

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

ESTUDO SOBRE FIBRA ÓPTICA MULTIMODO APLICADA COMO SONDA RAMAN PARA DETECÇÃO DE NAD E R6G

FELIPE D. LIMA¹, WALTER J. SALCEDO², FILIPE B. MAGALHÃES³

¹ Graduando em Engenharia de Controle e Automação, Bolsista PIBIC (Graduação) - IFSP/CNPq, Câmpus Cubatão, diniz.lima@aluno.ifsp.edu.br

² Professor Doutor da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. wsalcedo@lme.usp.br

³ Professor Doutor do IFSP campus Cubatão, setor: Eng. de Controle e Automação. filipe.magalhaesx@ifsp.edu.br.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 3.04.02.05-0 Sistemas Eletrônicos de Medida e de Controle.

RESUMO:

Este estudo explora a aplicação de fibras ópticas como sensores do tipo sonda Raman para a detecção das moléculas NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e R6G (Rodamina 6G). A NAD é crucial em sistemas biológicos, participando de reações redox essenciais para a produção de energia celular. A Rodamina 6G, por sua vez, é um corante fluorescente amplamente utilizado em espectroscopia Raman devido à sua intensa dispersão Raman. Inicialmente, as fibras com moléculas de teste depositadas foram analisadas pelo espectrômetro Raman, focalizando o laser na seção transversal oposta à seção com a molécula de teste. Posteriormente, as fibras foram reposicionadas com o laser diretamente focalizado na seção transversal com a molécula de teste depositada. O estudo demonstra o potencial das fibras ópticas como sensores Raman, destacando desafios e oportunidades no desenvolvimento de biossensores avançados.

PALAVRAS-CHAVE: Espectroscopia Raman; Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD); Rodamina 6G; Biossensor; Sonda de Fibra Óptica.

STUDY ON MULTIMODE OPTICAL FIBER APPLIED AS A RAMAN PROBE FOR DETECTION OF NAD AND R6G

ABSTRACT: This study explores the application of optical fibers as Raman probe-type sensors for the detection of NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) and R6G (Rhodamine 6G) molecules. NAD is crucial in biological systems, participating in essential redox reactions for cellular energy production. Rhodamine 6G, in turn, is a fluorescent dye widely used in Raman spectroscopy due to its intense Raman scattering. Initially, the fibers with deposited test molecules were analyzed by the Raman spectrometer, focusing the laser on the cross-section opposite to the section with the test molecule. Subsequently, the fibers were repositioned with the laser directly focused on the cross-section with the deposited test molecule. The study demonstrates the potential of optical fibers as Raman sensors, highlighting challenges and opportunities in the development of advanced biosensors.

KEYWORDS: Raman Spectroscopy; Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD); Rhodamine 6G; Biosensor; Optical Fiber Probe.

INTRODUÇÃO

A molécula NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) é essencial em sistemas biológicos, participando de reações redox vitais para a produção de energia celular e manutenção do metabolismo (POLTRONIERI; ČEREKOVIC, 2018). Sua detecção e quantificação são cruciais para estudos bioquímicos e clínicos (WANG et al., 2016). Paralelamente, a Rodamina 6G é um corante fluorescente amplamente utilizado em espectroscopia Raman devido à sua intensa dispersão Raman, facilitando a identificação de suas características espectrais (KIRUBHA; PALANISAMY, 2014).

A espectroscopia Raman, que fornece um espectro considerado a "impressão digital" de uma molécula, é uma técnica poderosa para a análise molecular detalhada. A aplicação de fibras ópticas como sondas Raman para detecção de moléculas em biossensores oferece uma abordagem inovadora para a detecção remota e sensível de biomoléculas (JIN et al., 2018). Biossensores tipo sonda são especialmente vantajosos em análises *in vivo* em que técnicas pouco invasivas são desejadas. As fibras ópticas podem servir como meio de transporte dos sinais Raman, permitindo a análise de biomoléculas.

Este estudo investiga a eficácia das fibras ópticas como sonda Raman para a detecção de NAD e Rodamina 6G, destacando os desafios enfrentados e as potencialidades dessa tecnologia na melhoria de biossensores avançados.

MATERIAIS E MÉTODOS

As moléculas β -NAD (*beta Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo*) e Rodamina 6G foram fornecidas em forma de pó por Sigma-Adrich®. As soluções foram preparadas com o auxílio de um sistema de ultrapurificação de água *Simplicity* Merck Millipore® e de uma balança de precisão Marte AU@220D®. Um espectrômetro Raman Renishaw InVia-2000® foi utilizado para coletar os espectros das amostras, com laser de excitação de $\lambda = 785 \text{ nm}$ e lente objetiva com aumento de 50x e abertura numérica (N.A.) de 0,75. No início de cada ensaio, o espectrômetro Raman foi devidamente calibrado com uma lâmina de silício usando como referência o fônon óptico do silício, em 520 cm^{-1} . Essa linha Raman característica é resultante da vibração dos átomos de silício no cristal.

A molécula NAD foi diluída em concentração de 10^{-3} mol/L em solução aquosa contendo 0,1 mol/L de KCl por meio da conhecida equação (1).

$$m = C * M_m * V \quad (1)$$

em que,

m - massa do soluto, g;

C - concentração desejada, mol/L;

M_m - massa molar do soluto, g/mol.

V - volume da solução, L.

Como substrato para a deposição das moléculas de teste, foram utilizados segmentos de fibra multimodo com núcleo de sílica fundida e diâmetro de 1 mm. Essas fibras foram fornecidas pela New Port Company ®.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As fibras ópticas foram clivadas e as secções transversais foram cuidadosamente polidas (Fig. 1). As áreas de secção transversal foram desengorduradas com acetona a 55 °C por 90 minutos, seguidas de imersão em recipiente com isopropanol preaquecido a 80 °C por 10 minutos, em seguida a secções transversais foram secas com jato de N₂.

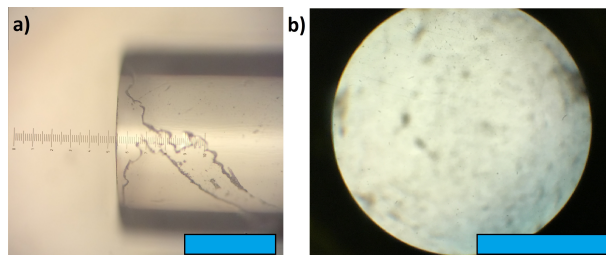


Figura 1: Imagem de microscópio da secção transversal da fibra ótica multimodo após clivagem e polimento em vista lateral (a) e vista frontal (b). Em ambas as figuras a barra de escala corresponde a 500 μm .

Após o processo de desengorduramento, a secção transversal de um dos segmentos foi mergulhada na solução de NAD e a de outro segmento na solução de Rodamina 6G, ambos permanecendo imersos por 24 horas. Em seguida, as fibras foram retiradas das respectivas soluções e as secções foram secas com jato de N₂. Assim, apenas uma fina camada de moléculas de teste permaneceu adsorvida nas áreas de secção transversal do núcleo.

As fibras com moléculas de teste depositadas foram levadas ao espectrômetro Raman. Para avaliar a aplicação da fibra como um sensor do tipo sonda, inicialmente a objetiva focalizou o laser na secção transversal oposta à seção onde a molécula NAD havia sido depositada. O objetivo foi excitar a fibra com o laser por uma extremidade para obter o espectro Raman da molécula depositada na outra extremidade. Assim, obtiveram-se espectros com potências de 70 μW , 7 mW, 35 mW e 70 mW, como mostra a Figura 2.

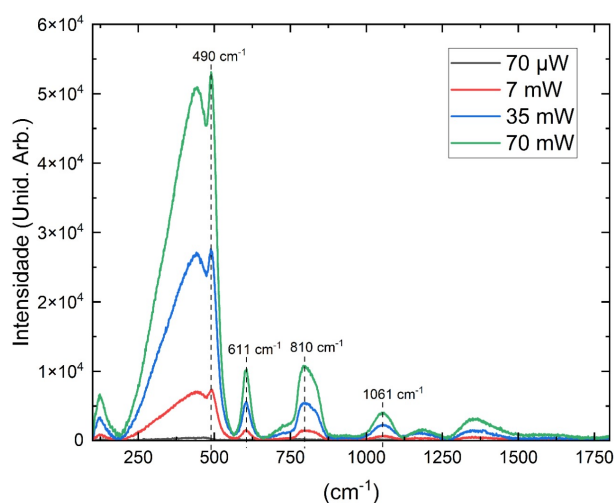


Figura 2: Espectros Raman em diferentes potências de excitação com laser focalizado na extremidade oposta a das moléculas depositadas.

Os picos em torno de 490 cm^{-1} e 611 cm^{-1} são conhecidos como linhas D1 e D2 e são atribuídos aos

anéis de quatro e três membros, respectivamente (GALEENER, 1982; PASQUARELLO; CAR, 1998). A banda em torno de 810 cm^{-1} está relacionada aos modos tipo *bending* da ligação Si-O-Si. Hass, M. propôs que a banda em 1061 cm^{-1} seja atribuída a uma vibração do tipo *stretching* de uma ligação química (HASS, 1970). Este perfil espectral corresponde ao núcleo de sílica fundida e, acima do nível de ruído, não há linhas referentes à NAD. O espectro Raman da fibra com Rodamina 6G depositada apresentou um perfil semelhante. Estes resultados mostram que a aplicação de fibra ótica como sensor do tipo sonda Raman para NAD e Rodamina 6G ainda é algo desafiador.

Posteriormente, o segmento de fibra ótica com NAD depositada foi reposicionado no espectrômetro Raman de modo que a lente objetiva focalizasse o laser diretamente sobre a área de secção transversal com a molécula de teste depositada. Assim, obteve-se o espectro mostrado na Figura 3.

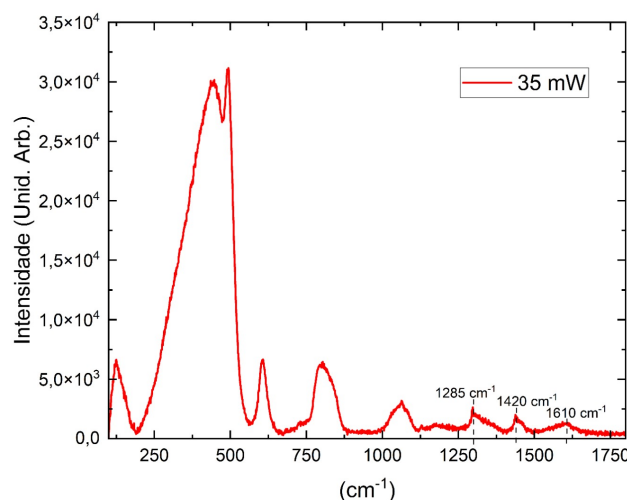


Figura 3: Espectros Raman de NAD depositada na secção da fibra ótica.

Note que, desta vez, as linhas Raman da NAD aparecem no espectro entre 1250 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} . A linha em 1285 cm^{-1} corresponde ao anel de adenina (XIAO; MARKWELL, 1997). A linha em 1420 cm^{-1} corresponde à contribuição de 50% do anel de adenina com pequena influência de ribose, mais 50% do grupo nicotinamida (XIAO; MARKWELL, 1997; YUE et al., 1986). A linha em 1610 cm^{-1} é atribuída ao anel de nicotinamida (XIAO; MARKWELL, 1997; XIAO et al., 1998). Ao comparar-se os espectros das Figuras 2 e 3, nota-se que estas linhas não correspondem ao núcleo da fibra, mas sim à molécula NAD.

O segmento de fibra ótica com a molécula de Rodamina 6G também foi reposicionado no espectrômetro Raman de modo que a objetiva focalizasse o laser diretamente na secção transversal com Rodamina depositada (Fig. 4).

Nota-se a presença de linhas atribuídas à Rodamina 6G na faixa entre 600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} . As intensas linhas entre 1314 cm^{-1} e 1651 cm^{-1} são atribuídas a uma vibração *stretching* da ligação aromática C-C. A linha em 774 cm^{-1} é uma vibração em modo *bend* da ligação C-H e a linha em 614 cm^{-1} é atribuída à ligação C-C-C *bend* (VOSGRÖNE; MEIXNER, 2005).

Fibras óticas com nanocilindros de ouro na área de secção transversal fabricadas em trabalhos anteriores também foram testadas para intensificar o espalhamento Raman, mas não houve intensificação relevante para estas moléculas. Outros experimentos estão em andamento para investigar outras geometrias de nanoestruturas capazes de intensificar o espalhamento Raman em amostras com substrato

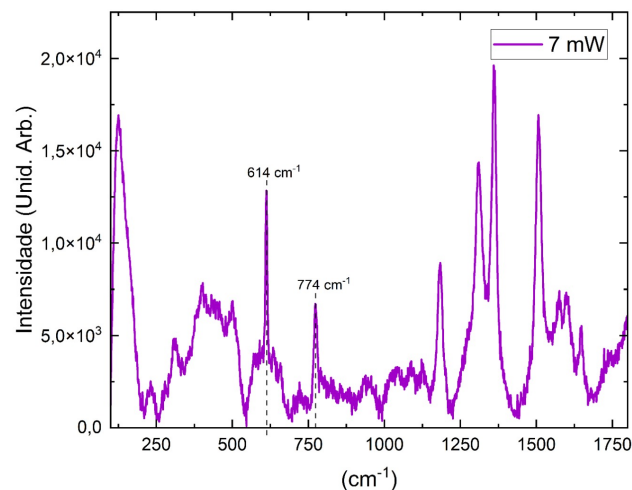


Figura 4: Espectros Raman de R6G depositada na secção da fibra óptica.

de fibra óptica.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, a aplicação de fibras ópticas como sensores do tipo sonda Raman para a detecção de moléculas como NAD e Rodamina 6G mostrou-se desafiadora. Quando o laser foi focalizado na secção transversal oposta à secção com as moléculas de teste depositadas, o espectro Raman obtido foi dominado pelas características da matriz de sílica da fibra, sem apresentar linhas referentes às moléculas de teste acima do nível de ruído. Isso sugere que a excitação por uma extremidade da fibra não foi eficaz para detectar as moléculas na outra extremidade devido à interferência do núcleo de sílica. Uma possível solução seria estudar novos materiais de fibra com baixo espalhamento Raman na faixa espectral de espalhamento da molécula de teste.

No entanto, ao reposicionar a fibra de modo que o laser fosse focalizado diretamente na secção com as moléculas de teste depositadas, as características Raman das moléculas NAD e Rodamina 6G foram claramente detectáveis. As linhas Raman específicas para NAD e Rodamina 6G, localizadas entre 1250 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} , foram observadas, confirmando a presença das moléculas na fibra. Esses resultados indicam que, embora a detecção remota através da fibra como guia de onda seja difícil, a técnica pode ser viável com aplicação de nanopartículas que intensifiquem o espalhamento Raman destas moléculas, mostrando um caminho promissor para o desenvolvimento de sensores Raman baseados em fibra óptica.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

F.D.L. contribuiu com a pesquisa e redação do manuscrito. W.J.S. contribuiu com a análise de dados e disponibilização de ferramentas. F. B. M. contribuiu com a administração do projeto, supervisão, redação - revisão e edição.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo; a Escola Politécnica da USP; o Instituto de Química da USP; e o CNPq por financiarem este projeto, processo em atendimento ao Edital 212/2023 IFSP/CNPq.

REFERÊNCIAS

- GALEENER, F. L. Planar rings in vitreous silica. *Journal of Non-Crystalline Solids*, Elsevier, v. 49, n. 1-3, p. 53–62, 1982.
- HASS, M. Raman spectra of vitreous silica, germania and sodium silicate glasses. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, Elsevier, v. 31, n. 3, p. 415–422, 1970.
- JIN, Z. et al. All-fiber raman biosensor by combining reflection and transmission mode. *IEEE Photonics Technology Letters*, v. 30, n. 4, p. 387–390, 2018.
- KIRUBHA, E.; PALANISAMY, P. Green synthesis, characterization of au–ag core–shell nanoparticles using gripe water and their applications in nonlinear optics and surface enhanced raman studies. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, IOP Publishing, v. 5, n. 4, p. 045006, 2014.
- PASQUARELLO, A.; CAR, R. Identification of raman defect lines as signatures of ring structures in vitreous silica. *Phys. Rev. Lett.*, American Physical Society, v. 80, p. 5145–5147, Jun 1998. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.80.5145>>.
- POLTRONIERI, P.; ČEREKOVIC, N. Roles of nicotinamide adenine dinucleotide (nad⁺) in biological systems. *Challenges*, MDPI, v. 9, n. 1, p. 3, 2018.
- VOSGRÖNE, T.; MEIXNER, A. Surface-and resonance-enhanced micro-raman spectroscopy of xanthene dyes: from the ensemble to single molecules. *ChemPhysChem*, Wiley Online Library, v. 6, n. 1, p. 154–163, 2005.
- WANG, J. et al. Treatment with nad⁺ inhibited experimental autoimmune encephalomyelitis by activating ampk/sirt1 signaling pathway and modulating th1/th17 immune responses in mice. *International immunopharmacology*, Elsevier, v. 39, p. 287–294, 2016.
- XIAO, Y. J. et al. Effects of glutamate dehydrogenase enzyme on the SERS spectra of nicotinamide adenine dinucleotide on a gold electrode. *Langmuir*, American Chemical Society, v. 14, p. 7420–7426, 12 1998. ISSN 07437463.
- XIAO, Y.-J.; MARKWELL, J. Potential dependence of the conformations of nicotinamide adenine dinucleotide on gold electrode determined by FT-Near-IR-SERS. *Langmuir*, ACS Publications, v. 13, n. 26, p. 7068–7074, 1997.
- YUE, K. T. et al. Raman spectroscopy of oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotides. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 25, n. 17, p. 4941–4947, 1986.