso, faz-se recorrência a utilização de vários kits para uma mesma medição, o que encarece o custo final.

Métodos sem marcadores, como os biosensores, vem sendo pesquisados e utilizados para aplicações de detecção rápida. Os próximos itens apresentarão os fundamentos teóricos dos biosensores e, especialmente, aqueles baseados no princípio de ressonância de plásmons de superfície ou SPR (*Surface Plasmon Resonance*). Além disso, serão apresentados os biosensores SPR utilizados no Laboratório de Biosensores da Universidade Federal de Campina Grande.

2. BIOSENSORES

Os biosensores são dispositivos analíticos, sem marcadores, que integram uma biocamada, um transdutor elétrico, elementos de condicionamento e processamento do sinal elétrico. O objetivo de um biosensor é produzir um sinal elétrico que é proporcional em magnitude ou frequência à concentração do analito.

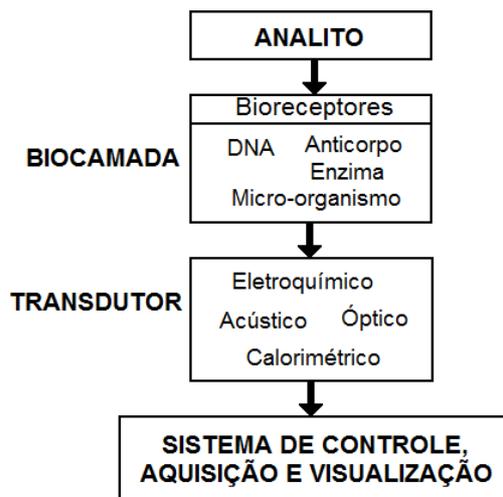


Figura 1 – Diagrama de blocos de um biosensor

O diagrama de blocos de um biosensor é ilustrado na Figura 1. A biocamada, que inclui o elemento bioreceptor, é imobilizada no substrato do biosensor. Os bioreceptores podem ser: enzimas, micróbios, organelas, células de animais ou plantas, tecidos de plantas ou animais, anticorpos, receptores, ácidos nucleicos, DNA, entre outras substâncias [5,6].

O analito, contido na amostra fluídica (gás ou líquido) ou sólida (filme fino, por exemplo), ao entrar em contato com o bioreceptor, imobilizado na superfície do biosensor, produz uma mudança físico-química (variação de calor, índice de refração, resistência, capacitância, etc.) que pode ser identificada por um transdutor elétrico. O sinal elétrico resultante é então adquirido e processado. O sistema de aquisição, processamento e visualização dos dados informa ao usuário se o analito foi ou não detectado e também informa a quantidade de analito na amostra.

Vários estudos e aplicações foram realizados desde o primeiro biosensor proposto em 1962. No ano de 2007, foram investidos 10,7 bilhões de dólares na pesquisa e desenvolvimento de biosensores para várias aplicações (biodefesa, pesquisa médica e biofarmacêutica, monitoramento ambiental e alimentos e bebidas) [5,6]. Um crescimento anual no mercado de biosensores é estimado para 10,4%. Tal popularidade deve-se às características vantajosas desses dispositivos analíticos, ou seja: menor tempo de processamento e análise da amostra (de minutos a horas) e um ônus menor, além da possibilidade de integração em um único encapsulamento e de análise em tempo real e no local de medição [6].

2.1. Tipos de Biosensores

Os biosensores podem ser classificados de acordo com a biocamada e o transdutor utilizado. No tocante à biocamada, os biosensores podem ser classificados em [5,6]:

- Biosensores enzimáticos: usam enzimas como elementos bioreceptores, como é o caso da oxidase de glicose utilizada na medição de glicose no sangue. Além do uso de oxidase de glicose, várias outras enzimas são utilizadas na construção de biosensores, tais como a urase, a penicilinase e a dehidrogenase de álcool;

- **Imunobiosensores:** são biosensores que monitoram as interações do par anticorpo-antígeno, nas quais o anticorpo ou o antígeno são imobilizados na superfície. Os imunobiosensores podem facilitar a regeneração do componente imobilizado, maximizando, assim, o uso do reagente, que no caso dos dispositivos convencionais pode ser utilizado apenas uma única vez. A sensibilidade de um imunobiossensor depende da afinidade e da especificidade da ligação e do ruído do sistema transdutor. Entre os analitos que podem ser investigados pelos imunobiosensores estão os hormônios (esteroides e hormônios pituitários), drogas, vírus, bactérias e poluentes ambientais (pesticidas, por exemplo);
- **Biosensores celulares:** Estes biosensores utilizam microorganismos, especialmente, para o monitoramento ambiental de poluentes. As células são incorporadas à superfície de um eletrodo, sendo o princípio de operação muito semelhante aos biosensores enzimáticos, contudo apresentam custo reduzido, maior atividade catalítica e estabilidade.
Já conforme o transdutor, os biosensores podem ser classificados em [5,6]:
- **Biosensores eletroquímicos:** Os biosensores eletroquímicos consistem de dois componentes - um elemento biológico que reconhece o analito alvo e o transdutor (eletrodo) que "traduz" o evento de bio-reconhecimento em um sinal elétrico útil. Os biosensores eletroquímicos podem ser de três tipos: potenciométrico, amperométrico e condutométrico;
- **Biosensores ópticos:** são biosensores que se baseiam em mudanças nas propriedades ópticas das substâncias, com o fito de monitorar a concentração do analito. Entre as propriedades ópticas que podem ser utilizadas estão: absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência, refletividade e comprimento de onda. Entre as vantagens desses biosensores estão o seu tamanho reduzido, a velocidade de resposta, a facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético, boa biocompatibilidade e não-necessidade de elementos ativos na biocamada;
- **Biosensores acústicos:** são baseados na propriedade da piezo-eletricidade que os cristais anisotrópicos (quartzo, por exemplo) possuem. Quando é aplicada uma tensão alternada a este biossensor, o cristal oscila com uma determinada frequência, sendo tal frequência associada à massa e às constantes elásticas do cristal. O mais antigo e conhecido biossensor acústico é a Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM - *Quartz-Crystal Microbalance*), que é utilizada em várias aplicações e é também facilmente integrável;
- **Biosensores calorimétricos:** usam o calor gerado por reações catalisadoras de enzimas exotérmicas para medir a concentração do analito. As mudanças de temperatura são geralmente determinadas por termistores de alta sensibilidade;

Entre os biosensores existentes, há os biosensores ópticos baseados no princípio de ressonância de plásmons de superfície ou, simplesmente, SPR (*Surface Plasmon Resonance*). Eles destacam-se na investigação de interações biomoleculares devido, além das características supracitadas para os biosensores, à alta seletividade e sensibilidade e tempo de resposta de análise da amostra em poucos minutos.

3. BIOSENSORES SPR

Um diagrama básico de um biosensor SPR é apresentado na Figura 2. A integração do elemento de acoplamento (substrato óptico) e o filme fino metálico formam o biochip. Adicionado a estes, há os elementos de geração e detecção da fonte luminosa p-polarizada, componentes ópticos e sistema de aquisição, processamento e visualização.

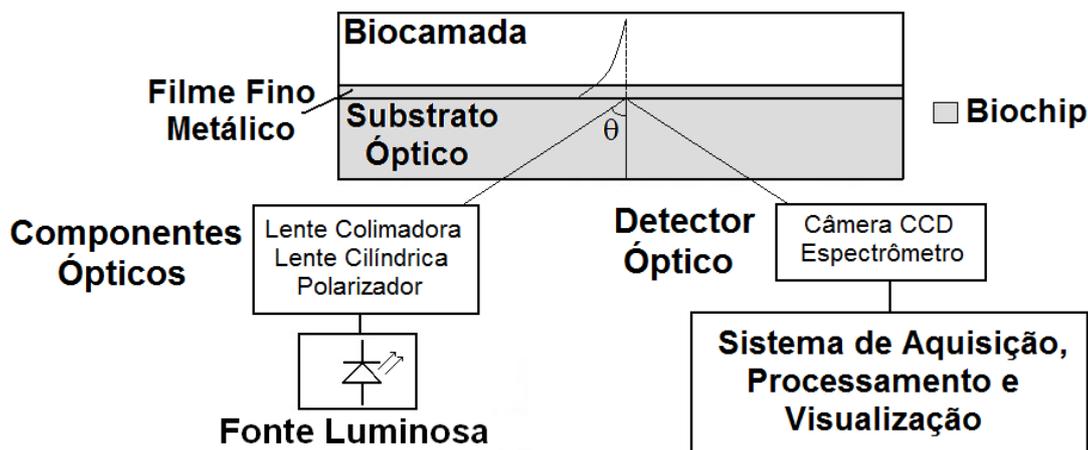


Figura 2 - Diagrama de blocos de um biosensor SPR, onde o biochip é formado pelo substrato óptico e o filme fino metálico

O conhecimento do princípio SPR surgiu com os experimentos de R. W. Wood em 1902 [7]. Ele observou numa grátula de difração que, ao incidir luz branca, para certos ângulos de incidência, algumas bandas ou faixas escuras eram detectadas, e a magnitude da refletância correspondente era reduzida. Wood denominou o fenômeno como "anomalias".

Apenas em 1968 foi demonstrado que a redução da refletância, para uma interface metal-dielétrico, era devida à interação entre os fótons incidentes e as oscilações longitudinais existentes na superfície do metal, que foram denominadas de plásmons de superfície [7]. O fenômeno decorrente da interação entre os fótons incidentes e os plásmons de superfície foi denominado de ressonância de plásmons de superfície ou SPR.

A estrutura proposta por Otto [8] consistia de três camadas assim organizadas: um prisma óptico para acoplamento da luz; um dielétrico (ar); e o filme metálico.

No mesmo ano da descoberta de Otto, Kretschmann e Raether apresentaram uma configuração modificada, em que as camadas do dielétrico e do metal foram invertidas, ou seja, sem a presença do "gap" de ar entre o prisma e o metal. Essa nova estrutura foi denominada de estrutura de reflexão total atenuada ou ATR (*Attenuated Total Reflection*) e é a mais utilizada até hoje para aplicações usando o fenômeno SPR [8]. Ambas as proposições de Otto e Kretschmann-Raether utilizam um prisma óptico para acoplar os feixes luminosos de entrada à interface metal-dielétrico.

3.1. Fundamentos do fenômeno SPR

Um feixe luminoso incide no substrato óptico com um ângulo θ (Figura 2), que deve ser maior que o ângulo crítico. Essa condição propicia a ocorrência do fenômeno de reflexão interna total. Numa situação ideal, a energia luminosa incidente deveria ser totalmente refletida. Todavia, conforme foi comprovado por Kretschmann-Raether e Otto, parte ou toda a energia luminosa é absorvida pela interface metal-dielétrico. Nessa situação, o campo elétrico evanescente, E_{ev} , surge e a energia luminosa transmitida interage com as ondas de plásmons de superfície [7]. Essa situação corresponde ao fenômeno SPR e a refletividade (parâmetro que indica a quantidade de luz que é refletida) do feixe luminoso de entrada é reduzida. Em outras palavras, um mínimo (*dip*) de refletividade pode ser observado no detector óptico. Nesta condição ocorre a ressonância dos plásmons de superfície.

Na ocorrência do fenômeno SPR, os feixes luminosos de entrada devem ser p-polarizados. Neste caso, a polarização ocorre paralela ao plano de incidência e há componentes horizontal e vertical [7,8]. Além disso, a espessura do filme fino de ouro deve ser muito menor que o comprimento de onda da luz incidente.

Não é possível excitar os plásmons de superfície incidindo os feixes luminosos diretamente na superfície do filme metálico, devido à não coincidência entre os vetores de onda dos fótons e dos plásmons de superfície [8]. Portanto, um substrato óptico é inserido para aumentar a magnitude do vetor de onda e assim propiciar a igualdade dos vetores de onda de ambas as partículas. Fibra óptica, guia de onda, prisma óptico e grátula de difração são as alternativas mais utilizadas na literatura como substrato óptico [7,9];

Um biosensor SPR pode ser operado com fontes de luz de entrada monocromáticas ou policromáticas. Há dois modos de interrogação que são mais utilizados nas aplicações [7]:

- Modo de interrogação angular ou AIM (*Angular Interrogation Mode*): neste caso, a fonte luminosa é monocromática (diodo laser, normalmente) e um elemento foto-detector ou uma câmera CCD detectam o sinal refletido na saída do dispositivo. Aqui, o comprimento de onda do feixe de luz de entrada é mantido constante e o ângulo de incidência é variado. Geralmente, goniômetros e estruturas mecânicas rotativas são utilizadas para variar o ângulo de incidência;
- Modo de interrogação espectral ou WIM (*Wavelength Interrogation Mode*): neste caso, a fonte de entrada é policromática (fonte halógena ou um diodo de luz branca, normalmente) e um espectrômetro detecta o sinal refletido. O comprimento de onda é variado e o ângulo de incidência é mantido constante.

A penetração das ondas de plásmons de superfície excitadas é limitada a centenas de nanômetros, conforme o comprimento de onda da onda luminosa incidente [8]. Assim, modificações nas propriedades físico-químicas do dielétrico alteram a quantidade de energia luminosa incidente que é absorvida ou transmitida. Essa alta sensibilidade superficial é um dos grandes atrativos do fenômeno SPR, especialmente para aplicações biológicas [7,9].

3.2. Operação de um biosensor SPR

A operação de um biosensor é semelhante a de um imunoenensaio. A primeira etapa corresponde à funcionalização da superfície metálica. Trata-se de uma nanocamada de 2 a 5 nm, normalmente, que funciona como uma "cola" em que o bioreceptor fica "grudado", ou melhor adsorvido. O elemento de funcionalização da superfície metálica será diferente conforme o bioreceptor e o analito. Exemplos de elementos de funcionalização são a albumina de soro bovino ou BSA (*Bovin Serum Albumin*), albumina de soro humano ou HSA (*Human Serum Albumin*), alkythiol, entre outros [9].

Após a funcionalização da superfície, há a circulação do analito pelo microcanal. Isso altera o índice de refração do dielétrico em contato com o filme fino metálico, o que é facilmente registrado pelo detector óptico devido à redução da intensidade luminosa da imagem refletida na saída do dispositivo num determinado pixel (esse pixel é associado a um comprimento de onda ou ângulo para os modos WIM ou AIM, respectivamente).

A intensidade luminosa do sinal refletido (resposta SPR) no detector óptico representa o dado bruto (*raw data*), ou seja, no qual vários efeitos, relacionados normalmente à fonte luminosa e ao detector óptico, modificam a forma de onda desse sinal. Neste caso, a reconstrução do sinal SPR é necessária e isso ocorre através de um processo denominado normalização. Inicialmente, cada espectro do sinal é subtraído da corrente escura (*dark current*), que é uma corrente elétrica que circula pelo detector óptico na ausência de feixe luminoso na entrada do biosensor SPR. Após, um sinal de referência é coletado e armazenado, que é a chamada célula seca ou *dry cell*. O dielétrico, neste caso, é o ar. Estratégias para usar a célula seca com feixes p-polarizados ou s-polarizados de entrada são normalmente relatados na literatura [7,9].

Após essas etapas iniciais, a solução contendo o analito circula pelo microcanal e a normalização do sinal SPR é completada dividindo-se o espectro resultante da circulação desse analito com o espectro de referência armazenado. A partir dos espectros normalizados, o valor do ângulo ou comprimento de onda de ressonância e, conseqüentemente, as variações de índice de refração, de concentração ou outros parâmetros necessários da amostra em análise podem ser computadas pelo elemento de processamento e controle.

As variações do sinal SPR (comprimento de onda ou ângulo de ressonância), índice de refração ou concentração, ao longo do tempo produzem gráficos denominados sensorgramas.

As variações do índice de refração podem ser associadas à variação da concentração do dielétrico adsorvido na superfície metálica, ΔC , através da seguinte relação [7]:

$$\Delta n_s = \frac{dn_s/dc}{\Delta C} \quad (1)$$

onde dn_s/dc é o incremento do índice de refração do dielétrico por volume.

A variação da temperatura ambiente afeta sobremaneira a sensibilidade e o desempenho de biosensores SPR, conforme foi evidenciado em estudos teóricos e experimentais recentes [10-12]. Além disso, uma outra limitação dos biosensores

SPR é a adsorção não-específica [7]. Para ambos os casos, muita pesquisa tem vem sendo desenvolvida no intuito de reduzir seus efeitos na operação e desempenho de um biosensor SPR [7,9,12].

4. BIOSENSORES SPR DISPONIVEIS NO LABORATORIO DE BIOSENSORES DA UFCG

O Laboratório de Biosensores (LBIO) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) vem desenvolvendo pesquisa na área de Biosensores SPR desde o ano de 2005. Atualmente, o LBIO realiza pesquisas com dois biosensores comerciais e vêm desenvolvendo novas propostas de biosensores SPR. Os itens a seguir irão apresentar os biosensores utilizados e aplicações que vem sendo já realizadas.

4.1. Biosensor SPREETA

O biosensor SPREETA é um dispositivo bionalítico comercial que também utiliza a configuração de Kretschmann-Raether. Ele foi proposto em 1996 pela Texas Instruments. Nele, os componentes eletro-ópticos são encapsulados em um único invólucro, conforme é mostrado na Figura 3. O encapsulamento é feito de material óptico, o que providencia proteção para os componentes e condições propicias para a construção da camada SPR, espelhos e arranjos ópticos existentes. A camada sensora é formada pela deposição de filme fino de ouro de 50 nm [13].

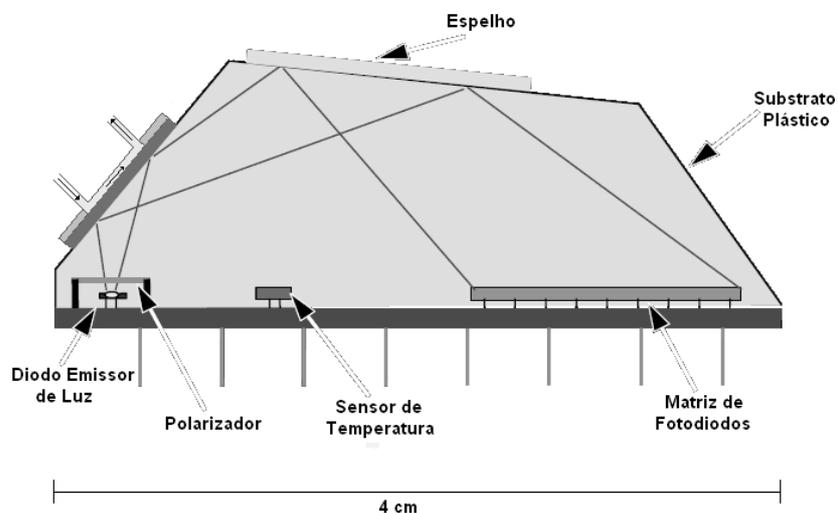


Figura 3 - Estrutura do biosensor SPREETA.

Atualmente, a empresa Sensata fabrica e comercializa os biosensores SPREETA. Possui um menor volume e custo por biochip (em torno de U\$ 100) em relação ao biochip (sensor CM5) do sistema BIACORE (em torno de U\$ 200), que é o mais utilizado biosensor SPR [7]. Todavia, sua utilização ainda é bem menor que o da BIACORE. Além disso, a variação da temperatura ambiente afeta todos os elementos internos do SPREETA e a posição e a geometria dos componentes, o

que pode alterar a posição de ressonância e, conseqüentemente, o desempenho do biosensor.

4.2. Biosensor VIR

Em 2003, a empresa dinamarquesa VIR propôs um biosensor SPR que operava no modo de interrogação angular e usava um substrato óptico fabricado com o polímero TOPAS COC. Esse biosensor dispensava o uso de sistemas mecânicos rotativos ou goniômetros para rotação da fonte luminosa ou do biosensor, como é normalmente utilizado por biosensores que usam o modo AIM [7]. Além disso, não foi utilizado óleo ou gel para fixação da camada metálica no substrato óptico [9], o que evitava serviços de manutenção constantes. Essa característica associada à fabricação em massa e de baixo custo, propiciada pelo processo de moldagem por injeção, tornou este biosensor a primeira tentativa de um dispositivo SPR descartável e adequado para aplicações de testes laboratoriais remotos [14-16].

O biosensor VIR usa acoplamento óptico para os feixes luminosos de entrada. Esses feixes atingem a superfície do biochip perpendicularmente, devido à presença de elementos de acoplamento ópticos difrativos ou DOCE (*Diffractive Optical Coupling Elements*), cujas dimensões são nanométricas e utilizam técnicas holográficas em sua construção sobre a camada metálica (Figura 4). Eles possibilitam que os raios luminosos de entrada sejam refletidos em várias direções, o que aumenta a probabilidade do acoplamento fóton-plásmon na região sensível do biochip.

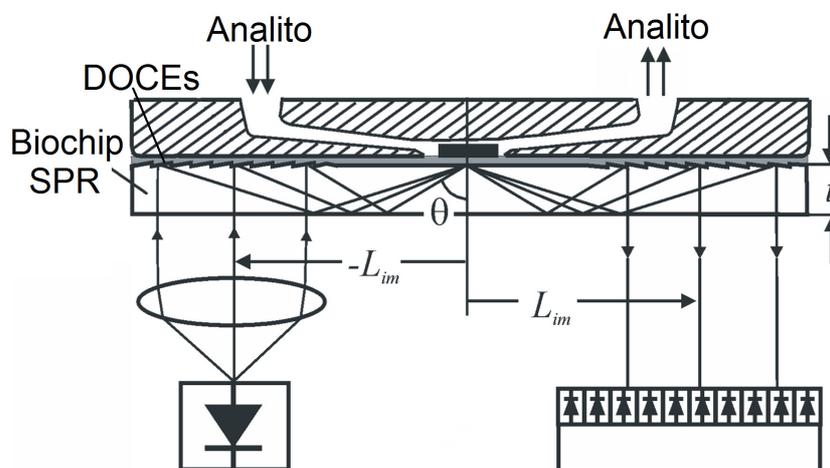


Figura 4 – Estrutura do biosensor SPR VIR

Embora possua vantagens em relação a outros biosensores propostos na literatura, a fabricação dos elementos DOCE requer um aparato de nano-tecnologia holográfica complexa para a produção do molde inicial. Apenas um biosensor foi construído. Esse biosensor foi doado ao laboratório de Biosensores da UFCG, juntamente com componentes que permitiram a construção de outro biosensor, o CAMBIO.

4.3. Biosensor CAMBIO

Usando componentes utilizados no biosensor VIR, o sistema CAMBIO foi proposto. Ele foi construído numa estrutura modular de alumínio que é a base para a fixação dos componentes óticos e eletrônicos necessários para excitação do efeito SPR e aquisição do sinal de imagem, além do biochip e da célula de fluxo que integram a configuração ilustrada na Figura 5 [17].

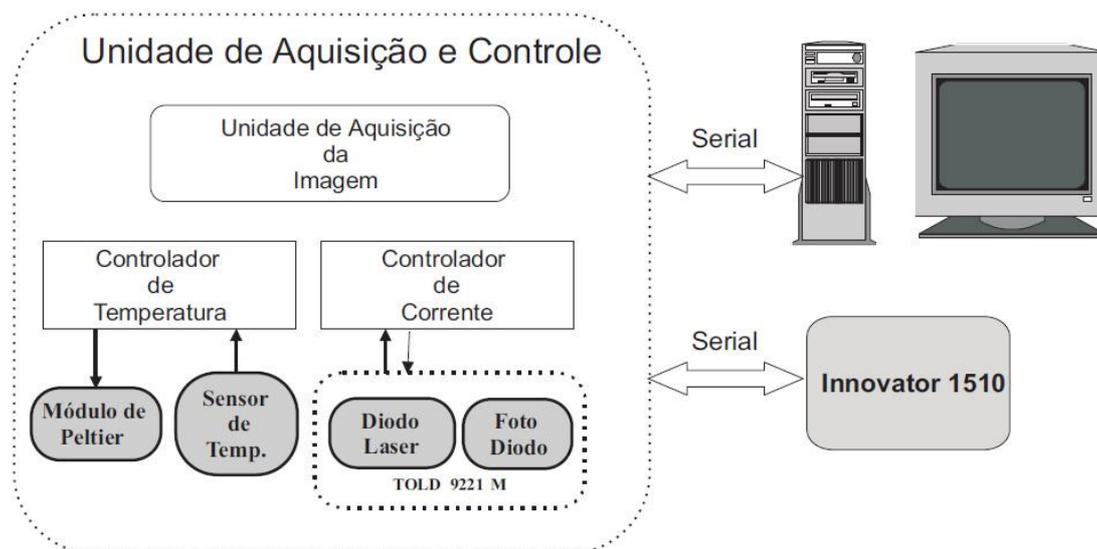


Fig. 5 – Estrutura do biosensor CAMBIO

Para compor a arquitetura de *hardware* apresentada foram propostas duas soluções diferentes. A primeira solução utilizou um computador pessoal como Unidade de Processamento. Na segunda solução o PC é substituído pelo *kit Innovator1510*, o que torna o equipamento totalmente portátil. A Unidade de Aquisição e Controle é composta por um controlador de corrente, um controlador de tensão e uma Interface para Câmera. A comunicação, entre a Unidade de Aquisição e Controle e a Unidade de processamento, é feita através da porta serial. O microcontrolador ADuC841 foi escolhido para ser a CPU da Unidade de Aquisição e Controle pela facilidade de manipulação, mas o sistema permite que o DSP contido no OMAP1510 seja utilizado para esta finalidade.

O CAMBIO foi aplicado para detectar as ligações de proteínas de BSA na superfície do bio-filme de ouro, através da análise da morfologia da curva de refletividade ou curva SPR [17,18]. Uma grade de reagentes analíticos e soluções de limpeza foram usadas durante os experimentos. O bloqueador BSA (1% solução, Pierce Ltda.) em PBS foi usado para imobilização a uma velocidade de escoamento de 0,5 ml/min. Para a regeneração da superfície e remoção dos resíduos, foi utilizada uma solução de Hipoclorito de Sódio (NaClO) de concentração 0,1 M. O ensaio completo da imobilização e regeneração da superfície está dividido em 5 etapas :

1. Admissão de água pura para definir as condições iniciais;
2. Admissão de uma solução de proteção com BSA, para imobilização de proteína;

3. Admissão de água pura, para remover frações de BSA fracamente ligadas (reversível);
4. Solução de limpeza NaClO para remover resíduos de ligações irreversíveis de proteínas;
5. Admissão de água pura para regeneração final da superfície

A variação da refletividade normalizada em função do ângulo é mostrado na Figura 6b, juntamente com a curva SPR ilustrando a posição do mínimo de ressonância.

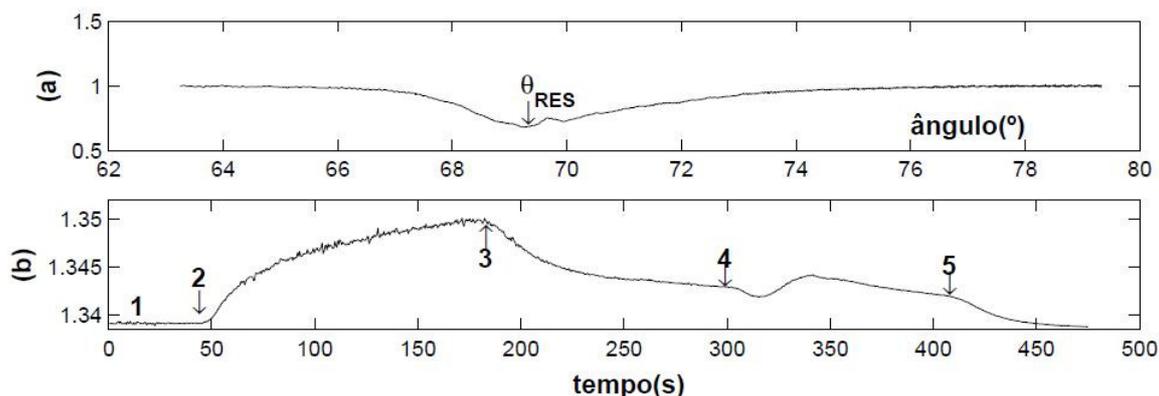


Figura 6 – (a) Curva SPR da imobilização da proteína BSA, mostrando o ângulo de ressonância (θ_{RES}); e (b) a variação do índice de refração no tempo (sensorgrama)

4.4. Biosensor PPBIO

Recentemente foi proposto um biosensor SPR, denominado PPBIO, destinado à detecção rápida e possuindo as características de descartabilidade, baixo custo e aplicado a fontes monocromáticas e policromáticas [19]. As expectativas com esse novo biosensor foram a redução dos custos e uma maior simplicidade de projeto e da fabricação em relação ao biosensor VIR [19].

O PPBIO foi o primeiro biochip SPR de fabricação nacional utilizando prisma óptico como substrato.

O PPBIO usa lentes integradas externas ao substrato óptico, que é um prisma óptico trapezoidal, no modo AIM e pode também ser aplicado ao modo WIM, diferentemente dos biosensores SPREETA, VIR e CAMBIO que operam apenas no modo AIM. Para operação no caso WIM, as lentes cilíndricas externas devem ser removidas e, portanto, feixes colimados atingem a superfície inclinada do prisma óptico.

O prisma óptico trapezoidal (Figura 6) foi fabricado com o polímero COC TOPAS 5013, usando técnicas de moldagem por injeção [20]. Sobre o prisma óptico, uma fina camada de ouro (50 nm de espessura) foi depositada. O TOPAS 5013 possibilita uma melhor adsorção de proteínas e outras moléculas (vírus e bactérias, por exemplo) do que a de outros polímeros [14,19].

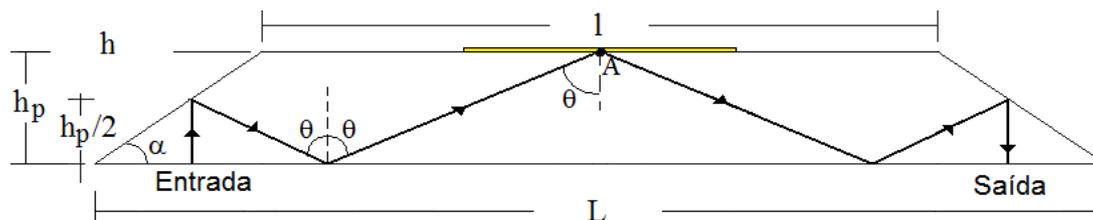


Figura 6 – Estrutura do prisma óptico trapezoidal, que é o substrato óptico do biosensor PPBIO. São mostrados também as dimensões e demais características utilizadas no projeto do prisma.

Dois moldes de materiais diferentes, bronze e aço, foram construídos para a fabricação dos prismas poliméricos SPR. Em ambos os moldes, o ângulo das superfícies inclinadas deveria ser precisamente 34° . Todavia, uma pequena curvatura das bordas, algo normal em injeção de peças desse tipo, pode ocorrer sem prejuízo para a qualidade do prisma. O perfil do molde de bronze apresenta uma cavidade com 10 mm de largura, conforme é ilustrado na Figura 7. O molde de bronze tem um furo para injeção, que é localizado no meio da cavidade. A parte superior da cavidade foi construída de aço e pode ser destacada do molde, o que facilita o polimento e possíveis reparos. As superfícies inclinadas na cavidade não são tão fáceis de serem polidas e são feitas em bronze. A placa de extração que completa o molde, não mostrada na Figura 7, também foi construída de bronze.

Os prismas ópticos fabricados com o molde de bronze têm uma largura de 10 mm. A presença de apenas um furo de injeção produziu acúmulo de material no momento da extração da peça. Isso propiciou a presença de fissuras e bolhas em alguns prismas ópticos fabricados.

O molde de aço (Figura 8) possui três cavidades, com 20 mm de largura cada. O aumento da largura, em relação ao molde de bronze, visou, principalmente, facilitar o acoplamento de uma célula de fluxo à região superior do prisma. Também, o aumento da quantidade de cavidades aumenta a quantidade de peças produzidas por ciclo de injeção. Furos adicionais para retirada do excesso de polímero também foram acrescentadas para cada cavidade, o que auxilia o controle da contração das peças fabricadas.

Um total de 100 prismas foram fabricados com cerca de 300 g de material. A foto desse prisma polido é mostrado na Fig. 18b. Não houve a presença de fissuras nem bolhas na estrutura superficial do prisma. Os prismas fabricados com os moldes de bronze e aço foram submetidos a um pré-tratamento mecânico e químico antes da deposição do filme fino de ouro.

Para a deposição (cobertura) do filme fino metálico no prisma óptico foi utilizado um *sputtering*. Um equipamento de cobertura (*sputtering*) foi utilizado para a deposição de 50 nm de ouro sobre os prismas ópticos fabricados.

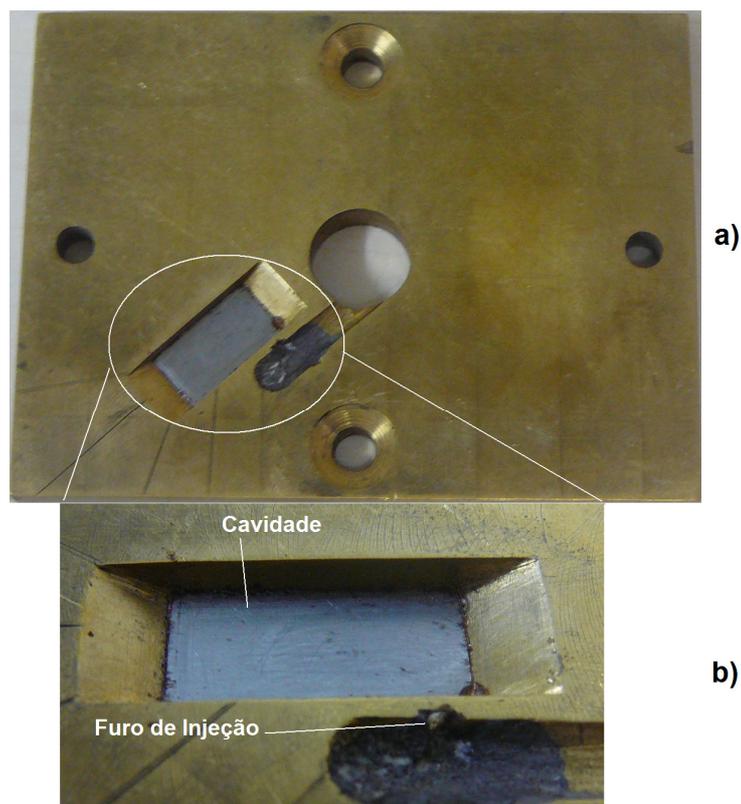


Fig. 7 – (a) Molde de bronze com um ponto de injeção; (b) Ampliação da cavidade evidenciando o ponto de injeção.

Os testes com os biochips ópticos produzidos com ambos os moldes foram realizados com substâncias não-biológicas. Os objetivos nesses testes preliminares foi observar a ocorrência do fenômeno SPR e verificar se a mudança do analito provocava a alteração do mínimo de refletividade, ou seja, o deslocamento da posição de ressonância dos plásmons de superfície.

Portanto, uma gota de água destilada foi depositada sobre o filme fino de ouro usando um dosador manual. A gota de água foi posicionada na região central do prisma. Os resultados de refletividade obtidos com os feixes p-polarizados e s-polarizados são apresentados na Figura 10a. Confirmou-se por este experimento que não ocorre ressonância para feixes com polarização **s**, e sim apenas quando os feixes luminosos possuem polarização tipo **p** [7,8].

Utilizando esse mesmo prisma, água destilada e soluções aquosas de etanol a 10 % e 0,2 M (molar) de hidróxido de sódio (NaOH) foram testadas. Usando a mesma referência, gotas dessas substâncias foram depositadas na camada sensível e os resultados são apresentados na Figura 10b. Percebe-se claramente que há o deslocamento da posição de ressonância com a mudança do analito, conforme esperado.

O custo total estimado de fabricação e materiais dos biochips SPR fabricados é aproximadamente de U\$ 1,00. Aqui é considerado o custo do processo de injeção e o de deposição do filme fino de ouro. Esse valor é inferior ao estimado para o biosensor VIR que é em torno de U\$ 2,45. Comparativamente, o sensor SPREETA apresenta um valor comercial de U\$ 100,00. É claro que nesse sensor estão

inclusos os elementos ópticos de acoplamento, o diodo laser e a matriz CCD. Já o elemento sensor da BIACORE, o custo é em torno de U\$ 142,00 [20].

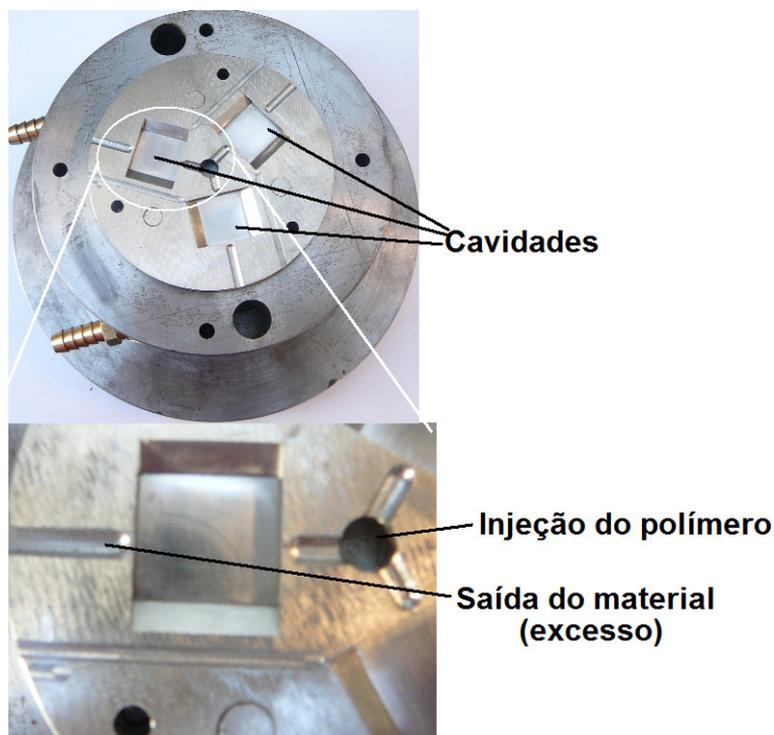


Figura 8 – Bloco de aço da parte extratora, onde são apresentadas as três cavidades e os pontos de injeção e retirada de excesso do polímero e ampliação de uma cavidade.

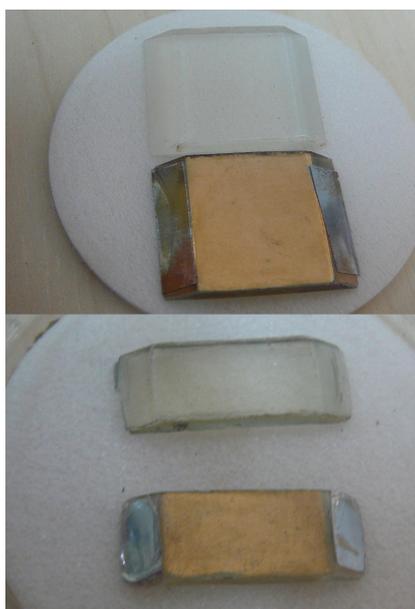


Figura 9 – Fotos dos prismas fabricados com a (a) matriz de bronze e a de (b) aço.

Nos resultados dos testes apresentados não foram utilizados quaisquer métodos de otimização, como controle/regulação ou minimização das limitações operacionais presentes em um biosensor SPR (ver Capítulo 2). Conforme supracitado, o objetivo aqui foi apenas verificar a excitação dos plásmons de superfície para os valores de projeto de ambos os modos de interrogação e verificar o efeito da variação do índice de refração do analito ao desempenho do sistema. Neste sentido, as curvas SPR obtidas confirmam que o prisma óptico de baixo custo, descartável e com fabricação nacional é adequado para aplicações de diagnóstico [21-23].

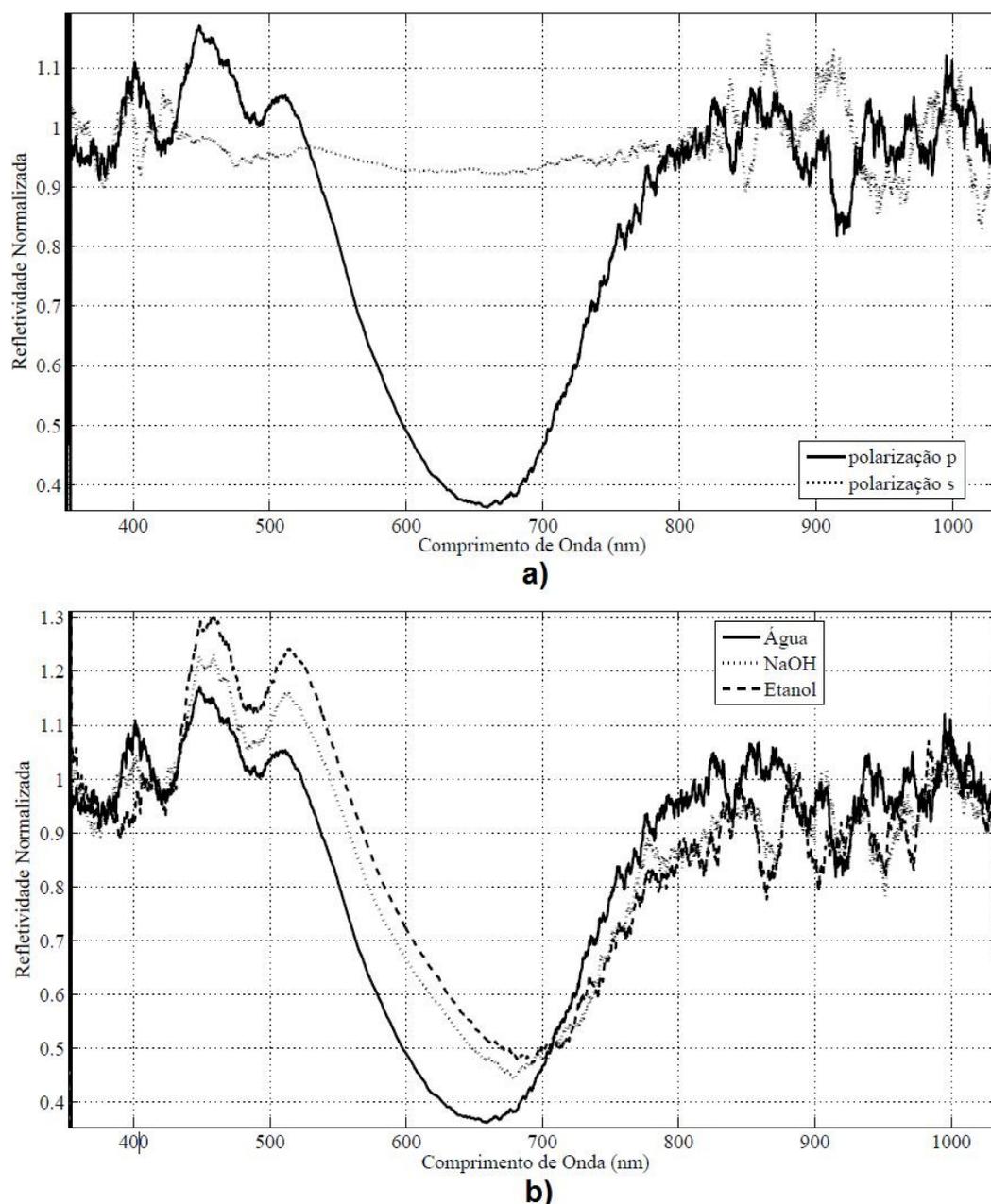


Figura 10 – Resultados para um prisma SPR (a) submetido as polarizações tipo **p** e tipo **s** e (b) utilizando diferentes analitos (água destilada, NaOH e Etanol)

5. CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou um resumo das principais características dos biosensores, que são ferramentas analíticas importantes e muito pesquisadas e utilizadas atualmente nas mais diversas aplicações. Isso deriva de suas características vantajosas face aos métodos convencionais laboratoriais, ou seja: menor tempo de análise (minutos a horas), possibilidade de miniaturização e aplicação *on-line* e no campo de medição, portabilidade, menor custo operacional, de projeto e ao consumidor final.

A pesquisa em Biosensores é multidisciplinar e, portanto, para o desenvolvimento de uma determinada aplicação, profissionais da área de Engenharia Elétrica, Química, Física e Biologia são necessários. Todavia, é um campo de pesquisa relativamente novo e com grandes prospecções, especialmente como tentativa de substituição na análise e monitoramento de analitos em aplicações que são questões de saúde pública, como é o caso da detecção rápida de vírus e bactérias, como a Dengue, a AIDS, entre outros, e o monitoramento da água destinada ao consumo.

A busca de métodos que sejam de baixo custo, descartáveis, portáteis e com aplicação *on-line* e no campo é interesse de muitos pesquisadores em vários países. Algumas das tentativas foram apresentadas neste trabalho com os biosensores VIR, CAMBIO e PPBIO, que foram desenvolvidos com a participação de pesquisadores do Laboratório de Biosensores da UFCG. O PPBIO é o primeiro biochip, com tecnologia nacional, usando o princípio SPR e um prisma óptico.

O Laboratório de Biosensores da UFCG vem desenvolvendo, afóra o desenvolvimento de dispositivos ópticos baseados no princípio SPR, aplicações para medição da difusidade em sistemas microcluídicos, aplicações biológicas e outras [24-28]

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Doglas A Skoog, F James Holler e Timothy A Nieman. Principios de Análise Instrumental, Bookman, Porto Alegre, 2002.
- [2] Claire L Morgan, David J Newman e Christopher P Price. Immunosensors: Technology and Opportunities in Laboratory Medicine, Clinical Chemistry, vol. 42, pp. 193-209, 1996.
- [3] Brian T Cunningham. Label-free biosensors: an introduction, Cambridge University Press, vol. 5, 2008.
- [4] Rudolf M Lequin. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Clinical Chemistry, vol. 51, pp. 2415-2418m 2005.
- [5] Bansi D Malhotra e Anthony P F Turner. Advances in Biosensors, Elsevier Science, vol. 5, 2003.
- [6] Hideaki Nakamura e Isao Karube. Current research activity in Biosensors, Anal. Bional. Chem. vol. 377, pp. 446-468, 2003.
- [7] Jiri Homola. Surface Plasmon Resonance Based Sensors, Springer, 2006.
- [8] Heinz Raether. Surface Plasmons: on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings. Springer Tracts in Modern Physics 111, 1988.
- [9] R B M Schasfoort e Anna J Tudos. Handbook of surface plasmon resonance, RCS Publishing, 2008.

- [10] C S Moreira, A M N Lima e H Neff. Influence of temperature effects on sensitivity of surface plasmon resonance sensors, Instrumentation and Measurement Technology Conference Proceedings, pp. 170-175, 2008.
- [11] C S Moreira, A M N Lima e H Neff. Sistema Reconfigurável para Monitoramento de Temperatura Baseado na Ressonância de Plásmons de Superfície, Congresso Brasileiro de Automática, 2008.
- [12] C S Moreira, A M N Lima, H Neff e C Thirstrup. Temperature dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold-water interface, Sensors and Actuators B, vol. 134, pp. 854-862, 2008.
- [13] Jose Melendez, Richard Carr, Dwigth U Bartholomew, Kari Kukanskis, Jerry Elkind, Sinclair Yee, Clement Furlong e Rick Woodbury. A Commercial Solution for Surface Plasmon Sensing", Sensors and Actuators B, vol. 35-36, pp. 212-216, 1996.
- [14] C Thirstrup, W Zong, M Borre, H Neff, H C Pedersen e G Holzhueter. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors, Sensors and Actuators B, vol. 100, pp. 298-308, 2004.
- [15] H Neff, W Zong, A M N Lima, M Borre e G Holzhueter. Optical properties and instrumental performance of thin gold films near the surface plasmon resonance, Thin Solid Films, vol. 21, pp. 1745-1752, 2005.
- [16] H Neff, T Beeby, A M N Lima, M Borre, C Thirstrup, W Zong e L A L Almeida. dc-Sheet resistance as sensitive monitoring tool of protein immobilization on thin metal films, Biosensors and Bioelectronics, vol. 21, 2006.
- [17] Carlos A Souza Filho. Desenvolvimento de um Sistema Eletrônico de Aquisição e Processamento para Biosensores, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, 2006.
- [18] Carlos A Souza Filho, Antonio M N Lima, Cleumar S Moreira, Carsten Thirstrup e Helmut Neff. Line Shape Analysis and Extended Instrumental Operation of Surface Plasmon Resonance Sensors, Plasmonics, vol. 17, pp. 16505-16517, 2010.
- [19] Carsten Thirstrup, Weiyong Zong e Helmut Neff. Surface plasmon resonance sensor, Patent Application Publication, vol. 0018194 A1, 2005.
- [20] Cleumar S Moreira. Projeto e realização de um biochip óptico baseado no princípio de ressonância de plásmons de superfície para aplicações biológicas, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Campina Grande, 2010.
- [21] C S Moreira, A G S Barreto Junior, A M N Lima, C Thirstrup e H Neff. Exchangeable Low Cost Polymer Biosensor Chip for Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, EUROSENSORS 2009, Procedia Chemistry, vol. 1, 2009.
- [22] Cleumar S Moreira, Antonio M N Lima, Carsten Thirstrup e Helmut Neff. A disposable, low cost prism-based surface plasmon resonance (SPR) biosensor, World Congress on Biosensors 2010: Biosensors 2010, 2010.
- [23] A G S Barreto Neto, C S Moreira, F C C L Loureiro, A M N Lima e H Neff. Studying molecular diffusivity by using SPR spectrometry: experiment and simulations, First Bio-sensing Technology Conference, 2009.
- [24] C S Moreira, A G S Barreto Junior, A M N Lima e H Neff. A surface plasmon resonance biosensor platform using a microcontroller-drive autosampler, VIII Semetro, 2009.
- [25] C S Moreira, A G S Barreto Junior, A M N Lima e H Neff. A low-cost autosampler for surface plasmon resonance biosensor platforms, XIX IMEKO World Congress Fundamental and Applied Metrology, 2009.
- [26] C S Moreira, A G S Barreto Junior, A M N Lima, C Thirstrup e H Neff. Molecular Transport and Mutual Diffusion Measurement Method in a Micro-Fluidic System, Based on Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, EUROSENSORS 2009, Procedia Chemistry, 2009.

- [27] H Neff, A M N Lima, F C C L Loureiro e L A L de Almeida. Transient response analysis and modeling of near wall flow conditions in a micro channel: evidence of slip flow, *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 3, pp. 591-602, 2007.
- [28] Fernanda C C L Loureiro, Arlingo G S Barreto Neto, Cleumar S Moreira, Antonio M N Lima e Helmut Neff. A method for determining the mutual diffusion coefficient of molecular solutes based on surface plasmon resonance spectroscopy, *Sensors and Actuators B, Chemical*, vol. 1, pp. 1-8, 2010.