



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Engenharia Elétrica e Informática
Coordenação de Pós-Graduação em Ciência da
Computação

Dissertação de Mestrado

**SISTEMA COMPUTACIONAL PARA BIOSSENSOR
BASEADO NA RESSONÂNCIA DE PLASMA DE
SUPERFÍCIE**

Leiva Casemiro Oliveira

Campina Grande, Paraíba, Brasil
©Leiva Casemiro Oliveira, Dezembro de 2011

Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Engenharia Elétrica e Informática
Coordenação de Pós-Graduação em Ciência da Computação

**SISTEMA COMPUTACIONAL PARA BIOSSENSOR BASEADO NA RESSONÂNCIA
DE PLASMA DE SUPERFÍCIE**

Leiva Casemiro Oliveira

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência da Computação da Universidade Federal de Campina Grande - Campus de Campina Grande como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciência da Computação.

Antonio Marcus Nogueira Lima
Elmar Uwe Kurt Melcher
(orientadores)

Campina Grande, Paraíba, Brasil
©Leiva Casemiro Oliveira, Dezembro de 2011





048s

Oliveira, Leiva Casemiro

Sistema computacional para biossensor baseado na ressonancia de plasma de superficie / Leiva Casemiro Oliveira. - Campina Grande, 2011.

131 f. : il.

Dissertacao (Mestrado em Ciencia da Computacao) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Engenharia Eletrica e Informatica.

1. Sistema Computacional 2. Ressonancia de Plasma de Superficies 3. Biossensor 4. Biochip 5. Sistema Embarcado 6. Modo de Interrogacao Angular 7. Modo de Interrogacao Espectral 8. Dissertacao I. Lima, Antonio Marcus Nogueira, Dr. II. Melcher, Elmar Uwe Kurt, Dr. III. Universidade Federal de Campina Grande - Campina Grande (PB) IV. Título

CDU 004.78(043)

**"SISTEMA COMPUTACIONAL PARA BIOSSENSOR BASEADO NA RESSONÂNCIA DE
PLASMA DE SUPERFÍCIE"**

LEIVA CASEMIRO OLIVEIRA

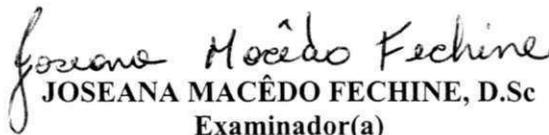
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/12/2011



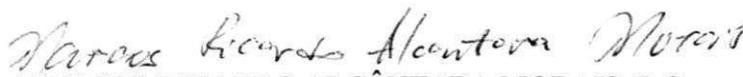
**ELMAR UWE KURT MELCHER, Dr.
Orientador(a)**



**ANTONIO MARCUS NOGUEIRA LIMA, Dr.
Orientador(a)**



**JOSEANA MACÊDO FECHINE, D.Sc
Examinador(a)**



**MARCOS RICARDO ALCÂNTARA MORAIS, D.Sc
Examinador(a)**



**FRANZ HELMUT NEFF, Dr.
Examinador(a)**

CAMPINA GRANDE - PB

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, que me concedeu determinação e força para conseguir esta conquista, mesmo quando parecia estar tentando “abraçar o mundo com as pernas”.

Agradeço aos meus pais por tudo que fizeram por mim. Essa conquista é mais deles do que nunca! E a minha família pelo apoio incondicional.

A minha querida namorada Nívia Bitú pela compreensão e dedicação, fazendo com que a distância fosse amenizada...por seu apoio, carinho, presente em todos os momentos, e é peça fundamental nessa história.

A professora Fernanda Cecília por ter-me feito o convite para trabalhar no Laboratório de Biossensores.

A Cleumar Moreira por sua generosidade ao me receber no laboratório e ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa

Ao professor Helmut Neff por sua ajuda durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Antonio Marcus pelas oportunidades a mim concedidas e orientação em todos os momentos.

Ao professor e orientador Elmar Melcher pela oportunidade e orientação.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Biossensores, aos quais saúdo em nome de Arlindo Garcia, Luiz Hermano, Caio Luiz e Luiz Claver.

Ao técnico do LIEC, Simões, por sua ajuda em todos os momentos.

A todos os amigos que de alguma maneira me apoiaram nessa jornada.

“Podem ter a certeza de que não foi quando descobriu a América, mas sim quando estava a descobri-la, que Colombo se sentiu feliz.”

Fiodor Doistoievski

Resumo

O trabalho apresenta o desenvolvimento de um biossensor baseado na ressonância de plasma de superfície para operar tanto no modo de interrogação angular (AIM) quanto no modo de interrogação espectral (WIM). O sistema usa o *biochip* desenvolvido na Universidade Federal de Campina Grande para compor a superfície sensível sendo o primeiro equipamento a utilizar o primeiro *biochip* óptico construído no Brasil. O biossensor utiliza um minicomputador com arquitetura x86 como Unidade de Aquisição, Controle, Processamento e Exibição (UACPE) da resposta referente à interação biomolecular. As estruturas contendo os elementos ópticos, microfluidicos, mecânicos e eletrônicos para cada modo de operação foram desenvolvidas. O sistema operacional embutido na UACPE foi ajustado para conter apenas as aplicações essenciais, e os softwares embarcados, desenvolvidos para cada estrutura, oferecem recursos de análise e processamento do sinal obtido. A análise morfológica da curva que representa o fenômeno da ressonância de plasma de superfície e as escolhas das técnicas de obtenção dos parâmetros de ressonância, a critério do usuário, atribuem à solução proposta uma ferramenta para o ensino e pesquisa na área. Os testes realizados revelaram a viabilidade de utilização do equipamento para análise de interações biomoleculares nos dois modos de operação.

Palavras-chaves: Ressonância de Plasma de Superfícies, Biossensor, Biochip, Sistema Embarcado, Modo de Interrogação Angular, Modo de Interrogação Espectral.

Abstract

A surface plasmons resonance based biosensor, able to operate both in angular interrogation mode (AIM) and wavelength interrogation mode (WIM), is presented in this work. The proposed system uses biochip development at University Federal of Campina Grande to compose the sensitive surface, being first device that use the first optical biochip built in Brazil. Proposed biosensor uses a x86 architecture minicomputer, which is called Acquisition, Control, Processing, and Display Units (ACPDU) for biomolecular interactions analysis. Optical, microfluidic, mechanics and electronics elements were arranged to compose biosensor structure. ACPDU operating system has been customized to enhance response time. Each structure offer resources for analyzing and processing sign by embedded softwares specific. The morphology analysis of SPR curve combined with user techniques chooser, for resonance parameters get, assign the proposed solution a great tool for teaching and research. The tests confirmed equipment feasibility for biomolecular interactions analysis in both operation modes.

Key-words: Surface Plasmon Resonance, Biosensor, Biochip, Embedded System, Angular Interrogation Mode, Wavelength Interrogation Mode.

Abstract

A surface plasmons resonance based biosensor, able to operate in angular interrogation mode (AIM) and wavelength interrogation mode (WIM) both, is presented in this work. The proposed system uses biochip development at University Federal of Campina Grande to compose the sensitive surface, being first device that use the first optical biochip built in Brazil. Proposed biosensor uses a x86 architecture minicomputer, which is called Acquisition, Control, Processing, and Display Units (ACPDU) for biomolecular interactions analysis. Optical, microfluidic, mechanics and electronics elements were arranged to compose biosensor structure. ACPDU operational system has been customized to enhance response time. Each structure offer resources for analyzing and processing sign by embedded softwares specifics. The morphology analysis of SPR curve combined with user techniques chooser, to get resonance parameters, assign the proposed solution a great tool for teaching and research. The tests confirmed equipment feasibility for biomolecular interactions analysis in both operation modes.

Key-words: Surface Plasmon Resonance, Biosensor, Biochip, Embedded System, Angular Interrogation Mode, Wavelength Interrogation Mode.

Conteúdo

RESUMO

1 Introdução	16
1.1 Objetivos	18
1.1.1 Objetivo Geral.....	18
1.1.1 Objetivos Específicos	18
1.2 Organização do Trabalho	19
2 Biossensores	20
2.1 Introdução	20
2.2 Classificação	23
2.3 Biossensor SPR.....	27
2.3.1 Conceitos Fundamentais.....	28
2.3.2 O fenômeno SPR.....	30
2.3.3 Ocorrência da Ressonância.....	32
2.3.3 Modelo Matemático	33
2.4 Resumo.....	40
3 Simulador SPR	41
3.1 Introdução	41
3.2 Desenvolvimento.....	41
3.2.1 Processamento.....	46
3.3 Metodologia do Trabalho.....	49
4 Sistema computacional para biossensor baseado no fenômeno SPR	53
4.1 Introdução	53
4.2 Componentes do sistema embarcado para o biossensor proposto.....	54
4.2.1 Descrição do Projeto.....	55
4.2.2 Análise de Requisitos Funcionais	57
4.2.2.1 Ações da UACPE	59
4.2.2.2 Ações do Usuário.....	60

4.2.3	Análise de Requisitos não Funcionais	61
4.2.4	Componentes de uma plataforma para biossensor SPR	64
4.2.4.1	Componentes Ópticos.....	67
4.2.4.2	Componentes Microfluídicos.....	70
4.2.4.3	Estrutura física das partes mecânicas do biossensor	73
4.2.4.4	Componentes Eletrônicos.....	75
4.3	Resumo.....	77
5	Construção da Solução	78
5.1	Introdução	78
5.2	Respostas dos Transdutores	78
5.2.1	Espectrômetro.....	78
5.2.1.1	Funcionamento do Hardware.....	81
5.2.2	Câmera CCD	86
5.2.2.1	Funcionamento do Hardware.....	87
5.3	A UACPE.....	89
5.3.1	Sistema Operacional	89
5.3.2	Software Embarcado.....	91
5.3.2.1	Descrição dos menus e botões para o sistema controlador do espectrômetro	93
5.3.2.2	Descrição dos menus e botões para o sistema controlador da câmera CCD	96
5.4	Partes Mecânicas e Ópticas.....	98
5.5	Otimização da resposta do Transdutor.....	98
5.5.1	CCD	100
5.5.1.1	Corrente Escura.....	101
5.5.1.2	Não Uniformidade do sensor	102
5.5.1.3	Shot-Noise.....	103
5.5.1.4	Pré-processamento da imagem e suavização da curva SPR	104
5.6	Resumo.....	106
6	Resultados Experimentais.....	107
6.1	Introdução	107

6.2 Discussões de Resultados.....	107
6.2.1 Ligações reversíveis.....	107
6.2.2 Comparação com o VirTech.....	111
6.2.3 Ligações irreversíveis.....	113
6.2.3.1 Constantes Cinéticas.....	115
6.3 Conclusão.....	118
7 Conclusões e trabalhos Futuros.....	119
Referências.....	121
Apêndice A.....	126
A1 Ajustes do prisma óptico.....	126
A1.1 <i>Annealign</i>	126
A1.2 Camada Metálica.....	127
A2 Ajustes na célula de fluxo.....	129

Lista de Símbolos e Abreviações

θ_{res}	ângulo de ressonância	[°]
λ_{res}	comprimento de onda de ressonância	[nm]
ϵ_{mr}	parte real da permissividade elétrica do condutor	[$F.m^{-1}$]
k_{sp}	vetor de onda dos plasma de superfície	[$rad.m^{-1}$]
k_x	componente x da luz incidente	[$rad.m^{-1}$]
n_i	índice de refração do meio i	[RIU]
AIM	<i>Angular Interrogation Mode</i>	
ANAC	Agência Nacional de Aviação Civil	
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis	
ASIC	Application Specific Integrated Circuit	
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>	
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>	
FPGA	Field Programmable Gate Array	
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde	
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística	
ICG	<i>Integration Clear Gate</i>	
LED	<i>Light Emitting Diode</i>	
LGPL	<i>Lesser General Public License</i>	
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	
PSF	Programa Saúde da Família	
RIU	Unidade de Índice de Refração	
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>	
SPW	<i>Surface Plasmon Wave</i>	
RIT	Reflexão Interna Total	
RIU	<i>Refractive Index Unit</i>	
TTL	<i>Transistor-transistor logic</i>	
UACPE	Unidade de Aquisição Controle Processamento e Exibição	
USB	<i>Universal Serial Bus</i>	
WIM	<i>Wavelength Interrogation Mode</i>	

Lista de Tabelas

- 2.1 Classificação dos biossensores sob diferentes critérios.
- 5.1 Valores experimentais e teóricos para o comprimento de onda e seus pixels correspondentes.
- 5.2 Valores estatísticos da regressão.
- 5.3 Parâmetros para a equação 5.1.
- 5.4 Descrição de todos os pixels operando com o software proprietário.
- 5.5 Descrição dos pacotes referente aos pixels operando manualmente o espectrômetro. Detalhe para o formato de cada pixel.
- 6.1 Quadro comparativo entre os equipamentos utilizados.
- 6.2 Valores calculados para as constantes cinéticas da adsorção da neutravidina.

Lista de figuras

- 2.1 Representação esquemática de um biossensor. O elemento de reconhecimento está integrado ou intimamente associado ao transdutor. Uma unidade é responsável por fornecer os parâmetros de aquisição, fornecidos pelo usuário. Essa unidade apresenta os resultados calculados, em geral, sob a forma de gráficos os quais permitem acompanhar a evolução do evento biológico. O sistema computacional constitui dos elementos que viabilizam o funcionamento do biossensor, formando um equipamento.
- 2.2 Configurações proposta por a) Otto e b) Kretschmann-Raether.
- 2.3 Estrutura de um Biossensor SPR com quatro camadas em que (1) é o meio dispersivo, (2) metal, (3) e (4) representam o analito sob análise. A célula de fluxo conduz o analito por sobre a superfície do metal. Reflexão interna total, com destaque para o campo evanescente gerado na interface entre os meios com diferentes índices de refração, sua componente horizontal (k_x) e a oscilação dos plasmas (k_{sp}).
- 2.4 Traçado de raios (*ray tracing*) de uma onda eletromagnética em um sistema multicamadas.
- 2.5 Curva característica do fenômeno SPR (simulação) – Gráfico intensidade luminosa *versus* ângulo de incidência referente ao modo de interrogação angular (AIM). O valor mínimo da curva representa a ocorrência da ressonância (θ_{RES} para o modo AIM e λ_{RES} para o modo WIM). Para analitos com diferentes índices de refração observam-se diferentes valores no mínimo. Os parâmetros de simulação para (2.10) a (2.14) são: $n_1 = 1.522+0i$; $n_2 = 0.11525+3.88686i$; $n_3 = 1.33+0i$ (curva vermelha); $n_3 = 1.34+0i$ (curva azul); $n_3=1.35+0i$ (verde); $n_4=1.35+0i$; $d_1 = \infty$ (~1cm); $d_2 = 50\text{nm}$; $d_3 = 100\text{nm}$; $d_4 = \infty$; $\lambda = 670\text{nm}$.
- 2.6 Exemplo de um sensorgrama para o ângulo de ressonância ao longo do tempo, a partir da Figura 2.5. O aumento no ângulo de incidência, conseqüentemente do índice de refração, se deve a adsorção do analito de interesse ao elemento bioreceptor. A diminuição ocorre devido a remoção da substância que foi absorvida.
- 3.1 Recorte da página web que contém o Simulador SPR. Destaque para aba “[4]Meio” que fornece as opções de “Número de camadas” e “Meio ambiente”.

- 3.2 Abas do simulador para a) configuração do analito; b) ajustes da camada metálica; c) parâmetros para o meio dispersivo.
- 3.3 Configuração da parte óptica para o modo a) AIM e b) WIM. Os valores obtidos com a simulação são apresentados nas abas “Output - AIM” e “Output - WIM”, respectivamente.
- 3.4 Curvas SPRs simuladas para diferentes substâncias tanto no modo de interrogação a) angular quanto no modo de interrogação b) espectral. Exemplo do posicionamento da linha base (modo WIM).
- 3.5 Polinômio interpolador (linha azul) para os dados reais (linha vermelha) – modo WIM
- 3.6 a) Resposta simulada para o cálculo do índice de refração no modo AIM b) Resposta simulada para o cálculo do índice de refração para biossensor SPR no modo WIM.
- 4.1 Diagrama de blocos de um sistema embarcado.
- 4.2 Diagrama de blocos do sistema embarcado para um biossensor.
- 4.3 Diagrama de blocos expandido do sistema embarcado para um biossensor.
- 4.4 Diagrama de caso de uso do biossensor proposto.
- 4.5 Design de um biossensor. Montagem de Kretschmann-Raether.
- 4.6 Componentes presentes em um Sistema Computacional para biossensor SPR.
- 4.7 Design da disposição dos elementos que excitam o fenômeno SPR no biossensor proposto, retirada de [7]. a) Montagem para o modo de interrogação espectral e b) para o modo de interrogação angular.
- 4.8 Resposta espectral da fonte de luz policromática utilizada no biossensor.
- 4.9 Resposta da fonte de luz monocromática utilizada no biossensor.
- 4.10 a) Seção transversal do prisma óptico e b) vista superior.
- 4.11 Fotografias Prisma óptico.
- 4.12 Célula de fluxo do biossensor.
- 4.13 Exemplo de sistemas automáticos de amostragem a) *autosampler* e b) multiválvula.
- 4.14 Estrutura das pastes mecânicas e outras partes que compõem o sistema embarcado do sistema biossensor proposto - WIM.

- 4.15 Estrutura das pastes mecânicas e outras partes que compõem o sistema embarcado do sistema biossensor proposto - AIM.
- 4.16 Disposição dos elementos que compõem a plataforma para o biossensor proposto. As estruturas essenciais foram apresentadas nas Figuras 4.16 e 4.17.
- 5.1 Gráfico Comprimento de Onda x Pixel.
- 5.2 Etapas para a aquisição do sinal do espectrômetro.
- 5.3 Descrição dos pixels do sensor Toshiba TCD1304AP.
- 5.4 Funcionamento do sensor Toshiba TCD1304AP.
- 5.5 Funcionamento no modo “External Hardware Trigger”.
- 5.6 Funcionamento no modo “External Synchronization Trigger”.
- 5.7 Análise geométrica do caminho óptico. Uma análise da distância entre a lente cilíndrica e o prisma pode ser encontrada em [13].
- 5.8 Análise geométrica para cálculo da relação entre pixel e ângulo de incidência – chegada da luz.
- 5.9 Gráfico Ângulo de Ressonância x Pixel.
- 5.10 Fluxograma do software embarcado.
- 5.11 Tela inicial do software para o modo WIM, aba “General Information”.
- 5.12 Detalhe para o menu de opções.
- 5.13 Aba “Sensorgram” com os gráficos Índice de Refração X Tempo e Comprimento de Onda X Tempo. A aba “Parameters” possui a mesma estrutura e apresenta os gráficos Largura X Tempo e Assimetria X Tempo.
- 5.14 Visualização das dependências do software. Interface é classe detentora do método *main*.
- 5.15 a) Tela inicial da aplicação para o modo AIM com janela listando o detector conectado b) Execução do SPR Station – AIM.
- 5.16 Setup experimental para a plataforma do biossensor SPR desenvolvida.
- 5.17 Circuito de um sensor CCD.
- 5.18 a) Sinal sem a remoção da corrente escura e b) Sinal após a subtração da corrente escura.
- 5.19 Montagem para medir a qualidade da emissão da fonte luminosa.

- 5.20 Sinal do transdutor a) bruto, b) após a média móvel usando 90 pixels e uma média espectral para 5 imagens e c) após a mediana usando 32 pixels.
- 5.21 Curva SPR para os prismas coberto com o *sputtering* K550x.
- 6.1 Sensorgrama, no modo WIM, para os parâmetros comprimento de onda de ressonância, índice de refração, largura e assimetria respectivamente.
- 6.2 Sensorgrama do $\Delta\lambda_{res}$ suavizado. Detalhe para ampliação de um ciclo.
- 6.3 Sensorgrama, no modo AIM, para os parâmetros ângulo de ressonância, índice de refração, largura e assimetria respectivamente.
- 6.4 Respostas para as montagens a) VirTech b) modo WIM e c) modo AIM.
- 6.5 Respostas para a deposição de neutravidina.
- 6.6 Respostas para a deposição de neutravidina: a) sensorgrama suavizado referente ao biossensor proposto e b) resposta do VirTech.
- 6.7 Respostas para a constantes de adsorção e dissociação calculadas em função do sensorgrama para o a) índice de refração e para o b) comprimento de onda.
- A.1 Fotografia para prismas com (1,2,3) e sem (3,5,6) *annealing*, com destaque para diferenças em suas estruturas internas, polidos (3,4) e não polidos (1,2,5,6).
- A.2 a) Curva SPR distorcida obtida com o b) prisma cuja superfície metálica foi depositada com o *sputtering* Sanyu SC-701.
- A.3 Gráfico que mostra a espessura esperada em função da taxa de *sputtering* a 1×10^{-1} mbar.
- A.4 Célula de fluxo acoplada ao prisma. Detalhe para o desnível responsável pela formação de bolhas dentro da célula.

Capítulo 1

Introdução

A incorporação de soluções tecnológicas na saúde não só para uma modernização do sistema como um todo, mas principalmente na prevenção e diagnóstico mais específico, reduzindo assim, o tempo de atendimento ao paciente, é uma das alternativas encontradas pelos sistemas de saúde de diferentes países para enfrentar um cenário de elevação de gastos e de restrições de recursos em saúde.

Para evitar problemas de tecnologias que não dispõem de eficácia constatada ou mesmo aquelas que são eficazes mas apresentam baixa utilização, gestores recorrem as "evidências científicas como ferramenta balizadora para priorizar devidamente as tecnologias a serem incorporadas em seus sistemas de saúde" [1].

As evidências tornam-se ainda mais necessárias no combate a problemas que exigem ações emergenciais, como epidemias virais e bacterianas e a falta de controle de qualidade em determinados produtos, os quais são carentes em técnicas que agilizem seus prognósticos.

A tecnologia dos biossensores permite a análise de interações biomoleculares, fornecendo informações essenciais ao entendimento do processo em análise. Uma das principais áreas de aplicação para essa tecnologia são os exames clínicos, em especial as aplicações imunossensoras [2,3,21,24,67].

Em seu funcionamento, um biossensor simula o comportamento do corpo humano, por meio de testes imunológicos (imunoensaios). O organismo animal ou vegetal quando estimulado por uma substância estranha, denominada antígeno, desencadeia um mecanismo de defesa por meio da liberação de anticorpos específicos em resposta à presença desse antígeno [22]. Devido a essa especificidade, a resposta de um imunoensaio só ocorrerá na presença de uma substância específica. No biossensor, geralmente a substância a ser estudada atua como antígeno. Assim, reproduzindo um

imunoensaio, o biossensor garante uma alta sensibilidade, especificidade, e reprodutibilidade do diagnóstico.

Uma vantagem é a utilização da amostra em volume pequeno [4], como amostras de sangue de um paciente, evitando desperdício. A substância pode ser manipulada em diferentes formatos, tais como: fluxo líquido [4,5] – para tanto, o biossensor incorpora um sistema microfluídico, gotejamento (gotas líquidas) [7] e em fase gasosa [6]. Com isso, aumenta o custo-benefício do diagnóstico [4] ao mesmo tempo em que consegue ser um método pouco invasivo.

Composto por partes eletrônicas e biológicas, conforme descrito no capítulo 2, os biossensores interdisciplinam a química, física, informática, biologia, eletrônica e medicina. Como resultado, possibilitam a automação, miniaturização e simplificação no processo de diagnóstico [64].

O mercado mundial de biossensores movimentou, em 2008, 10.6 bilhões de dólares [65]. Muito se deve aos biossensores para monitoramento de Glicose, 83 %, entretanto a versatilidade dessa tecnologia não fica restrita a tal aplicação. A variedade na forma de tradução da interação biomolecular permite a pesquisa de diferentes biossensores aplicáveis nos mais variados campos do conhecimento.

Como exemplo de área passível de utilização de um biossensor, pode-se citar a indústria de combustíveis. Previamente preparado, este consegue medir em tempo real os valores de concentrações na mistura de álcool e gasolina, a eventual adição de água no álcool combustível ou a presença de produtos estranhos na gasolina. Outro campo de atuação é na saúde. O biossensor poderia estar presente nas unidades do Programa de Saúde da Família como tecnologia para diagnosticar doenças virais e bacterianas (AIDS, Dengue, H1N1, etc.), além de permitir o monitoramento da qualidade da água utilizada para o consumo humano. Na indústria de alimentos, a detecção de fungos e outras pragas tomam-se factível [12,14], reduzindo as perdas econômicas, assim como os riscos à saúde humana e animal. E no setor de segurança, um biossensor também poderia ser utilizado para detecção de drogas ou armas biológicas em aeroportos e fronteiras [6]. Assim, os biossensores constituem um processo abrangente de investigação de problemas de saúde, ou não, emergentes ou já existentes.

Dentre os tipos de biossensores existentes, os ópticos estão cada vez mais se tornando objetos de pesquisa [18]. Em seu funcionamento, a análise é realizada através do monitoramento de propriedades ópticas de uma fonte luminosa, que interage com o processo investigado.

No presente trabalho desenvolveu-se um biossensor óptico baseado no fenômeno físico da ressonância de plasma de superfície (*Surface Plasmon Resonance* – SPR). Composto por um conjunto de elementos eletro-ópticos, detalhados no capítulo 4, o biossensor SPR monitora o comportamento de uma fonte luminosa sob condições especiais. Dessa forma, garante um diagnóstico mais rápido se comparado aos métodos convencionais para detecção de interações biológicas (cromatografia, equilíbrio de diálise, testes imunológicos tradicionais e espectroscopia), em torno de minutos após a coleta do material, e a possibilidade de desenvolvimento de equipamentos para atuação em campo, problema até então encontrado nos métodos tradicionais de imunoenaios, como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e o MEIA (*Microparticle Enzyme Immuno Assay*) [66].

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho objetiva desenvolver um sistema computacional para o funcionamento de um biossensor óptico baseado na ressonância de plasma de superfície.

1.1.2 Objetivos Específicos

Dentre os percursos necessários ao cumprimento do objetivo a que se propõe este trabalho, algumas atividades devem ser realizadas:

- Entender o fenômeno da ressonância de plasma de superfície;
- Analisar as possíveis soluções de hardware para o sistema;
- Analisar as possíveis soluções de software para o sistema;
- Confeccionar uma estrutura física que engloba todos os componentes necessários para obtenção do fenômeno da ressonância de plasma de superfície;

- Implementar as técnicas de processamento da resposta do transdutor que permitem a utilização do fenômeno SPR em aplicações sensoriais;
- Estudar/Implementar soluções de suavização de sinais para minimizar ruídos nos dados do sistema;

1.2 Organização do trabalho

A presente dissertação está organizada da seguinte forma:

- No **Capítulo 2: Biossensores**, discute-se os fundamentos da tecnologia de biossensores, em ênfase nos biossensores ópticos, bem como é apresentado o modelo matemático que rege o biossensor SPR.

- No **Capítulo 3: Simulador**, é apresentado o simulador desenvolvido para o entendimento do fenômeno SPR.

- No **Capítulo 4: Sistema computacional para biossensor baseado no fenômeno SPR**, encontram-se as especificações para o sistema. Descreve-se as atividades para se alcançar os objetivos propostos no presente trabalho. Ao fim, apresentam-se todos os componentes presentes no sistema;

- No **Capítulo 5: Construção da solução**, discute-se os procedimentos adotados para organização dos componentes e o que foi feito para se obter um equipamento que "*Simplemente funciona!*".

- No **Capítulo 6: Resultados experimentais**, os resultados dos experimentos e comparações realizados com o sistema desenvolvido são apresentados.

- No **Capítulo 7: Conclusões e trabalhos futuros**, apresentam-se as conclusões deste trabalho e indicações de posteriores aprofundamentos.

Capítulo 2

Biossensores

2.1 Introdução

De acordo com a IUPAC [9] o termo biossensor refere-se a:

“um dispositivo que usa reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imuno-sistemas, tecidos, organelas ou células completas para detectar compostos químicos, usualmente, através de sinais elétricos, térmicos ou ópticos.”

Os biossensores tipicamente são equipamentos bioquímico-eletrônicos para identificar, processar e quantificar um evento biológico.

A Figura 2.1 fornece um diagrama de blocos para um biossensor. O **elemento de reconhecimento** (bioreceptor) é afixado na superfície do sensor por meio de uma **interface química** e tem por objetivo reconhecer seletivamente e interagir com o substrato/analito de interesse, originando uma reação bioquímica (produto químico). Entre os elementos de reconhecimento utilizados encontram-se enzimas, anticorpos, microorganismo, cadeias de DNA e receptores específicos. A interação entre o analito e o elemento de reconhecimento resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas do analito (modificação de pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons) que são detectadas e medidas pelo **transdutor** [11,12]. Um módulo é usado para controle e aquisição da saída do transdutor que é então processada e disponibilizada pela interface com o usuário. O sistema computacional é então a composição de elementos (hardware e software) que

irão viabilizar o funcionamento do biossensor. Devido à versatilidade do elemento de reconhecimento, a *superfície de reconhecimento* pode ser “preparada” para as mais diversas finalidades, fator que confere aos biossensores essa flexibilidade de utilização em diversos domínios de aplicação. O crescimento dos biossensores no cenário mundial deveu-se segundo Nakamura *apud* Moreira [13] a:

“características vantajosas, tais como menor tempo de processamento da análise da amostra e um ônus menor do processo completo em relação aos outros métodos, possibilidade de integração e de análise em tempo real e in-situ”.

Diante disso, a aplicabilidade da tecnologia de biossensores torna-se possível nas mais diferentes áreas do conhecimento: saúde, indústria de alimentos, controle de processos, monitorização ambiental e no combate a armas biológicas [14,15].

O termo biossensor deve-se ao professor Leland C Clark Jnr. que em 1956 criou o eletrodo de oxigênio. Em seu discurso no simpósio da Academia de Ciências de Nova Iorque descreveu “como fazer sensores eletroquímicos mais inteligentes acrescentando transdutores de enzima, formando uma estrutura em camadas baseada em ensaios sanduíches” [16].

No tocante ao desenvolvimento dos biossensores de ressonância de plasma de superfície os fatos são bem mais recentes. O fenômeno que ocorre ao incidir uma luz em uma grátula de difração devido às ondas de plasma de superfície presentes no metal foi primeiramente estudado por Wood no início do século XX. Liedberd e colaboradores [17] descreve os pormenores da trajetória das pesquisas em biossensores SPR. Nos anos 60, Kretschmann-Raether e Otto demonstraram a existência do efeito SPR, pelo processo de atenuação da reflexão total da luz, ao incidir um feixe luminoso em um prisma acoplado a uma superfície de metal. A Figura 2.2 mostra a configuração dos sensores utilizados por cada um para tal experiência. Otto propôs uma estrutura onde o filme metálico dista do prisma na ordem do comprimento de onda da luz incidente. Já Kretschmann posicionou o metal junto ao prisma, utilizando substratos de vidro na deposição do metal sobre o prisma. A configuração apresentado por Kretschmann-Raether é utilizada na maior parte dos instrumentos SPR devido a sua maior facilidade de instrumentação.

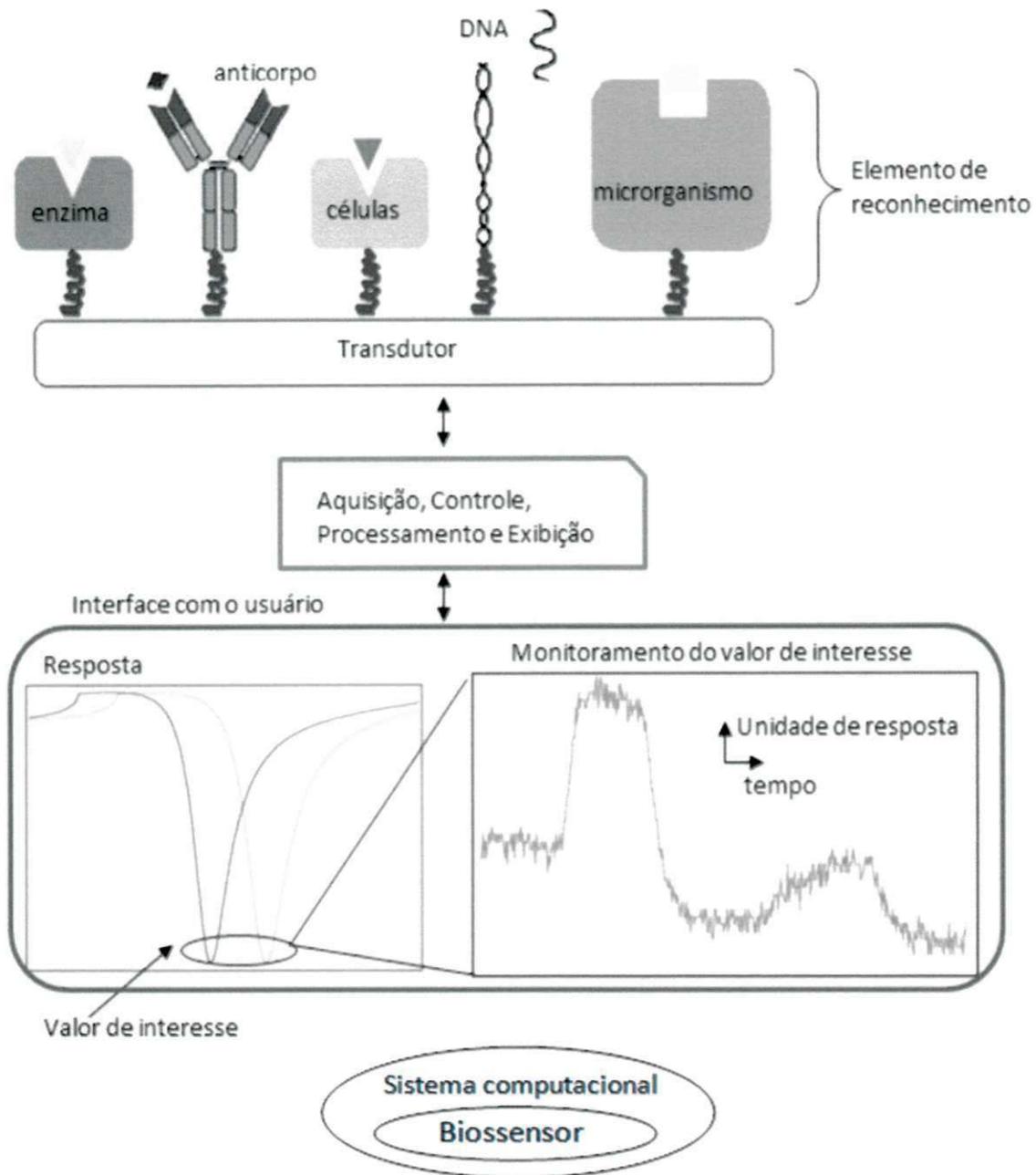


Figura 2.1 – Representação esquemática de um biossensor. O elemento de reconhecimento está integrado ou intimamente associado ao transdutor. Uma unidade é responsável por fornecer os parâmetros de aquisição, fornecidos pelo usuário. Essa unidade apresenta os resultados calculados, em geral, sob a forma de gráficos os quais permitem acompanhar a evolução do evento biológico. O sistema computacional constitui dos elementos que viabilizam o funcionamento do biossensor, formando um equipamento.

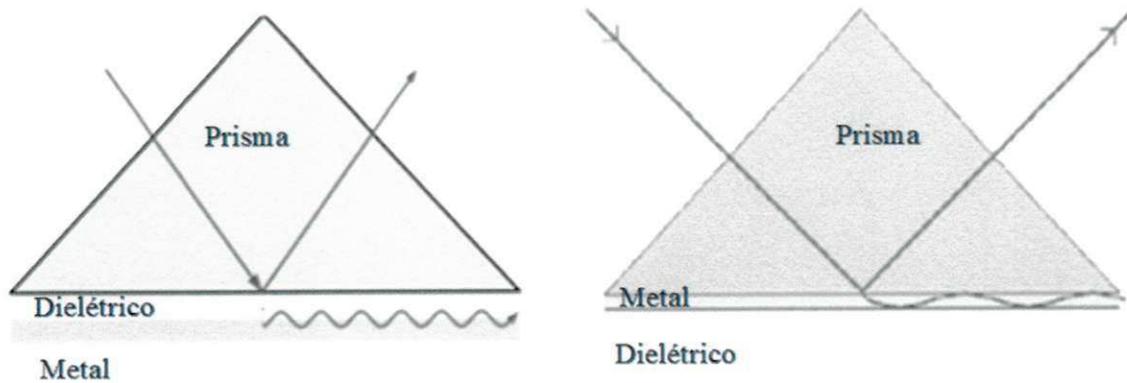


Figura 2.2 – Configurações proposta por a) Otto e b) Kretschmann-Raether

No ano de 1983 Liedberg e seus colaboradores desenvolveram o primeiro biossensor utilizando a tecnologia SPR baseado na configuração de Kretschmann, utilizado para detecção de gases. Desde então o desenvolvimento/pesquisa destes biossensores vem crescendo [18].

2.2 Classificação

Os biossensores podem ser classificados em termos do modo de interação do elemento a ser reconhecido e o analito; de acordo com o tipo de elemento bioreceptor utilizado; de acordo com o método de detecção e de acordo com a natureza do transdutor [19,20]. A Tabela 2.1 ilustra as possíveis classificações.

De acordo com o *modo de interação* pode ser:

- i. **Catalítico** – sensores biocatalítico são baseados em uso de catalisadores biológicos que mediam a reação química, envolvendo um ou mais substratos, gerando um ou vários produtos. Após o processo, o biocatalisador é regenerado e pode ser reutilizado novamente [19];
- ii. **Afinidade** – são baseados na interação do analito de interesse com o elemento de reconhecimento, não mediada por conversão catalítica. Essa interação envolve a modificação de alguma(s) propriedade(s) química(s) ou física(s) formando um complexo analito-receptor.

De acordo com *ométodo de detecção* pode ser:

- i. **Direta** – as modificações provenientes da interação analito-receptor são os alvos de interesse, sem necessidade de compostos mediadores ou marcadores;
- ii. **Indireta** – faz-se necessário a adição de composto para marcar o substrato (analito) de interesse. Podem ser marcadores fluorescentes, nanopartículas ou enzimas.

Tabela 2.1 – Classificação dos biossensores sob diferentes critérios

Critério de classificação	Modo de interação	Catalítico
		Afinidade
	Método de detecção	Direta
		Indireta
	Bioreceptor	Enzima
		Organela, tecido ou célula
		Anticorpo (Imunossensores)
		Ácidos nucleicos
	Sistema de transdução	Eletroquímico
		Óptico
		Termométrico
		Magnético
		Acústicos
		Piezoelétrico
		Nanomecânico

O *bioreceptor* empregado pode ser:

- i. **Enzima** – biossensores enzimáticos utilizam enzimas como catalisadores de reações químicas ligando-se ao substrato de interesse, a exemplo do biossensor de Clark: enzima oxidase de glicose para determinar quantidade de glicose em sangue [21]. Entre as vantagens da utilização de enzimas nos biossensores destacam-se a sua elevada seletividade, a simplicidade da configuração do protótipo, sua capacidade de se auto-

- regenerar e ampla disponibilidade comercial [19]. As principais formas de imobilização de enzimas podem ser encontradas em [22].
- ii. **Células e tecidos** – estes biossensores utilizam células de microorganismos incorporando-as à superfície do eletrodo, cujo princípio de funcionamento é semelhante aos biossensores enzimáticos. Apresentam uma resposta mais lenta devido à difusão de substratos através da membrana celular [13,19]. Em contra partida, apresentam custos reduzidos, maior atividade catalítica e estabilidade [13]
 - iii. **Anticorpo (Imunossensores)** – o objetivo desses biossensores é encontrar o antígeno correspondente [21,24]. Dessa forma apenas o antígeno de interesse agrega-se ao anticorpo, alterando as propriedades físicas/químicas do analito. Ao buscar uma maior seletividade e limites de detecção adequados faz-se necessário uma alta afinidade do complexo antígeno-anticorpo dificultando sua dissociação, comprometendo seu uso a uma única vez [19,24].
 - iv. **Ácidos Nucléicos** – os ácidos nucleicos são estruturas moleculares formadas pela repetição de *nucleotídeos*, que são as unidades básicas das cadeias de DNA. Os *genossensores* usam a sequência complementar do DNA para detecção de mutações e alterações de DNA [17].

De acordo com o tipo de *transdutor* pode ser:

- i. **Eletroquímico** – estes biossensores consistem em uma camada de bioreconhecimento e um transdutor eletroquímico. Em Thévenot *et al* [20] encontramos os biossensores eletroquímicos divididos da seguinte forma:
 - a) *Potenciométrico* – monitora a diferença de potencial entre dois eletrodos, sendo um indicador (biossensor) e outro de referência, quando submetidos a uma corrente zero;
 - b) *Amperométrico* – “monitora a corrente resultante da oxidação eletroquímica ou da redução de uma espécie eletro-ativa (...) mantendo um potencial constante” [20];
 - c) *Condutométrico* – monitora a condutância iônica, através da variação da concentração de íons.

- ii. **Óptico** – monitora a variação das propriedades ópticas fruto da interação entre o bioreceptor e o analito. Ao incidir uma luz sobre a superfície em que se encontra o analito, dependendo da interação, pode-se observar alterações nas características do índice de refração, absorção, fosforescência, fluorescência, refletividade, polarização e comprimento de onda [13,19]. Entre os principais biossensores ópticos podemos destacar os baseados em *fibra-ótica* e os de *ressonância de Plasma de superfície (SPR)*. As principais vantagens desse tipo de biossensor estão listadas em [25,32,58,59].
- iii. **Termométricos** – medem a concentração do analito através da variação de entalpia de uma reação química;
- iv. **Magnéticos** – empregam partículas magnéticas como a magnetita (Fe_3O_4), greigita (Fe_3S_4) ou outros tipos de ferrita [19], combinadas com o elemento de reconhecimento para detecção magnética;
- v. **Piezoelétrico** – mede alterações na massa depositada sobre a superfície de um cristal piezoelétrico a partir das variações na frequência característica do cristal.
- vi. **Acústicos** – também são baseados na piezoeletricidade, entretanto focados nas propriedades acústicas do sistema [26];
- vii. **Nanomecânico** – consistem de nanoestruturas com as extremidades em forma de trampolim que sofrem uma deflexão devido à incorporação do analito de interesse sobre o mesmo [27].

Os biossensores ópticos baseados na ressonância de plasmas de superfície possuem características vantajosas tais como menor tempo de processamento da análise da amostra e um ônus menor do processo completo em relação aos outros métodos, miniaturização, versatilidade, rapidez e a não necessidade de marcadores especiais para detectar substâncias de interesse, as quais são descritas na seção 2.3. Ademais, podem ser aplicados para análise de líquidos, gás e sólidos com espessuras na ordem do comprimento de onda da luz incidente.

2.3 Biossensores SPR

Nos últimos anos testemunhou-se um notável número de trabalhos destinados ao desenvolvimento de sensores ópticos para medição/identificação de compostos químicos e/ou biológicos utilizando a técnica SPR.

Um biossensor SPR estende a funcionalidade de um sensor SPR – sensor que observar a variação do índice de refração (IR) – por meio da adesão de uma camada bioquímica ativa. Quaisquer alterações nessa camada são captadas e verificadas na saída do biossensor. Na Figura 2.3 observa-se uma estrutura típica de um biossensor SPR. Nela encontra-se a camada de metal (camada 2) entre o meio dispersivo (camada 1) e a camada de bioreconhecimento (camada 3) presente na amostra fluidica (camada 4). Dentre as vantagens proporcionadas pelos biossensores SPR destacam-se[15]:

- **Versatilidade** – um sensor SPR genérico, sem a presença do bioreceptor, pode ser adaptado para detectar elementos de diferentes analitos. Como mencionado anteriormente, a versatilidade é decorrente da funcionalização da superfície metálica, isto é, preparar a superfície com a adesão de um elemento de reconhecimento que vá ao encontro da substância a ser investigada;
- **Sem rótulo** – não há necessidade de marcadores pois o sensor monitora diretamente o índice de refração da superfície seletora;
- **Rapidez** – o resultado é pronunciado em poucos minutos;
- **Miniaturização** – os elementos necessários a excitação do efeito SPR são de dimensões físicas reduzidas, sendo área mínima para detecção limitada pelo comprimento de onda da onda de plasma de superfície (da ordem do micrômetro), favorecendo o projeto de equipamentos portáteis [15].

A seguir serão apresentados, os aspectos teóricos do fenômeno de ressonância de plasma de superfície.

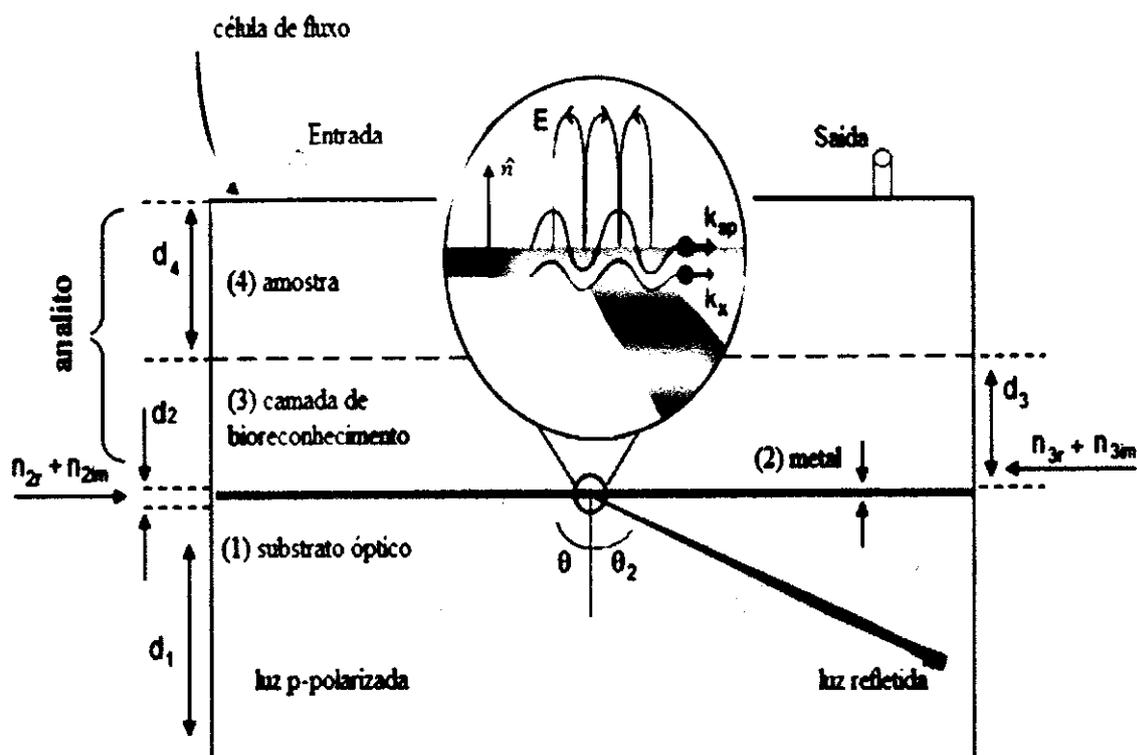


Figura 2.3 – Estrutura de um Biossensor SPR com quatro camadas em que (1) é o meio dispersivo, (2) metal, (3) e (4) representam o analito sob análise. A célula de fluxo conduz o analito por sobre a superfície do metal. Reflexão interna total, com destaque para o campo evanescente gerado na interface entre os meios com diferentes índices de refração, sua componente horizontal (k_x) e a oscilação dos plasmas (k_{sp}).

2.3.1 Conceitos Fundamentais

Polarização da Luz

A luz ao se propagar por um meio possui a intensidade e a direção do vetor campo elétrico variando de forma incoerente no tempo. A polarização de uma onda eletromagnética consiste na curva traçada pelo vetor campo elétrico [28]. Considere novamente a Figura 2.3, o plano definido pela luz incidente e a direção normal \hat{n} é denominado de plano de incidência. A direção da polarização pode ser classificada em:

- i) Transverso Magnético (TM) ou tipo p – quando o campo magnético incide perpendicularmente ao plano de incidência enquanto o campo elétrico incide paralelamente;
- ii) Transverso Elétrico (TE) ou tipo s – quando o campo elétrico fica orientado na direção perpendicular ao plano de incidência enquanto o campo magnético incide paralelamente.

Reflexão Interna Total da Luz

Quando uma onda luminosa desloca-se de um meio com alto índice de refração (n_1) para um meio com índice de refração menor (n_2), a luz é parcialmente refletida e parcialmente refratada, segundo a lei de Snell:

$$n_1 \text{sen} \theta = n_2 \text{sen} \theta_2 \quad (2.1).$$

Acima de um determinado ângulo de incidência (θ), a luz não é mais refratada e uma reflexão interna total (RIT) é observada. O ângulo de incidência crítico (θ_c) a partir do qual a reflexão interna total ocorre é obtido de

$$\theta_c = \text{sen}^{-1} \left(\frac{n_1}{n_2} \right) \quad (2.2).$$

Entretanto, em condições específicas, isso não é bem verdade, pois uma componente da onda eletromagnética penetra no meio de menor índice de refração criando um *campo elétrico evanescente*. Esse fenômeno torna-se mais evidente quando na superfície de menor índice de refração é depositado um filme metálico. Tal fenômeno é apresentado em destaque na Figura 2.3. Mais detalhes serão apresentados na próxima sessão.

2.3.2 O fenômeno SPR

Os plasmas podem ser definidos como uma unidade para as oscilações coletivas de elétrons – semelhante aos fótons como unidades da luz.

No que se refere aos metais, conforme descrito pelo modelo do gás de elétrons livres proposto por Drude [30], estes possuem íons positivos e um “gás de elétrons” livres. Ao incidir um feixe de luz sobre o metal, os elétrons livres movem-se devido à presença do campo elétrico e os íons positivos deixados para trás exercem uma força de atração sobre os elétrons, tentando puxá-los de volta para suas posições originais. Essa interação é o que faz oscilar os plasmas, surgindo uma *onda de plasma*. E quando essa oscilação ocorre na superfície de um metal denomina-se *onda de plasma de superfície – surface plasmon wave (SPW)*. Nesse sentido a escolha do metal utilizado é de fundamental importância, sendo os metais mais apropriados aqueles “cuja permissividade elétrica complexa possui valores elevados, e negativos, para a parte real e valores baixos para a parte imaginária” [15]. Entre estes encontramos os metais nobres como a prata, o ouro, o cobre e o alumínio. O ouro e a prata são os metais mais utilizados devido ao fato de a ressonância de plasma de superfície ocorrer no espectro de luz visível [31]. Vale salientar que o ouro é o menos suscetível a reações de oxidação e redução.

Na Figura 2.3 pode-se observar a direção e o sentido do vetor de onda de plasma, denotado por k_{sp} [32]:

$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_{mr}n_3^2}{\epsilon_{mr} + n_3^2}} \quad (2.3),$$

os quais que λ é o comprimento da onda luminosa incidente, ϵ_{mr} é a parte real da permissividade elétrica da superfície de ouro e n_3 é o índice de refração do analito. A condição 2.3 também pode ser reescrita da seguinte forma:

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_2 \epsilon_3}{\epsilon_2 + \epsilon_3} \right)^{1/2} \quad (2.4),$$

os quais ϵ_2 e ϵ_3 são a permissividade complexa do metal e do analito respectivamente; ϵ está relacionada com o índice de refração complexo da seguinte forma: $\epsilon = \epsilon_1 + i\epsilon_2 = (n + ik)^2$, com $\epsilon_1 = n^2 + k^2$ e $\epsilon_2 = 2nk$. Assim, tem-se que:

$$n = \sqrt{\sqrt{\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2} + \epsilon_1/2} \quad (2.5)$$

Para que haja a excitação dos plasmas de superfície, isto é, a absorção da energia proveniente do feixe de luz para deslocar os elétrons, algumas condições devem ser verificadas:

- **Condição 1 - As ondas luminosas devem possuir polarização transversa magnética, situação em que o campo elétrico incide paralelamente ao plano de incidência.**

Uma vez que a SPW possui polarização transversa magnética [32], o feixe de luz incidente deve possuir a mesma polarização para que haja a ressonância.

- **Condição 2 - A onda luminosa deve incidir na interface na condição de reflexão interna total.**

A RIT é uma condição necessária para o surgimento do campo elétrico evanescente, o qual fornecerá energia para excitação dos elétrons livres do metal. Esse campo evanescente é gerado pelas forças de interação entre elétrons e íons positivos em uma interface metal/dielétrico. Seu valor máximo ocorre no início da interface e decai exponencialmente à medida que penetra no dielétrico.

- **Condição 3 - A espessura da camada de metal deve ser inferior ao comprimento de onda incidente.**

O campo elétrico evanescente tem um poder de penetração elevado, no máximo adentra a uma distância igual ao comprimento de onda da luz incidente. Deste modo, caso tenhamos uma superfície metálica muito espessa, não será possível excitar os plasmas de superfície.

Em contrapartida, a amplitude da onda que caracteriza a oscilação dos plasmas também possui valores absolutos pequenos. Assim, caso tenhamos

os quais ϵ_2 e ϵ_3 são a permissividade complexa do metal e do analito respectivamente; ϵ está relacionada com o índice de refração complexo da seguinte forma: $\epsilon = \epsilon_1 + i\epsilon_2 = (n + ik)^2$, com $\epsilon_1 = n^2 + k^2$ e $\epsilon_2 = 2nk$. Assim, tem-se que:

$$n = \sqrt{\sqrt{\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2} + \epsilon_1/2} \quad (2.5)$$

Para que haja a excitação dos plasmas de superfície, isto é, a absorção da energia proveniente do feixe de luz para deslocar os elétrons, algumas condições devem ser verificadas:

- **Condição 1 - As ondas luminosas devem possuir polarização transversa magnética, situação em que o campo elétrico incide paralelamente ao plano de incidência.**

Uma vez que a SPW possui polarização transversa magnética [32], o feixe de luz incidente deve possuir a mesma polarização para que haja a ressonância.

- **Condição 2 - A onda luminosa deve incidir na interface na condição de reflexão interna total.**

A RIT é uma condição necessária para o surgimento do campo elétrico evanescente, o qual fornecerá energia para excitação dos elétrons livres do metal. Esse campo evanescente é gerado pelas forças de interação entre elétrons e íons positivos em uma interface metal/dielétrico. Seu valor máximo ocorre no início da interface e decai exponencialmente à medida que penetra no dielétrico.

- **Condição 3 - A espessura da camada de metal deve ser inferior ao comprimento de onda incidente.**

O campo elétrico evanescente tem um poder de penetração elevado, no máximo adentra a uma distância igual ao comprimento de onda da luz incidente. Deste modo, caso tenhamos uma superfície metálica muito espessa, não será possível excitar os plasmas de superfície.

Em contrapartida, a amplitude da onda que caracteriza a oscilação dos plasmas também possui valores absolutos pequenos. Assim, caso tenhamos

uma superfície de grande espessura não ocorrerá plasmas de superfície. Neste caso presenciamos plasmas volumétricos.

- **Condição 4 - Conservação da energia e momento do campo eletromagnético durante a excitação dos plasmas de superfície.**

Condições de contorno necessárias para ocorrer as situações de reflexão e transmissão da onda eletromagnética.

- **Condição 5 - O vetor do feixe luminoso incidente deve ser maior que o vetor de oscilação dos plasmas de superfície.**

Os plasmas de superfície não podem ser excitados incidindo uma luz proveniente de um meio (ex.: ar) diretamente na interface metal/dielétrico porque “as condições de conservação de energia e momento não podem ser satisfeitas simultaneamente” [33]. Por esta razão, faz-se necessário a utilização de um meio dispersivo, exemplos: prismas, grade de dispersão, guia de onda e fibra óptica.

2.3.3. Ocorrência da Ressonância

A SPR é um fenômeno óptico-elétrico observado quando a componente do campo evanescente (k_x) oscila na mesma frequência e amplitude dos plasmas de superfície. Em outras palavras, quando o vetor k_x iguala-se ao vetor k_{sp} dizemos que ocorreu a *ressonância de plasma de superfície*. O valor da componente do campo evanescente na direção dos plasmas é [34]:

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin(\theta) \quad (2.6),$$

em que n_1 é índice de refração do meio dispersivo utilizado e θ o ângulo de incidência. A equação 2.6 também pode ser reescrita da seguinte forma [59]:

$$k_x = \frac{\omega}{c} n_1 \sin(\theta) \quad (2.7).$$

Então, na ressonância tem-se a seguinte situação:

$$\frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_{2r} n^2}{\epsilon_{2r} + n_3^2}} = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \text{sen}(\theta) \quad (2.8)$$

ou

$$\frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_2 \epsilon_3}{\epsilon_2 + \epsilon_3} \right)^{1/2} = \frac{\omega}{c} n_1 \text{sen}(\theta) \quad (2.9)$$

Nesse momento a energia transportada pelo feixe luminoso é absorvida pelos elétrons o que é pronunciada por uma diminuição na intensidade da onda luminosa refletida. A partir de (2.3) nota-se que o biossensor detecta mudanças de concentração de massa na camada formada junto à superfície do sensor através da medição das mudanças no valor do índice de refração (n_3). Quando as moléculas no analito se ligam aos elementos bioreconhecedores, a massa molecular aumenta, havendo um deslocamento do momento de ressonância, conforme indicado pela Figura 2.5; quando elas dissociam a massa diminui.

2.3.4. Modelo matemático

O modelo matemático utiliza as equações de Fresnel para descrever a excitação óptica da ressonância de plasma de superfície. Como poderá se observar, o modelo é sensível a variação das características da *camada sensível*, tais como espessura e índice de refração; da *camada metálica*, do *comprimento de onda* da luz incidente e do *ângulo de incidência* da luz.

Seja um biossensor multicamadas conforme mostra a Figura 2.3. A onda eletromagnética em um biossensor de m camadas ou meios tem seu comportamento descrito, em cada meio, por [34]:

$$q_j = \frac{\sqrt{n_j^2 - (n_1 \text{sen}(\theta_j))^2}}{n_j} \quad (2.10)$$

$$\beta_j = \frac{2\pi}{\lambda} d_j \sqrt{n_j^2 - (n_1 \text{sen}(\theta_j))^2} \quad (2.11)$$

em que: $n_j = n_{jre} + in_{jim}$: índice de refração complexo do meio j ; θ_j : ângulo de incidência da luz que se propaga no meio j ; λ : comprimento de onda da luz incidente.

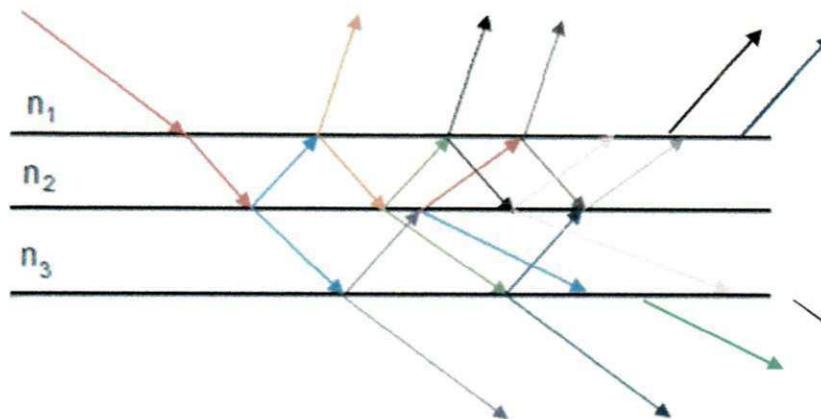


Figura 2.4 – Traçado de raios (Ray tracing) de uma onda eletromagnética em um sistema multicamadas.

Pode-se observar a partir da Figura 4.1, que a luz sofre múltiplas reflexões entre as interfaces e estas devem ser levadas em consideração para o cálculo de reflexão total [41].

Encontra-se na literatura uma formulação mais fácil e conveniente de uso para descrever a transferência de uma onda entre meios. Abelès e Physapud [34] empregam a chamada *matriz de transferência*. A matriz de transferência da onda propagando-se do meio j para o meio $j+1$ é expressa por (2.12), levando em consideração (2.10) e (2.11).

$$M_j = \begin{bmatrix} \cos(\beta_j) & (-i \text{sen}(\beta_j))/q_j \\ -i q_j \text{sen}(\beta_j) & \cos(\beta_j) \end{bmatrix} \quad (2.12)$$

Desta forma, a transferência total pode ser calculada em função da matriz de transferência de cada interface entre os meios, pela fórmula:

$$M_{tot} = M_2 M_3 \dots M_{m-1} = \prod_{i=1}^{m-1} M_i = \begin{bmatrix} m_{11} & m_{12} \\ m_{21} & m_{22} \end{bmatrix} \quad (2.13)$$

Por fim, valendo-se de (2.10) e da matriz de transferência total (2.13) pode-se calcular os valores da **refletividade** (r) e **transmissividade** (t) do sistema de m camadas. Estes valores são representados por:

$$r = \frac{(m_{11} + m_{12}q_m)q_m - (m_{21} + m_{22})q_m}{(m_{11} + m_{12}q_m)q_m + (m_{11} + m_{12})q_m} \quad (2.14),$$

$$t = \frac{2q_m}{(m_{11} + m_{12}q_m)q_1 + (m_{11} + m_{12})q_m} \quad (2.15).$$

As expressões (2.14) e (2.15) descrevem os denominados *coeficientes de Fresnel*. Estas equações foram utilizadas para obtenção dos índices de refração apresentados nas Figuras 3.3 e 3.4 e explicam a ocorrência do fenômeno SPR ilustrado nas Figuras 2.5 e 2.6.

Morfologia da Curva SPR

A morfologia da curva SPR pode ser exemplificada pela Figura 2.6. Ao determinar o valor mínimo da curva SPR, pode-se determinar o valor FWHM (*full width at half maximum*), também chamado de ponto médio entre o valor máximo e mínimo da curva SPR, local onde os valores C_R e C_L são estimados. Os parâmetros C_R e C_L representam a distância em graus (modo AIM) ou em nanômetros (modo WIM) entre o mínimo da curva e borda direita e esquerda da curva, respectivamente. Os parâmetros **largura** (G) e **assimetria** (Γ) da curva SPR são expressos em função destes dois valores e calculados das seguintes formas [34,42]:

$$G = C_R + C_L \quad (2.16)$$

$$\Gamma = C_R / C_L \quad (2.17)$$

A investigação sobre o comportamento desses dois parâmetros no processo de análise de substâncias utilizando o sistema proposto é apresentada no Capítulo 6: Resultados experimentais.

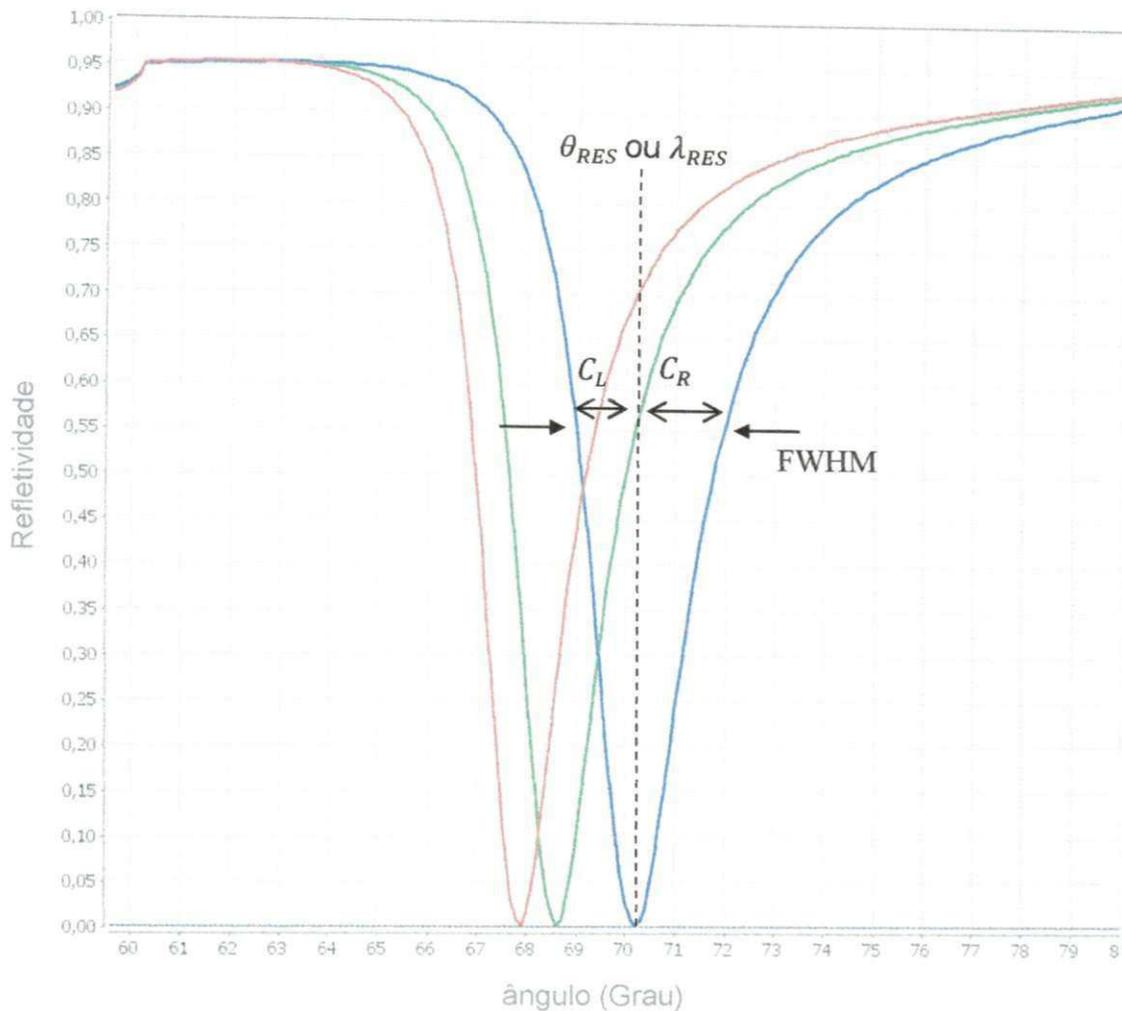


Figura 2.5 – Curva característica do fenômeno SPR (simulação) – Gráfico intensidade luminosa *versus* ângulo de incidência referente ao modo de interrogação angular (AIM). O valor mínimo da curva representa a ocorrência da ressonância (θ_{RES} para o modo AIM e λ_{RES} para o modo WIM). Para analitos com diferentes índices de refração observam-se diferentes valores no mínimo. Os parâmetros de simulação para (2.10) a (2.14) são: $n_1 = 1.522+0i$; $n_2 = 0.11525+3.88686i$; $n_3 = 1.33+0i$ (curva vermelha); $n_3 = 1.34+0i$ (curva azul); $n_3=1.35+0i$ (verde); $n_4=1.35+0i$; $d_1=\infty$ ($\sim 1\text{cm}$); $d_2=50\text{nm}$; $d_3=100\text{nm}$; $d_4=\infty$; $\lambda=670\text{nm}$.

Um dos pontos fundamentais para a utilização do fenômeno SPR em aplicações sensoriais consiste na característica da interação entre a luz incidente e as SPW. Desta forma, os biossensores SPR podem ser classificados de acordo com a medição da característica da interação entre a luz e as SPW em [15]:

- **Modo de Interrogação Angular – AIM (*Angular Interrogation Mode*):** o comprimento de onda é fixo. Varia-se o ângulo de incidência e consequentemente a componente k_x do vetor de onda, até que a condição de ressonância seja alcançada. Conhecendo o ângulo em que ocorreu a ressonância, θ_{res} , pode-se determinar o índice de refração (IR) do meio sobre a camada sensível. A partir de (2.6) obtêm-se a expressão para o IR:

$$n_3 = \sqrt{\frac{\epsilon_{2r}(n_1 \text{sen}(\theta_{res}))^2}{\epsilon_{2r} - (n_1 \text{sen}(\theta_{res}))^2}} \quad (2.18)$$

- **Modo de Interrogação de Comprimento de Onda – WIM (*Wavelength Interrogation Mode*)** – o ângulo de incidência é mantido constante. O espectro da fonte luminosa é empregado para medir a refletividade como função do comprimento de onda. Devido à dispersão do metal, as condições de ressonância dependem do comprimento de onda e é pronunciada por um valor mínimo de comprimento de onda do espectro de luz, λ_{res} , conforme Figura 2.11.

Da equação 2.7 as seguintes relações são derivadas:

$$\epsilon_3 = \frac{\epsilon_2 n_1^2 \text{sen}(\theta)^2}{\epsilon_2 - n_1^2 \text{sen}(\theta)^2} \quad (2.19)$$

$$\epsilon_3 = \frac{(\epsilon_{2r} + i\epsilon_{2i})n_1^2 \text{sen}(\theta)^2}{(\epsilon_{2r} + i\epsilon_{2i}) - n_1^2 \text{sen}(\theta)^2} \quad (2.20)$$

Após alguns rearranjos matemáticos sem (2.9) e (2.10), obtêm-se a permissividade complexa do analito para o modo WIM:

$$\epsilon_3 = \left[\frac{\epsilon_{2r} n_1^2 \text{sen}(\theta)^2 + (\epsilon_{2r} n_1^2 \text{sen}(\theta)^2) + \epsilon_{2i}^2 n_1^2 \text{sen}(\theta)^2}{(\epsilon_{2r} - n_1^2 \text{sen}(\theta)^2)^2 + \epsilon_{2i}^2} \right] - i \frac{\epsilon_{2i} n_1^4 \text{sen}(\theta)^4}{(\epsilon_{2r} - n_1^2 \text{sen}(\theta)^2)^2 + \epsilon_{2i}^2} \quad (2.21)$$

Substituindo os valores de (2.21) em (2.3) encontra-se o valor do índice de refração para o modo de interrogação espectral:

$$n_3 = \sqrt{\sqrt{\epsilon_{3r}^2 + \epsilon_{3i}^2} + \epsilon_{3r}^2} / 2 \quad (2.22).$$

Como pode ser observado anteriormente, as fórmulas (2.21) e (2.22) não dependem diretamente do λ_{res} . O valor da permissividade do ouro (ϵ_2) e do substrato óptico (ϵ_1) dependem diretamente do comprimento de onda de ressonância. Para a permissividade elétrica do ouro utilizam-se os parâmetros expressos em (2.23) para a parte real e (2.24) para a parte imaginária.

$$\begin{aligned} a_{4r} &= -4.56213820080244x10^{-10}, \\ a_{3r} &= 1.24578712691403x10^{-6}, \\ a_{2r} &= -0.00129142125293739, \\ a_{1r} &= 0.52895170755495, \\ a_{0r} &= -71.3327906531029; \end{aligned}$$

$$\epsilon_{2r} = a_{4r}(\lambda_{res})^4 + a_{3r}(\lambda_{res})^3 + a_{2r}(\lambda_{res})^2 + a_{1r}(\lambda_{res}) + a_{0r} \quad (2.23),$$

$$\begin{aligned} a_{4i} &= 6.8510087005403x10^{-10}, \\ a_{3i} &= -2.03847659489797x10^{-6}, \\ a_{2i} &= 0.00228400278978195, \\ a_{1i} &= -1.13906519596883, \\ a_{0i} &= 13.690219182805; \end{aligned}$$

$$\epsilon_{2i} = a_{4i}(\lambda_{res})^4 + a_{3i}(\lambda_{res})^3 + a_{2i}(\lambda_{res})^2 + a_{1i}(\lambda_{res}) + a_{0i} \quad (2.24).$$

Para a permissividade elétrica do substrato óptico só é utilizado a parte real, expressa por:

$$\begin{aligned} b_{4r} &= 0.00000000000068495, \\ b_{3r} &= -0.0000000018975, \\ b_{2r} &= 0.0000020055, \\ b_{1r} &= -0.00098578, \\ b_{0r} &= 1.7130; \end{aligned}$$

$$\epsilon_1 = b_{4r}(\lambda_{res})^4 + b_{3r}(\lambda_{res})^3 + b_{2r}(\lambda_{res})^2 + b_{1r}(\lambda_{res}) + b_{0r} \quad (2.25).$$

- **Modulação de Intensidade (*Intensity Modulation*)** – tanto o ângulo de incidência quanto o comprimento de onda são fixados. A intensidade da luz após a interação com a SPW é mensurada. Apenas um valor é monitorado nesse esquema, ao contrário dos modos até então mencionados, em que todo o espectro é observado.
- **Mensuração de Fase (*Phase Change Measurement*)**– a mudança da fase entre luz incidente e a luz refletida após a interação com a SPW é monitorada. Em [35] encontra-se uma referência para um biosensor capaz de detectar *Salmonella* por meio da alteração na fase da velocidade de uma onda luminosa.
- **Mensuração de Polarização (*Polarization Measurement*)** – Os modos de polarização TM e TE são combinados [15] de forma a obter-se um feixe de luz com uma polarização particular. Após a interação com a SPW a polarização da luz é monitorada.

O monitoramento contínuo da associação e dissociação da interação entre o analito e a camada sensível equivale as variações para o λ_{res} e θ_{res} ao longo do tempo. Os algoritmos para detecção desses parâmetros estão descritos seção 4.3.2.1. Após a obtenção do valor que representa o momento de ressonância e calculado o índice de refração através de (2.18) para o modo AIM e (2.21) e (2.22) para o modo WIM, é apresentado o sensorgrama para as mudanças do analito em contato com a superfície metálica ao longo da análise, conforme Figura 2.6. O aumento no índice de refração se deve a absorção do analito de interesse ao elemento bioreceptor. A diminuição ocorre devido a remoção da substância que foi absorvida.

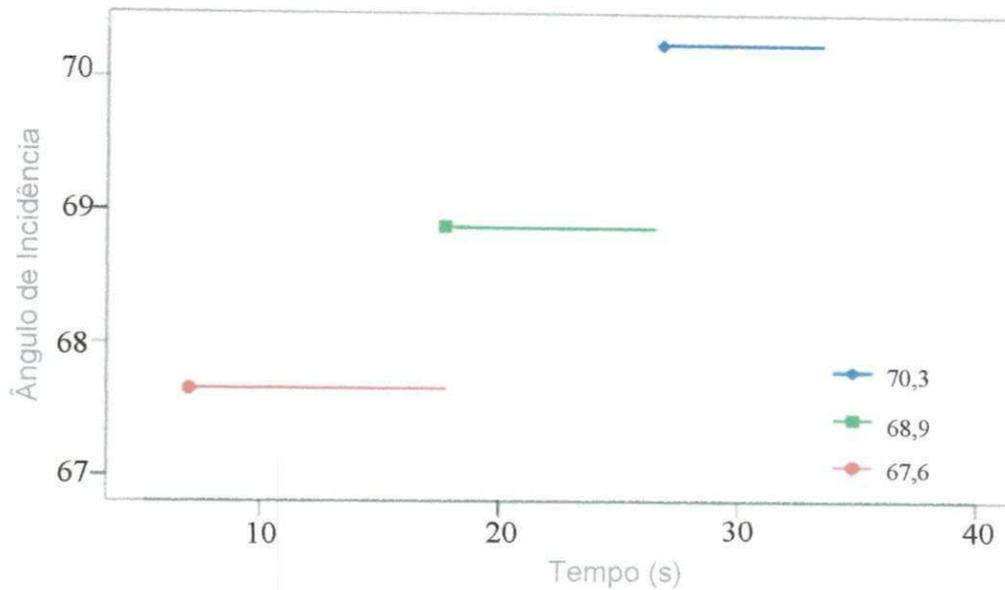


Figura 2.6 – Exemplo de um sensorgrama para o ângulo de ressonância ao longo do tempo, a partir da Figura 2.5. O aumento no ângulo de incidência, conseqüentemente do índice de refração, se deve a adsorção do analito de interesse ao elemento bioreceptor. A diminuição ocorre devido a remoção da substância que foi absorvida

2.4 Resumo

Este capítulo apresentou uma descrição dos principais aspectos que envolvem os biossensores com um enfoque para os biossensores baseados no fenômeno de ressonância de plasma de superfície. Detalhes de como a onda eletromagnética comporta-se ao passar entre as diversas camadas que compõem o sistema foram relatados. Por fim, detalhou-se como este fenômeno é utilizado na análise de interações bioquímicas, trazendo as equações que expressam o índice de refração da substância investigada tanto para o modo angular quanto para o modo espectral.

Capítulo 3

Simulador SPR

3.1 Introdução

Esse capítulo descreve o simulador desenvolvido para estudar o fenômeno da ressonância de plasma de superfície. Também relata-se os procedimentos metodológicos para desenvolvimento da dissertação.

3.2 Desenvolvimento

A construção de um simulador para o comportamento da luz através do sistema multicamadas de um biossensor SPR faz-se necessária para dar suporte ao estudo das técnicas que poderiam ser implementadas no equipamento final. Ademais, seu uso propiciou um conhecimento aprofundado do fenômeno no que diz respeito às equações que o modelam, a sensibilidade dos parâmetros e comportamento em diferentes condições de operação.

O desenvolvimento de softwares¹ voltados para a modelagem de fenômenos biológicos ou biofísicos necessitam de uma eficiente implementação, que envolve abordagens colaborativas entre especialistas da(s) área(s) envolvida(s) para ajudar na concepção de ferramentas computacionais intuitivas que forneçam precisamente as necessidades específicas para ocorrência do processo em análise.

Por ser extremamente multidisciplinar, uma ferramenta computacional para a bioinformática deve ser passível de utilização por todos os cientistas que estejam envolvidos no campo da ciência o qual pretende ser inserida. Por exemplo, referente ao fenômeno SPR o simulador deve ser capaz de fornecer funcionalidades para o processamento de informação da resposta do biossensor bem como permitir o ajuste dos parâmetros físicos que norteiam o comportamento do fenômeno.

Para conseguir atender a todos os especialistas, tais ferramentas têm o seu desenvolvimento centrado no usuário. Nesse sentido, o simulador SPR confeccionado disponibiliza uma interface útil e usável baseado nas necessidades e experiências vivenciadas pelos integrantes do laboratório de biossensores.

Uma interface de qualidade pode ser obtida [69] i) com o uso de software prototipador de interface, com validação através de um processo consistente de avaliação, ii) ao utilizar métodos de concepção que possibilitem o desenvolvimento de interfaces a partir do conhecimento do usuário e de sua tarefa ou iii) utilizar um misto das duas formas citadas anteriormente.

O formalismo da tarefa visa representar ações e seus relacionamentos através de atividades lógicas [70]. Com isso, possibilita a obtenção de requisitos de forma mais rápida, facilitado a verificação e validação [71]. O modelo obtido, geralmente, é de compreensão mais simples e fácil tanto para usuários quanto para desenvolvedores. O formalismo da tarefa pode ser realizado por diversas metodologias, tais como: GTA (*Groupware Task Analysis*), MAD (*Méthode Analytique of Description*), TKS (*Task Knowledge Structure*), TAOS (*Task Action Oriented System*), DIANE+ *Method* e CTT (*ConcurTaskTrees*), os quais fornecem especificações de forma a auxiliar a concepção da interface.

¹O desenvolvimento de softwares requer a utilização de modelos que compreende um conjunto de etapas que envolve métodos, ferramentas e os procedimentos necessários que possibilitam o desenvolvimento racional e oportuno de softwares [68]. A Engenharia de Software dispõe de vários modelos, como o modelo clássico ou cascata que abrange 6 etapas: engenharia de sistemas, análise (de requisitos), projeto, codificação, teste e manutenção.

O simulador é um *applet* Java. Applet “...são programas Java que podem ser embutidos em documentos *Hypertext Markup Language (HTML)*, ou seja, páginas Web” [36]. Assim pode-se utilizar *applets* de qualquer computador, quando disponibilizado em algum servidor, que tenha acesso a Internet através dos navegadores Web (Web browser) devidamente configurados com o *plugin* Java. Ao adotar essa forma de implementação, possibilitou-se que os integrantes do grupo pudessem utilizá-lo de seus ambientes de trabalho. Desta forma, tornou-se uma valiosa ferramenta para estimação de parâmetros, análise do comportamento da curva SPR em determinadas situações e na comparação de resultados obtidos com as Equações de Fresnel e o Modelo de Drude, que eram frentes de investigações dos pesquisadores.

O simulador permite configurar todas as características de um sanduíche de camadas, conforme biossensor expresso pela Figura 2.3. Cada camada é representada por uma aba, como ilustrado na Figura 3.1. Em cada aba, é possível configurar a característica de um meio que compõe o biossensor e dessa forma permitir a manipulação dos parâmetros das equações 2.10 a 2.17, as quais modelam o sistema.

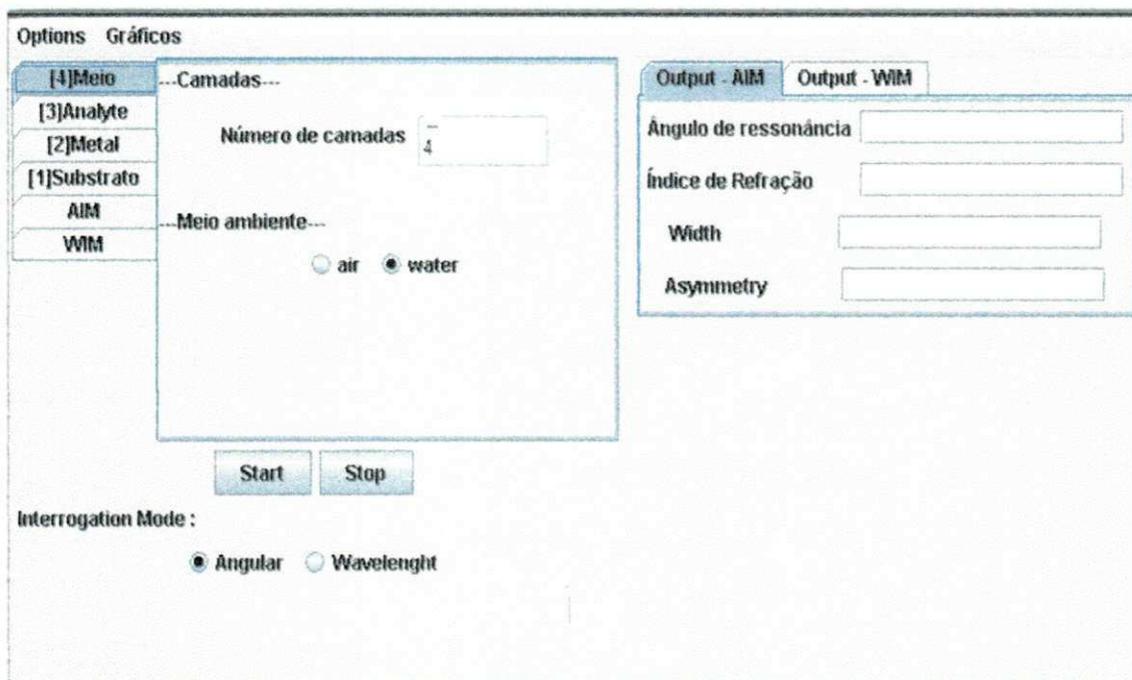


Figura 3.1 – Recorte da página web que contém o Simulador SPR. Destaque para aba “[4]Meio” que fornece as opções de “Número de camadas” e “Meio ambiente”.

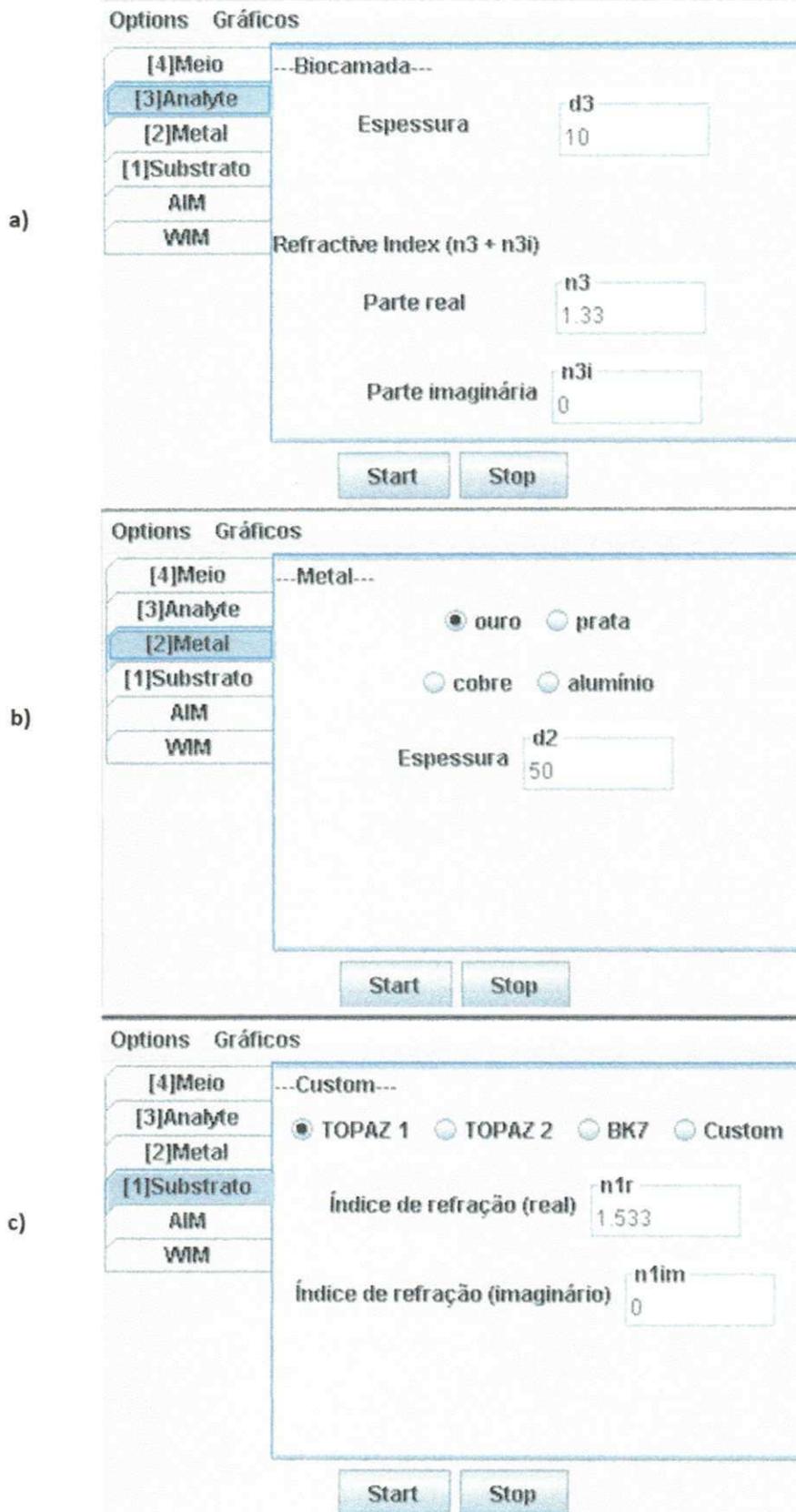


Figura 3.2 – Abas do simulador para a) configuração do analito; b) ajustes da camada metálica; c) parâmetros para o meio dispersivo;

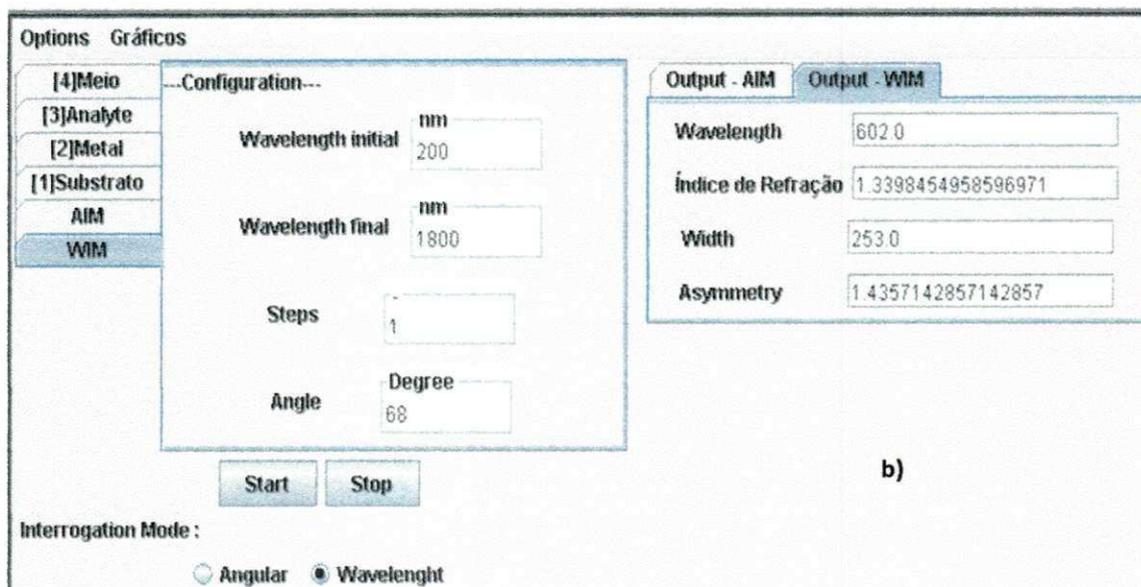
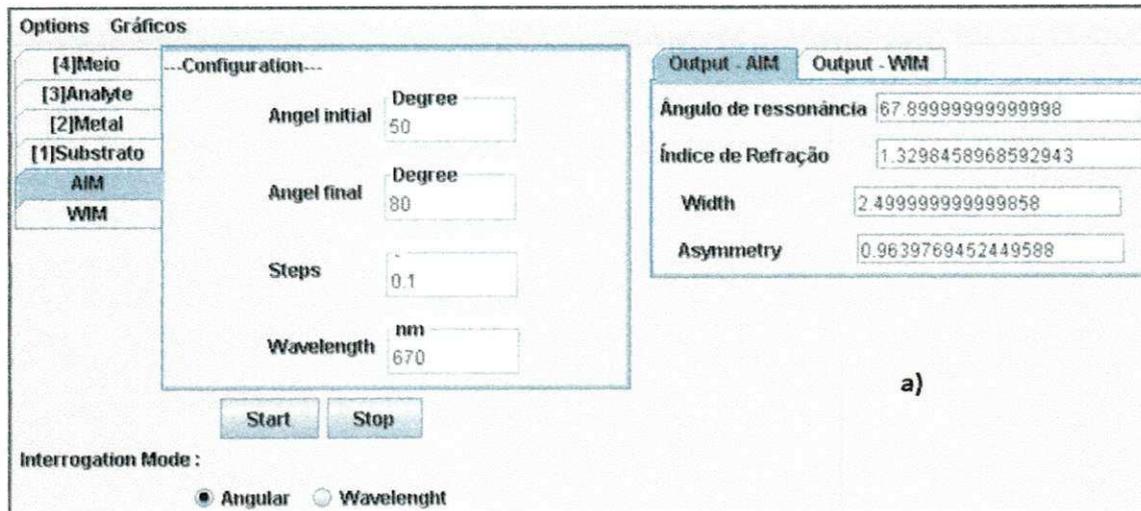


Figura 3.3 – Configuração da parte óptica para o modo a) AIM e b) WIM. Os valores obtidos com a simulação são apresentados nas abas “Output - AIM” e “Output - WIM”, respectivamente.

Na aba “[4]Meio”, a opção “Número de camadas” permite especificar a quantidade de meios que comporão o sanduíche de camadas do biossensor. Já a opção “Meio ambiente”, indicar se o biossensor está operando em um ambiente aquoso ou exposto ao ar livre, fornecendo os parâmetros n_4 e d_4 para equações 2.10 e 2.11.

No menu “Opções” é possível salvar os dados e no “Gráficos” comuta-se entre a refletividade e a transmissividade, referente as equações 2.14 e 2.15 respectivamente. O início e o fim da simulação são controlados pelos botões “Start” e

“Stop”. A opção “Interrogation Mode” permite simular o comportamento no modo angular ou espectral.

A aba “[3] Analito”, Figura 3.2a, permite ajustar a espessura (d_3) e o índice de refração complexo ($n_{3r} + in_{3im}$) da substância em análise. O metal utilizado pode ser escolhido, dentre as opções apresentadas ($n_{2r} + in_{2im}$) na aba “[2] Metal”, Figura 3.2b, e sua espessura (d_2) pode ser ajustada de forma a se obter a resposta adequada. Com isso, tem-se o valor ideal para a espessura no processo de deposição do filme metálico. É possível escolher o material dispersivo utilizado no biossensor, Figura 3.2c aba [1] Substrato, através de materiais pré-definidos ou por valores de entrada ($n_{1r} + in_{1im}$).

Os requisitos desejáveis em uma boa interface são categorizados em: requisitos relacionados às interações de modo geral, requisitos relacionados à exibição de informação e requisitos relacionados à entrada de dados [?]. Por meio da implementação de equações escalares (coeficientes de Fresnel) as interações do usuário para entrada de dados permite total análise da sensibilidade dos parâmetros bem como. As abas “AIM” e “WIM” possibilitam a configuração das condições de operação do biossensor, tais como a característica da fonte de luz e geometria da montagem.

A resposta simulada para o fenômeno SPR é apresentada em uma nova janela de acordo com o modo de interação (Angular ou Espectral) escolhido, Figuras 3.4, tornando a exibição dos resultados propícia para o entendimento sob diferentes condições de operação. Os valores referentes à morfologia da curva SPR, por meio de (2.16) e (2.17), ao índice de refração, através (2.18) para o modo AIM e de (2.21, 2.22) para o modo WIM, e os mínimos das curvas são apresentados em abas separadas para cada modo, conforme ilustra as Figuras 3.3. Nelas também se encontram

3.2.1 Processamento

As principais técnicas implementadas no processo de extração de informação de biossensores baseados no fenômeno SPR podem ser divididas em três categorias: a) algoritmos para pré-processamento da imagem do transdutor b) algoritmos para extração das características da curva SPR tais como mínimo, largura e assimetria e c) técnicas para suavização da curva SPR.

A seguir serão apresentadas as técnicas presentes no simulador.

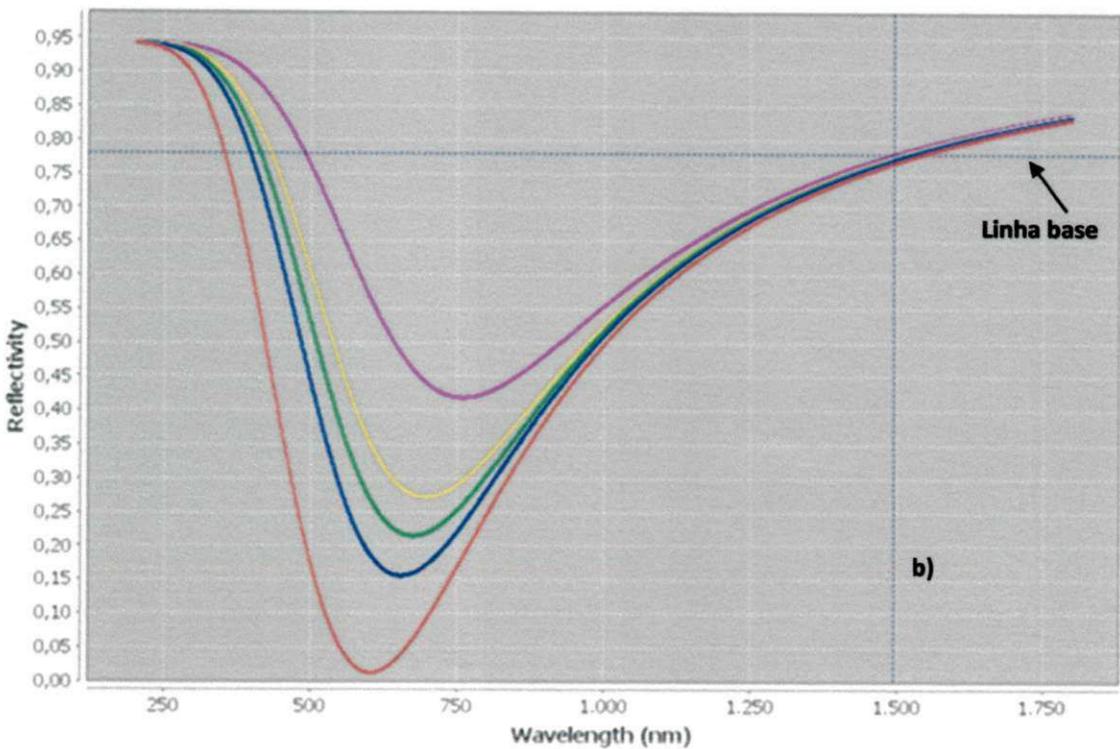
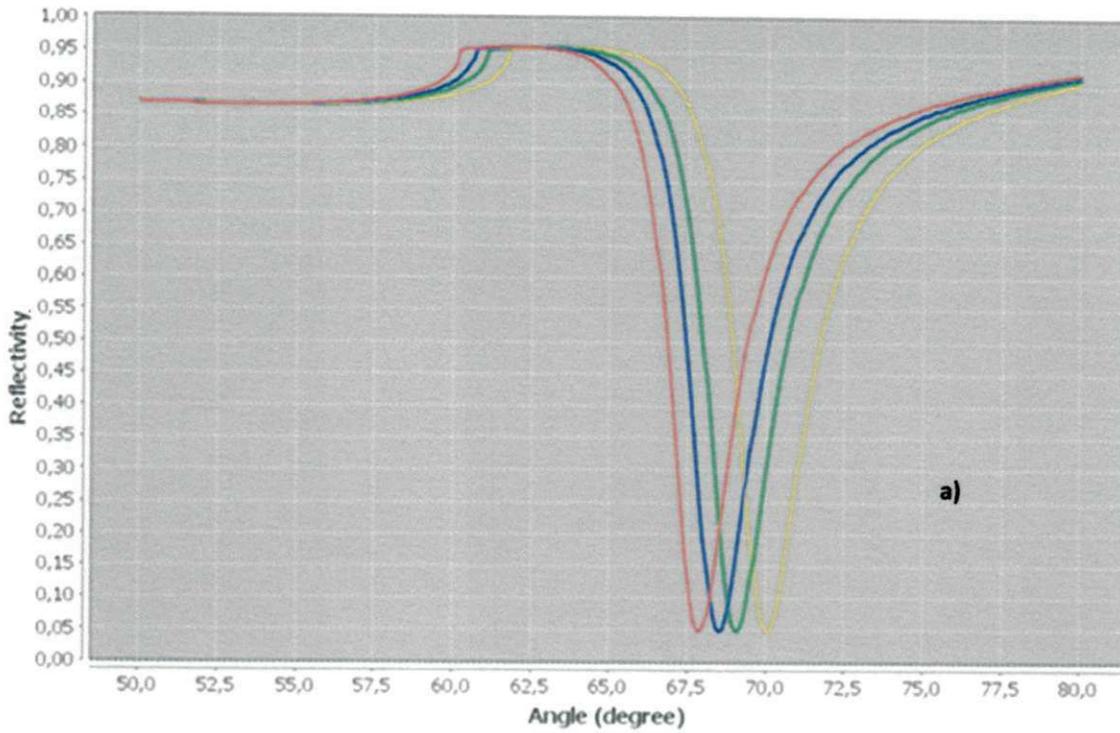


Figura 3.4 – Curvas SPRs simuladas para diferentes substâncias tanto no modo de interrogação a) angular quanto no modo de interrogação b) espectral. Exemplo do posicionamento da linha base (modo WIM).

A simulação dos dados relativos ao transdutor possibilita calcular os valores que caracterizam o fenômeno. O sinal (imagem) proveniente do transdutor constitui de um conjunto de valores para cada pixel do elemento sensível (CCD), denotado por $X(n)$. Para tanto, realiza-se as seguintes tarefas:

a) **Calcular a curva SPR:** para o cálculo da curva SPR, um sinal de referência deve ser armazenado para calibração do sensor. O sinal correspondente ao ar é usado como referência. Em seguida, monitora-se ininterruptamente a superfície sensível. Tomando o ar como sinal de referência, $X(n)_{AR}$, calcula-se a curva SPR dividindo o sinal atual, $Y(n)$, pela referência:

$$SPR(n) = \frac{Y(n)}{X(n)_{Air}} \quad (3.1).$$

b) **Determinar o valor mínimo da curva SPR:** conforme descrito na seção 2.3.3, o valor mínimo representa o momento em que ocorre a ressonância. As técnicas implementadas são:

i. **“Caça ao mínimo”** (*minimum hunt*): consiste em um algoritmo simples de busca pelo valor mínimo da curva SPR [43];

ii. **Primeiro Momento** (centróide): determina o valor do comprimento de onde de ressonância por meio do cálculo do centro geométrico da curva SPR [43]. O algoritmo é aplicado a valores que estão abaixo de um limiar pré-estabelecido, conhecido como **linha base**. Assim o valor do centróide calculado para os pontos que estão abaixo da linha base (Figura 3.4b):

$$C(n) = \frac{\sum_i (X(n)_i - \text{linhabase})i}{\sum_i (X(n)_i - \text{linhabase})} \quad (3.2),$$

em que $X(n)_i$ representa o valor do pixel i ;

iii. **Ajuste polinomial:** consiste em aproximar a curva SPR, ou a região próxima ao mínimo ao mínimo da curva, a um polinômio de grau n do tipo $P_n = a_0 + a_1x + \dots + a_nx^n$, como ilustra a Figura 3.5. O valor que minimiza o polinômio obtido representa o comprimento e/ou ângulo de ressonância, a depender da característica de interação investigada.

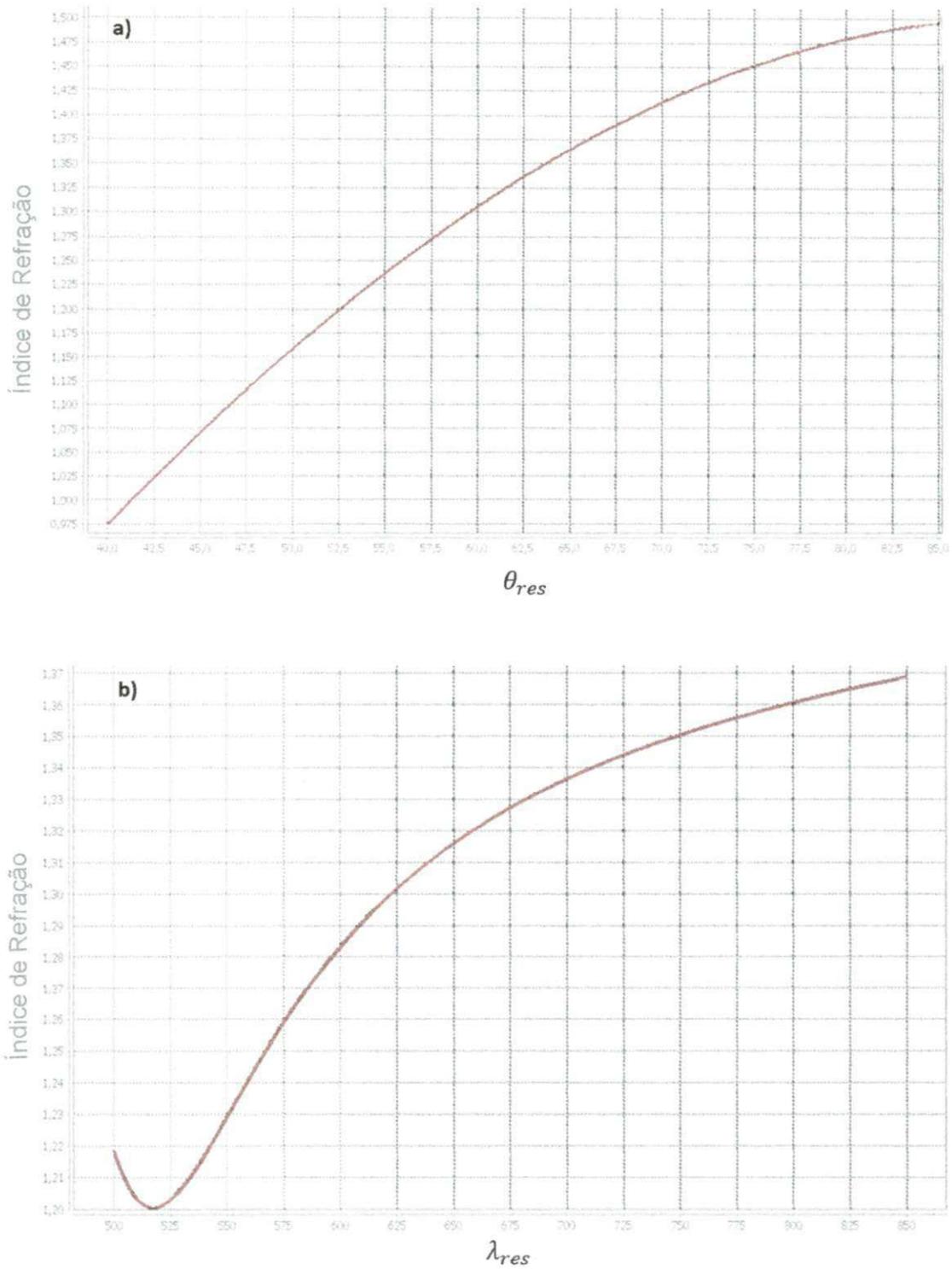


Figura 3.6 – a) Resposta simulada para o cálculo do índice de refração no modo AIM
 b) Resposta simulada para o cálculo do índice de refração para biossensor SPR no modo WIM

Após entender o comportamento do biossensor, por meio das respostas previstas pelo simulador, um levantamento de todas as partes ópticas, mecânicas, eletrônicas e outras partes necessárias para construção do sistema que representa o biossensor foi realizado. Em seguida, um estudo de como rearranjá-las em uma estrutura física foi realizado, cujo desfecho são as montagens físicas do equipamento, apresentadas na Figura 5.16 referentes a UACPE (Unidade de Aquisição, Controle, Processamento e Exibição), a montagem para o modo AIM e WIM.

O desenvolvimento dos softwares controladores dos transdutores ópticos controlados pela UACPE, descritos na seção 5.3.2, foi constituído das etapas descritas a seguir:

- **Planejamento** – Nesta etapa foi delimitado o objetivo principal do projeto, definidos e organizados os conteúdos de cada software. Também foi definido o público alvo ao qual se destina o sistema.

- **Autoria** – Também denominada implementação, consistiu em implementar o projeto nas linguagens de programação Java, para o software do modo WIM e em LabWindows/CVI [37] para o modo AIM. A ferramenta utilizada para o desenvolvimento do modo WIM foi o Eclipse. Sua escolha deveu-se por ser um SDK (Software Development Kit) totalmente livre e por ser uma das ferramentas de desenvolvimento mais utilizadas no mundo. Já para o modo AIM utilizou-se o LabWindows/CVI uma vez que o *driver* do transdutor para o modo AIM foi desenvolvido para essa plataforma.

- **Testes** – O software passou por testes com os integrantes do Laboratório de Biossensores da Universidade Federal de Campina Grande na busca de uma avaliação técnica. Após os testes, o software foi embarcado na UACPE e o biossensor encaminhado à validação comparativa com outros sistemas de análise de interações biomoleculares.

O teste teve como objetivo testar a funcionalidade, eficiência, desempenho e correção da implementação comparando-os com o documento de requisitos. A partir de então, realizou-se o “Teste de Execução” para verificar os tempos de resposta de processamento e o desempenho (performance), avaliando o comportamento do software no ambiente em que se realizaram os experimentos.

Para validar os resultados obtidos com o biossensor proposto, realizou-se uma investigação comparativa entre as respostas para ambos os modos de operação e

estas com os resultados obtidos pelo equipamento VirTech [38]. A validação ocorreu seguindo as etapas descritas a seguir:

Etapa 1 – conformidade da curva SPR: Nesta etapa foi analisado a resposta SPR obtida pelas duas montagens do biossensor proposto e comparadas com a resposta SPR do VirTech e com a curva SPR simulada.

Etapa 2 – comparação entre os índices de refração: Uma vez que o sistema VirTech possui apenas o sensorgrama referente ao índice de refração, este foi então comparado com os sensorgramas do modo WIM e AIM. Os demais sensorgramas disponibilizados pelo biossensor proposto (sensorgrama para a largura, assimetria, comprimento de onda e ângulo de ressonância) foram comparados entre os modos WIM e AIM para verificar a equidade das respostas.

Os experimentos consistem na verificação do comprimento de onda de ressonância, ângulo de ressonância, e conseqüentemente no índice de refração, para diferentes substâncias aquosas presente na superfície sensível do prisma óptico. Um dos principais aspectos que ameaçam o experimento são as condições térmicas do ambiente, visto que a sensibilidade do comprimento de onda/ângulo de ressonância em função da temperatura, expressas pelas equações abaixo:

$$S^{\lambda}(T) = \left| \frac{\partial \lambda_{res}}{\partial T} \right| \quad (3.3)$$

$$S^{\theta}(T) = \left| \frac{\partial \theta_{res}}{\partial T} \right| \quad (3.4),$$

decrecem a uma taxa de $-0,64nm/K$ e $-0,02^{\circ}/K$ respectivamente, conforme descrito em [39]. Os resultados obtidos em [39] não podem ser diretamente aplicados no biossensor proposto uma vez que foram obtidos para o sensor SPR Spreeta [40], sensor estes extremamente sensível a mudanças térmicas devido a características intrínsecas a sua estrutura pequena que encapsula os elementos ópticos e eletrônicos em um único invólucro.

As substâncias utilizadas nos experimentos foram devidamente inspecionadas para que não houvesse diferenças entre as substâncias utilizadas pelos diferentes sistemas (WIM, AIM e VirTech).

Capítulo 4

Sistema computacional para biossensor baseado no fenômeno SPR

4.1 Introdução

Um sistema computacional é aquele que automatiza ou apoia a realização de atividades humanas a partir do processamento de informações. Nesse sentido, tais sistemas caracterizam-se por alguns elementos fundamentais:

- *Hardware* - corresponde às partes eletrônicas e mecânicas que possibilitam a existência do software, o armazenamento de informações e a interação com o usuário;
- *Software* - é a parte abstrata do sistema computacional que funciona no hardware a partir de instruções, as quais permitem o processamento e armazenamento de informações;
- *Informações* – os dados processados que representam elementos do domínio que tornam o sistema útil para os usuários;
- *Usuários* – elemento humano que interage com o sistema a fim de satisfazer suas necessidades com a utilização do mesmo, motivo pelo qual um sistema é desenvolvido;

- *Procedimentos ou Tarefas* – compreendem as atividades que o sistema realiza ou permite realizar, tarefas estas que caracterizam a funcionalidade do sistema;
- *Documentação* – envolve os *manuals de usuário*, com informações para o usuário utilizar o sistema e a *documentação do sistema* que descrevem a estrutura e o funcionamento do sistema.

Neste capítulo é descrito os requisitos e componentes envolvidos no sistema computacional utilizado neste trabalho. Os requisitos apontam para as questões envolvendo as funcionalidades que a UACPE alicerça para as ações disponíveis ao usuário.

4.2 Componentes do sistema embarcado para o biossensor proposto

Conforme ilustrado na Figura 2.1, um biossensor possui uma **Unidade de Aquisição, Controle, Processamento e Exibição - UACPE** dos dados para que o usuário possa acompanhar todas as etapas do processo de análise de substâncias. Tal unidade é no presente trabalho tratada como um *sistema embarcado*.

Tipicamente, um sistema embarcado possui uma unidade central de processamento (CPU) que a partir de um software armazenado em uma memória gerencia os estímulos aplicados no ambiente bem como capta as respostas emanadas do mesmo, além de gerenciar todas as interrupções provenientes dos periféricos. Observa-se na Figura 4.1 que o uso de conversores AD e/ou DA pode ser necessário para controlar sensores e atuadores.

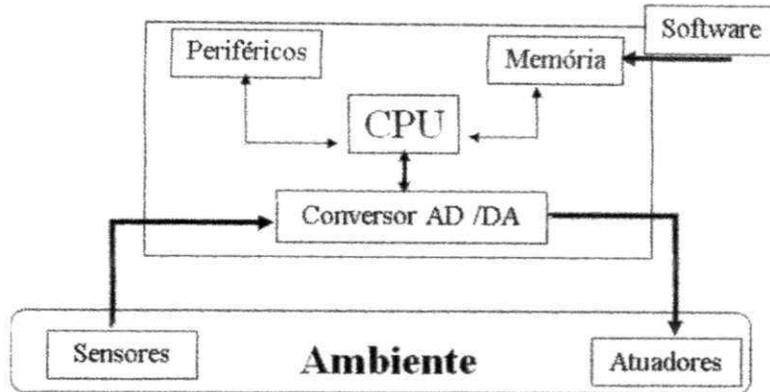


Figura 4.1 – Diagrama em blocos de um sistema embarcado.

4.2.1 Descrição do projeto

O projeto consiste no desenvolvimento da UACPE para um biossensor SPR além da integração entre todas as partes que compõem o sistema. A UACPE deve ser capaz de adquirir os dados provenientes do sensor, o transdutor óptico-elétrico, processá-los para se obter a resposta SPR e apresentá-los de forma gráfica ao usuário (Figura 4.2).

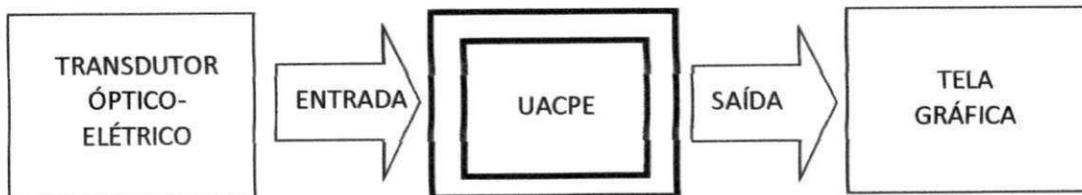


Figura 4.2 – Diagrama em blocos do sistema embarcado para um biossensor.

Aspectos Gerais

Comunicação

A UACPE deve ser capaz de se comunicar com o transdutor óptico-elétrico para a captura do sinal referente aos coeficientes de refletividade de Fresnel, ver seção 4.2. O transdutor fornece duas interfaces de comunicação: USB 2.0 e RS-232.

Processamento da informação

A carga de processamento concentra-se na aquisição dos dados e na geração da curva SPR. Além disso, há a troca de informações para configuração dos equipamentos e atualização dos dados renderizados na tela.

Controle automático

A UACPE deve ser capaz de determinar se o(s) dispositivo(s) necessário(s) ao seu funcionamento está(ão) operacional(ais) e indicar possíveis falhas ao usuário, falhas terão um papel secundário neste projeto, há apenas a informação da presença ou ausência do(s) dispositivo(s). O controle da comunicação entre o modelo e o transdutor deve ser de forma automática sem a intervenção do usuário.

Interface homem-máquina

A interface homem-máquina deve permitir que o usuário inicie o processo de aquisição e reset do sistema caso necessário. O acompanhamento do fenômeno deve ser por meio de gráficos renderizados em um display gráfico.

Função de atuação

A UACPE deve excitar o efeito SPR controlando o acendimento do LED, fonte luminosa, e sincronizar a geração dos sinais a partir de um *trigger* controlador do transdutor.

Diante da apresentação dos Aspectos Gerais, incrementa-se o diagrama em blocos do sistema embarcado para o biossensor, apresentando-o na Figura 4.3.

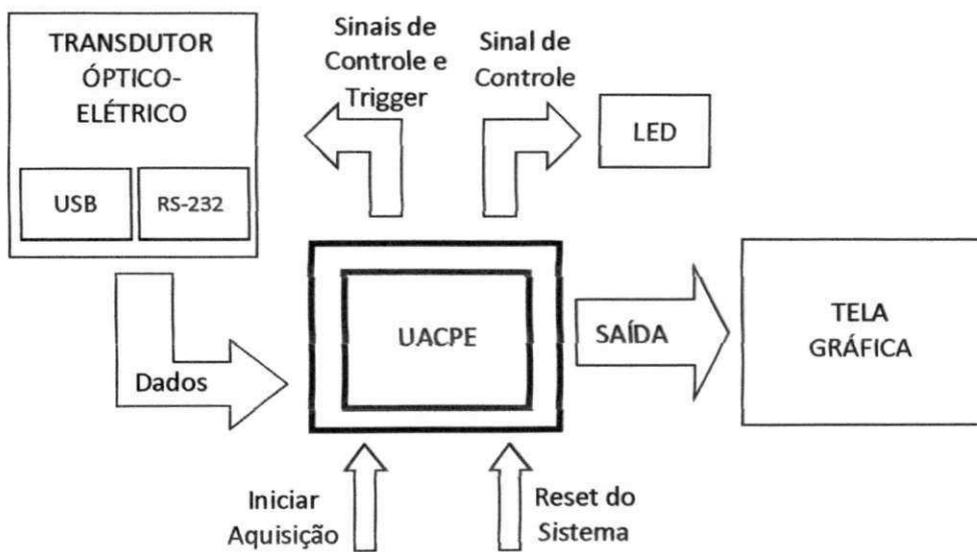


Figura 4.3 – Diagrama em blocos expandido do sistema embarcado para um biossensor.

4.2.2 Análise de Requisitos Funcionais

O diagrama de caso de uso que norteia a concepção do sistema computacional para o biossensor proposto está representado na Figura 4.4. Partindo da descrição do projeto, subseção 4.3.1, chega-se às ações passíveis de execução por parte do usuário e da UACPE. Analisando o diagrama, observa-se que o usuário fornece os parâmetros de controle do biossensor enquanto a UACPE disponibiliza os resultados.

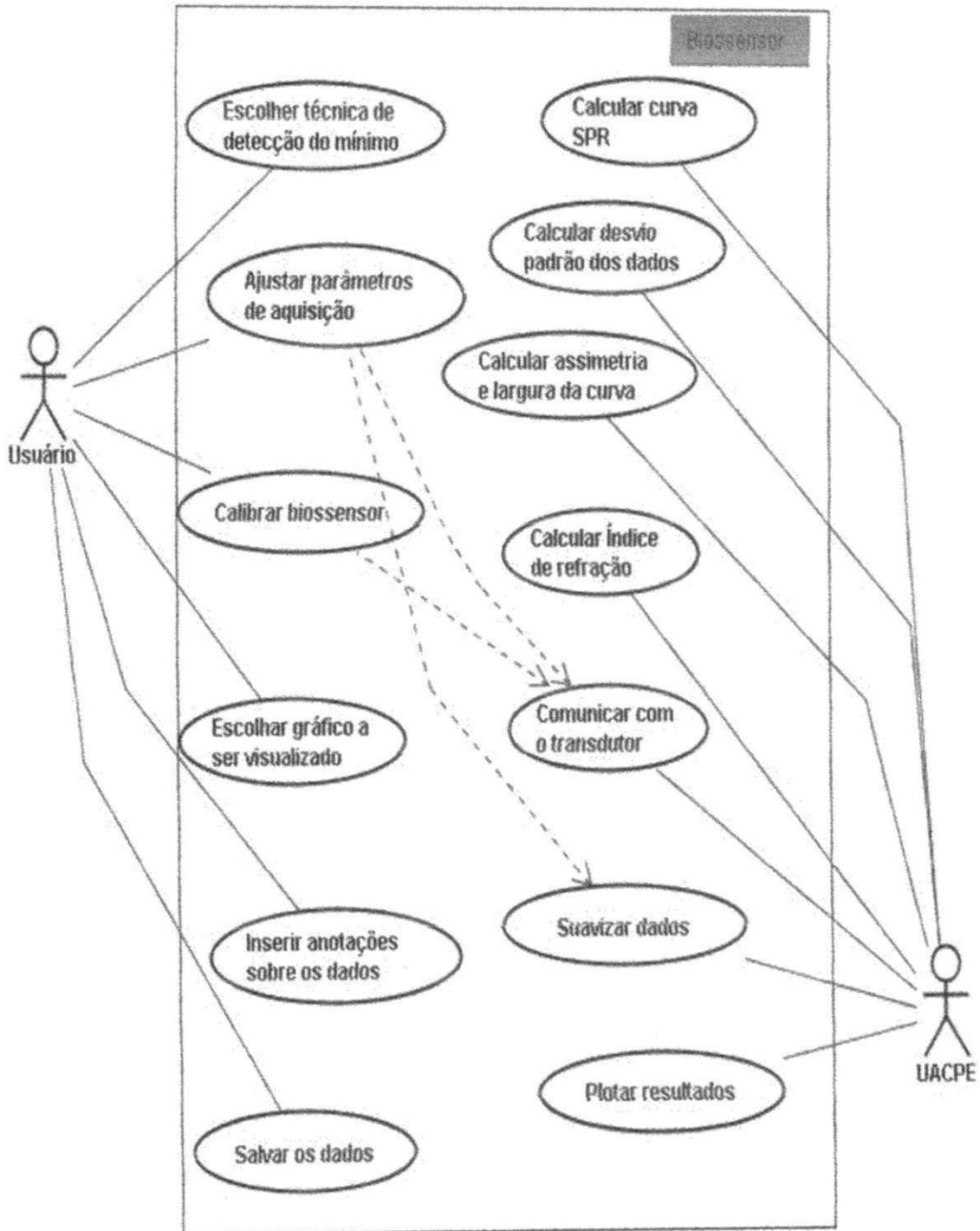


Figura 4.4 – Diagrama de caso de uso do biossensor proposto

4.2.2.1 Ações da UACPE

As ações que a UACPE realizará consistem em:

1. **Excitar o efeito SPR:** uma vez que todas as condições para que ocorra o fenômeno SPR, descritas na seção 2.3.2, a UACPE será responsável por controlar o momento em que se deve ligar/desligar a fonte luminosa;

2. **Comunicar com o transdutor:** a troca de informações entre a UCPE e o transdutor óptico-elétrico será a partir do protocolo de comunicação USB 2.0.

3. **Processamento dos dados relativos ao fenômeno SPR:** o processamento dos dados oriundos do detector foi apresentado na seção 3.2.1.

4. **Suavizar dados:** a suavização consiste pré-processar o sinal do detector. Utilizar-se-á as seguintes técnicas para melhorar a qualidade do sinal capturado:

a) **Média móvel:** consiste em uma suavização do sinal a partir da média de um conjunto de L pixels ao redor do pixel atual. Assim, um novo espectro é gerado em que cada pixel é uma média dos L pixels ao seu redor. Seja $X(n) = \{x_1, x_2, \dots, x_w\}$ os valores dos pixels provenientes do detector, o filtro da média móvel gera um novo sinal cujas amplitudes são expressas por:

$$Y(n) = \frac{x(n)+x(n-1)+\dots+x(n-L+1)}{L} \quad (4.1)$$

b) **Média espectral:** permite uma redução do ruído na imagem adquirida por meio da aquisição de múltiplas imagens, produzindo uma única imagem como resultado da média das m imagens consecutivas. Seja $S = \{X(n)_1, X(n)_2, \dots, X(n)_w\}$ um conjunto de várias imagens, o novo sinal possuirá as seguintes amplitudes:

$$Z(n) = \frac{1}{m} \sum_{j=0}^m X(n)_j \quad (4.2)$$

5. **Plotar resultados:** exibir gráficos do processo experimental. As análises são baseadas nos seguintes gráficos:

- a) **Curva SPR:** curva obtida pela intensidade luminosa normalizada *versus* comprimento de onda;
- b) **Referência:** gráfico que mostra os valores dos pixels do momento em que foi tomado o sinal de referência;
- c) **Resposta da fonte luminosa:** gráfico que mostra a resposta, em tempo real, do transdutor;
- d) **Sensorgrama:** gráficos do índice de refração, comprimento de onda e/ou ângulo de ressonância, assimetria e largura ao longo do tempo.

4.2.2.2 Ações do Usuário

O usuário por sua vez fornecerá os parâmetros que regem os algoritmos descritos anteriormente, descritas nas ações:

- Escolher técnica de detecção do mínimo;
- Ajustar parâmetros de aquisição;
- **Calibrar o sensor:** momento em que o usuário deseja capturar o sinal referente ao Ar.

Pode também, manipular os resultados de acordo com as suas necessidades, expressa nas ações abaixo:

- **Escolher gráfico a ser visualizado:** o usuário escolhe o resultado que se pretende visualizar no momento dentre os resultados gráficos fornecidos pela UAPCE;
- **Inserir anotações sobre os dados:** inserção de comentários no sensorgrama para identificação das etapas do processo de análise;
- **Salvar dados:** o usuário, a qualquer momento, pode persistir os dados referentes às medições que realizou e visualizá-los em um momento oportuno.

4.2.3 Análise de Requisitos Não-Funcionais

a) Aspectos Gerais

Acurácia

A consistência dos dados fornecidos ao usuário deve ser verificada para que esses reflitam sempre a interação biomolecular do momento.

Interoperabilidade

O UACPE deve ser desenvolvida de forma modular, permitindo que novas partes possam ser acopladas sem perda de funcionalidade.

Conformidade

O biossensor deve estar em conformidade (similaridade operacional) com outros sistemas analíticos de interações biomoleculares baseado no fenômeno SPR tais como VirTech e o Spreeta 5, da empresa ICx Nomadisc.

Segurança

A UAPE não estabelecerá nenhum tipo de proteção para os dados adquiridos (dados armazenados de forma criptografada, senhas de acesso etc.). Como exemplo de segurança, pode-se citar a omissão do resultado quando empregado na detecção de doenças ditas discriminatórias como o HIV.

b) Confiabilidade

Tolerância a falhas

As falhas terão um papel secundário nesse modelo. Há apenas a checagem da presença dos componentes essenciais ao funcionamento do biossensor e se os sinais do transdutor, adquiridos pela UACPE, estão corretos.

Recuperabilidade

Na ocorrência de instabilidades no funcionamento do biossensor, a recuperação deverá ser feita por meio da sua reinicialização. Tal procedimento não realizará o resguardo das informações já processadas e não salvas, ou seja, haverá perda do processamento e o seu reinício deverá ser realizado.

c) Usabilidade

O biossensor deve possuir uma interface de comunicação com o usuário de fácil assimilação para pessoas familiarizadas com os parâmetros envolvidos na análise de interações biomoleculares por meio do fenômeno SPR.

d) Eficiência

Aquisição dos dados e taxa de *refresh* da tela gráfica

A UACPE deverá obter os dados para o processamento da forma mais rápida possível. Diante disso, utilizar-se-á o protocolo USB 2.0, em sua versão *high-speed*, em detrimento ao padrão RS-232. Os dados devem ser atualizados na tela preferencialmente a uma taxa de 1s (1Hz) ou de 0.5s (2Hz).

Comportamento no Tempo

O biossensor deve manter o comportamento ao longo do tempo. Em um momento próximo, o sistema proposto deverá perceber a sua não utilidade e permitir a liberação de recursos e desligamento da fonte luminosa.

Utilização de Recursos

O software embutido na UACPE não deve ser displicente no que tange o tamanho final do arquivo. Nesse sentido, deve-se utilizar de forma eficiente variáveis, estruturas de controle, estruturas de seleção e *multithreading*. Priorizar estruturas de dados simples, tipos de dados nativos e vetores. Estruturas complexas como *ArrayLists* e *Collections* dificultaram futuras traduções da UACPE para um hardware específico (SoC, ASIP etc.).

e) Análise de restrições

Restrições de custo

O biossensor possui restrições de custo por ser um trabalho acadêmico. Assim, todos os componentes ópticos e mecânicos além dos transdutores utilizados, serão os presentes no Laboratório de Biossensores da Universidade Federal de Campina Grande.

Condições ambientais:

O biossensor deverá assumir que o ambiente o qual estará inserido possui temperatura condizente com o seu bom funcionamento. Conforme estudos descritos em [39] variações na temperatura afetam a resposta SPR, entretanto o controle de temperatura não está embutido nesta versão da UACPE.

4.2.4 Componentes do sistema

Os elementos que compõem o sistema computacional para o biossensor SPR são apresentados na Figura 4.6. O sistema é composto por componentes fluidicos (amostrador, célula de fluxo e bomba peristáltica), componentes ópticos (lentes, *biochip* e polarizador), componentes eletrônicos (detector ou transdutor e unidade de processamento e exibição dos dados) e por componentes mecânicos que acoplam todos os componentes, formando um equipamento. Assim, o sistema computacional é a junção dos elementos que compõem o biossensor, acoplados em uma estrutura mecânica de tal forma que estes se tornem um equipamento capaz de analisar interações biomoleculares.

O design apresentado na Figura 4.5, baseada na configuração de Kretschmann-Raether, é utilizado na maior parte dos biossensores SPR devido a sua maior facilidade de instrumentação. A configuração do biossensor é composto por um prisma de alto índice de refração e uma placa com índice de refração similar onde é depositado o filme de ouro, sobre o qual é afixado o elemento de reconhecimento. Entre o prisma e a placa existe um óleo ou gel para garantir a transmissão óptica e permitir a troca da superfície sensível. O feixe de luz gerado é focalizado e colimado pelo sistema de lentes, atravessa o prisma e atinge a área do elemento sensor. A luz refletida pelo filme metálico é captada por uma câmera que converte a imagem em sinal elétrico para ser posteriormente processado.

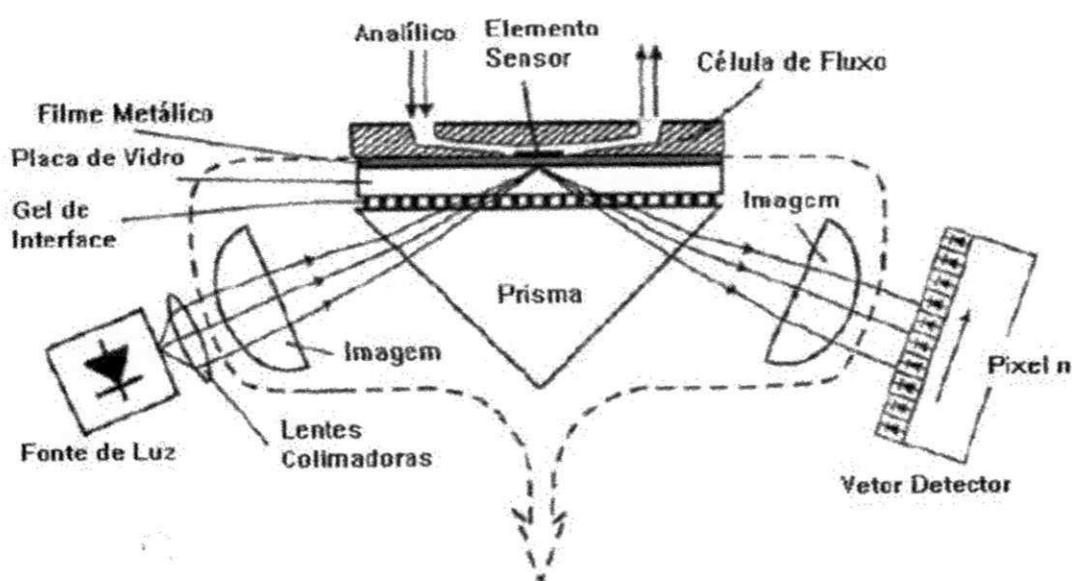


Figura 4.5 – Design de um biossensor. Montagem de Kretschmann-Raether

Sistema Computacional para biossensor baseado no fenômeno SPR

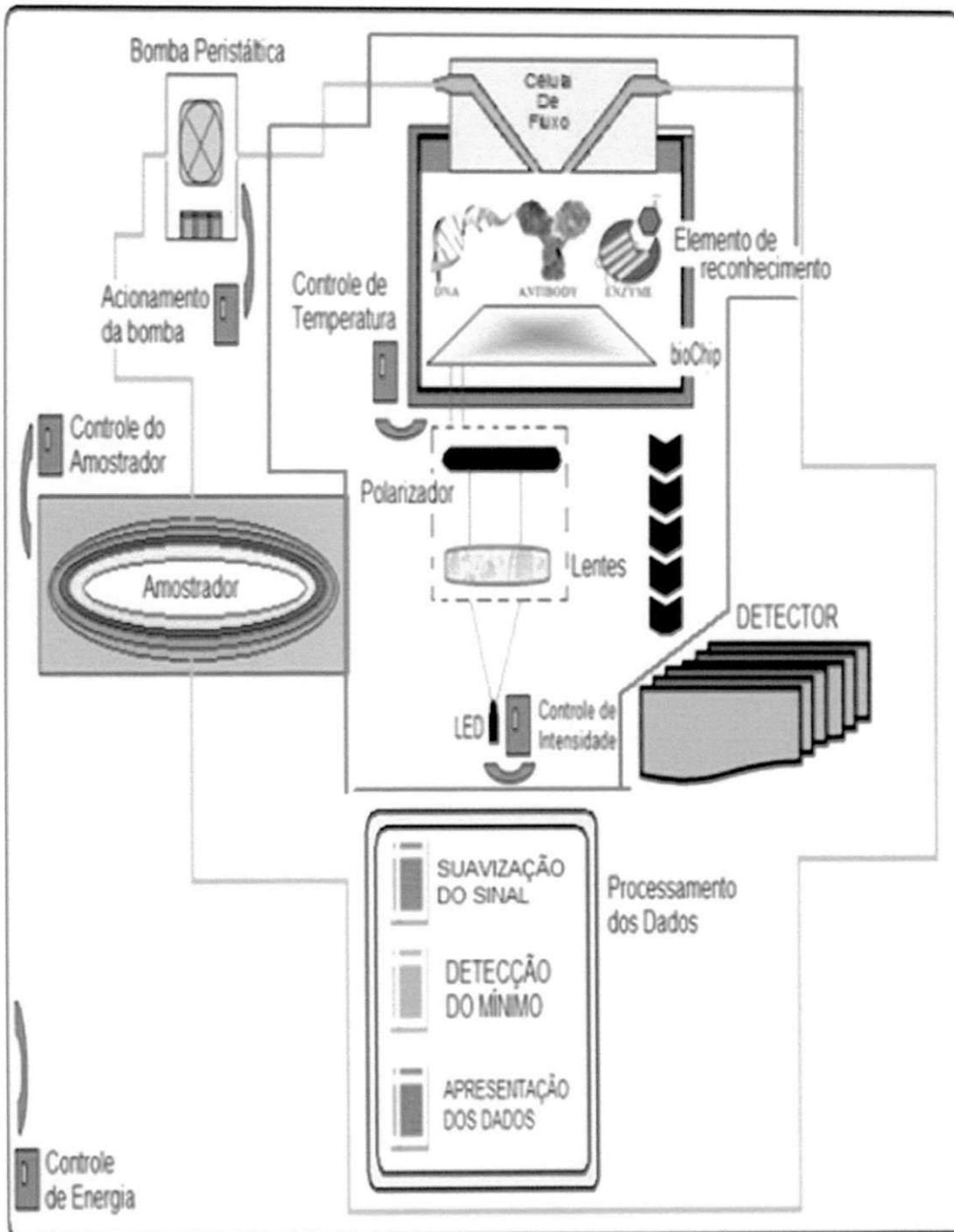


Figura 4.6 – Componentes presentes em um Sistema Computacional para biossensor SPR.

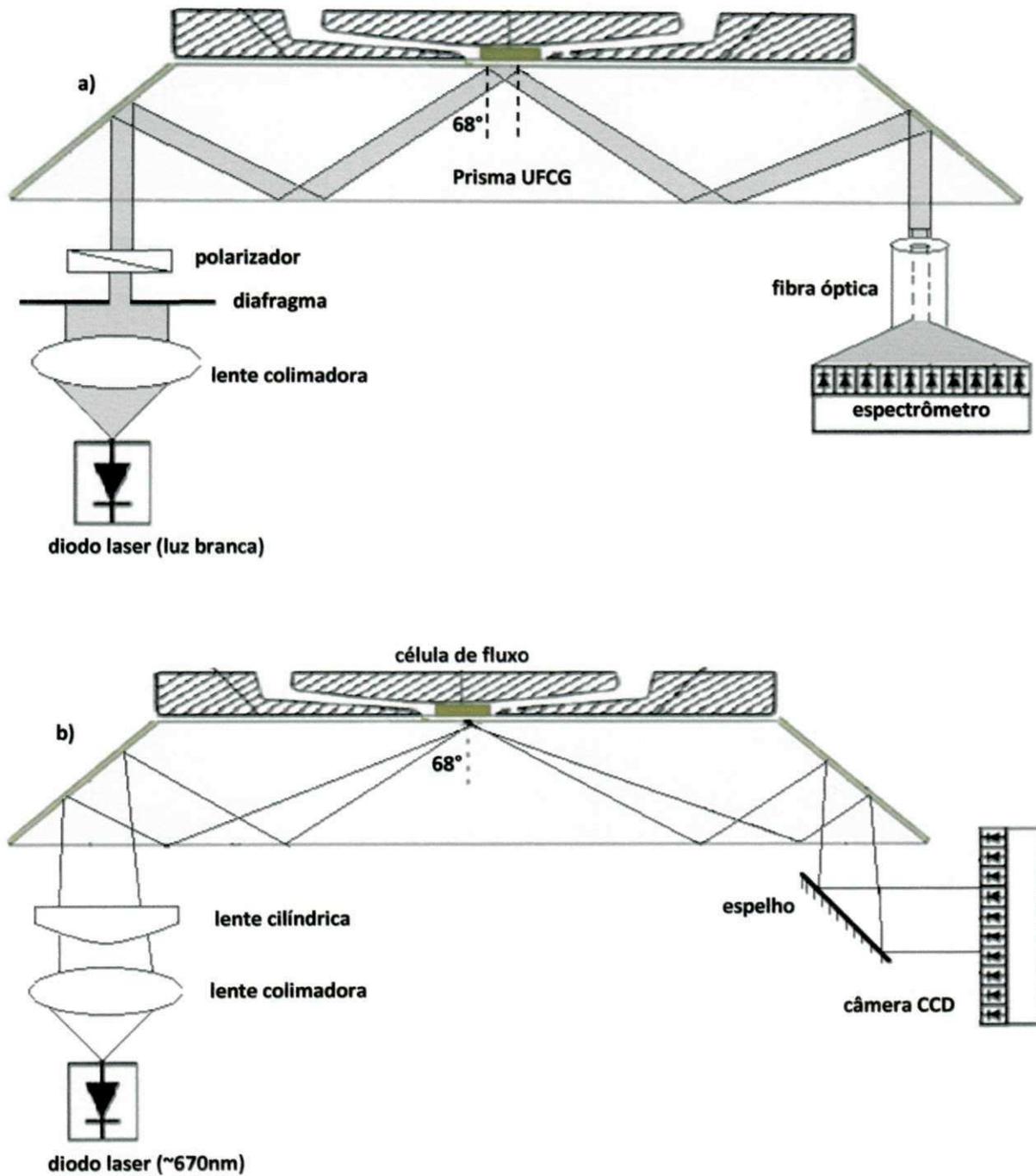


Figura 4.7 – Design da disposição dos elementos que excitam o fenômeno SPR no biossensor proposto, retirada de [7]. a) Montagem para o modo de interrogação espectral e b) para o modo de interrogação angular.

Na configuração proposta em [7] (Figuras 4.7), o prisma, o óleo e a placa são substituídos pelo **prisma óptico** [7,8,13] onde é depositado o filme metálico. A luz é gerada por um diodo *laser*, monocromático para o modo AIM e policromático para o modo WIM, e incide perpendicularmente no filme metálico. A luz refletida percorre uma fibra óptica até ser captada por um espectrômetro, no modo WIM, enquanto no modo AIM um espelho é utilizado para que a luz incida em uma câmera CCD. Faz-se necessário um conjunto óptico específico para cada montagem, como se pode observar nas Figuras 4.7.

4.2.4.1 Componentes ópticos

O conjunto lentes, polarizador e diafragma constituem o aparato necessário para ajustes da luz incidente no biossensor. Eles necessitam de ajustes posicionais precisos para a obtenção do feixe de luz colimado bem como a correta polarização (polarização transversa magnética), condições necessárias para a ocorrência do fenômeno SPR. Tal ajuste também é necessário para obtenção do foco exatamente no centro do prisma.

O polarizador TECHSPEC® Linear Glass Polarizer de 20mm [44], da empresa Edmund Optics, foi empregado nesse sistema. Com relação à lente colimadora, um estudo detalhado sobre a escolha da lente pode ser encontrado em [13].

a) Fonte de luz

Fonte policromática

A fonte luminosa utilizada é um diodo emissor de luz – *Light Emitting Diode (LED)*. Uma vez que a característica de interação entre a luz incidente e as ondas de plasma de superfície a ser medida é o comprimento de onda de ressonância, utilizou-se uma fonte policromática. O diodo de luz branca White Lambertian da empresa Luxeon Star, que produz até 45lm de brilho com uma corrente máxima de 350mA foi utilizado nesse projeto. Esse propicia uma facilidade de instrumentação, por ser montado em uma base de metal, e possuir um longo tempo de vida, cerca de 50.000 horas, tempo esse maior do que as lâmpadas de halogênio [45]. Na Figura 3.4 é apresentado o espectro da fonte de luz utilizada.

Fonte monocromática

A fonte luminosa utilizada para o modo AIM também é um diodo *laser*, entretanto monocromático e polarizado. Possui um comprimento de onda variando entre 650 a 670nm e uma potência máxima de 5 mW. A Figura 4.9 apresenta o espectro da fonte de luz utilizada.

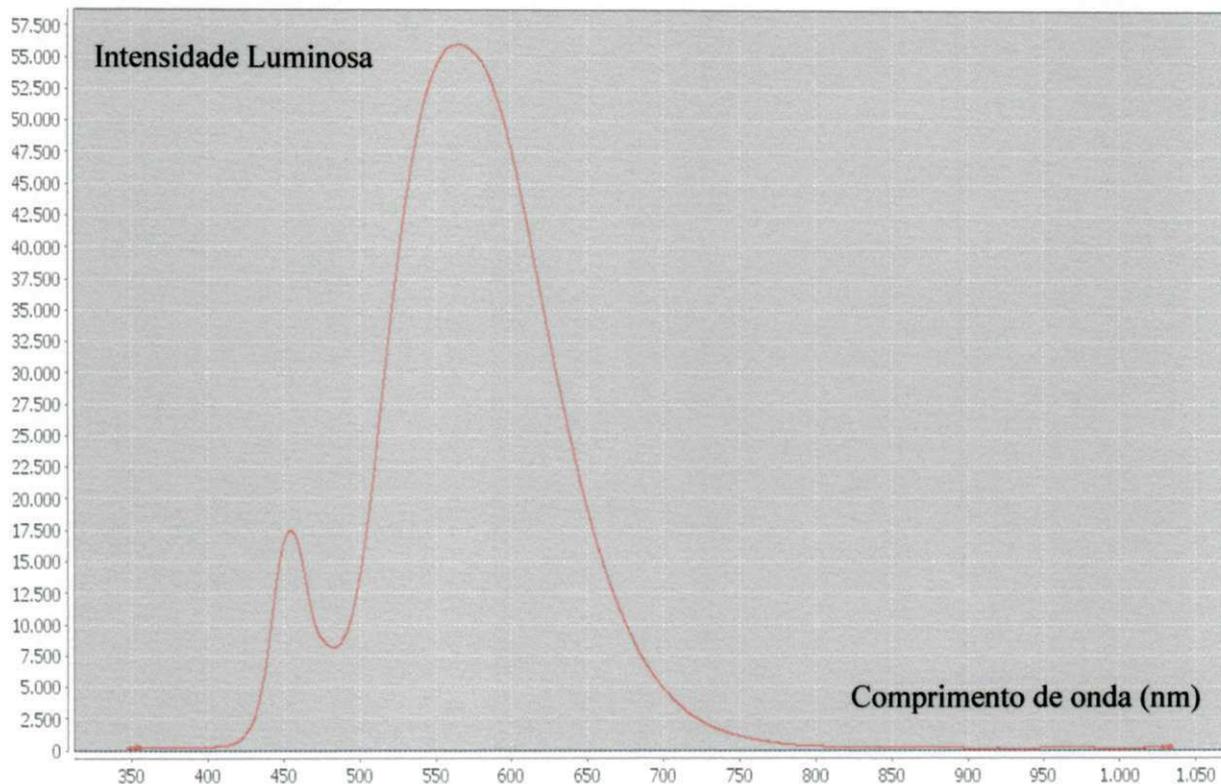


Figura 4.8 – Resposta espectral da fonte de luz policromática utilizada no biossensor.

b) Prisma óptico

O prisma óptico desenvolvido na Universidade Federal de Campina Grande, descrito em [7,8,13], foi utilizado como *biochip* do sistema. Possui tamanho reduzido, de fácil construção e com baixo custo de produção.

Sistema Computacional para biossensor baseado no fenômeno SPR

Uma das principais inovações deste *biochip* consiste no fato de ser compatível com os modos de interrogação angular e interrogação espectral.

Conforme descrito em [13], o prisma foi confeccionado utilizando o polímero *TOPAS 5013*, uma resina amorfa, transparente e de alta claridade. Seu design provê uma estrutura de fácil instrumentação, pois proporciona que:

“...os feixes luminosos de entrada se propagem perpendicularmente da fonte à base do prisma e da base do prisma ao detector óptico, o que é uma vantagem diante da maioria das configurações de biossensores SPR que necessitam de elementos mecânicos para a rotação do prisma ou da fonte luminosa para atingir o ângulo de incidência desejado.”

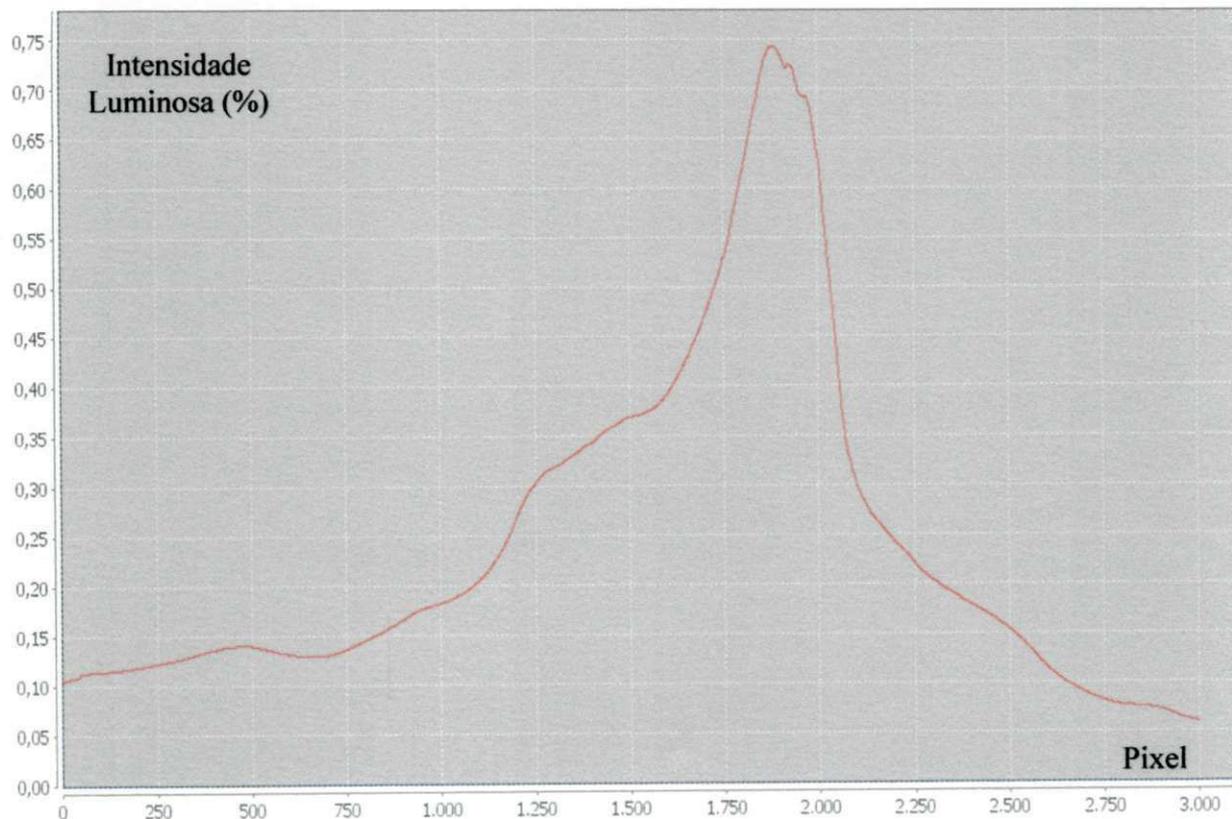


Figura 4.9 – Respostada fonte de luz monocromática utilizada no biossensor.

Sistema Computacional para biossensor baseado no fenômeno SPR

Como ilustrado nas Figuras 4.10 e 4.11, a geometria do prisma é trapezoidal. Possui uma camada de ouro com 50nm de espessura, depositada na base superior. As laterais são especulares para que haja a reflexão da luz que incide paralelamente à base inferior para o centro da base superior, com um ângulo de incidência de 68° . Devido a todas essas características, a construção do biossensor utilizando-o como *biochip* ficará menos onerosa.

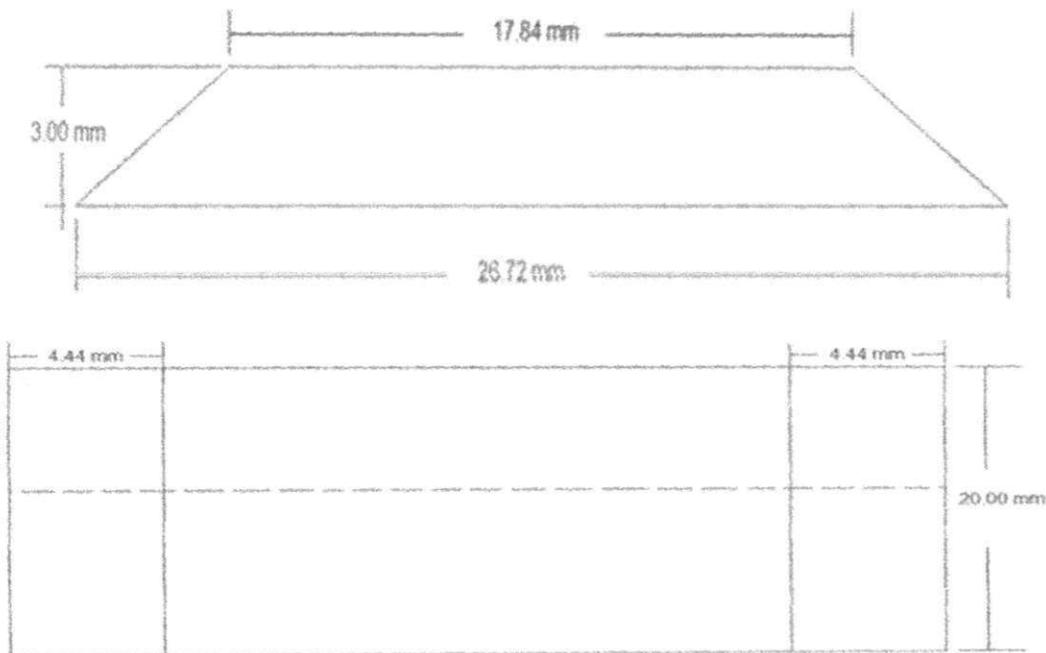


Figura 4.10 – a) Seção transversal do prisma óptico e b) vista superior.

Ainda segundo [13], valendo-se da modelagem por injeção, utilizando um molde de cobre, dezenas de chips podem ser fabricados, acarretando um custo aproximado de R\$1,00/chip.

4.2.4.2 Componentes microfluídicos

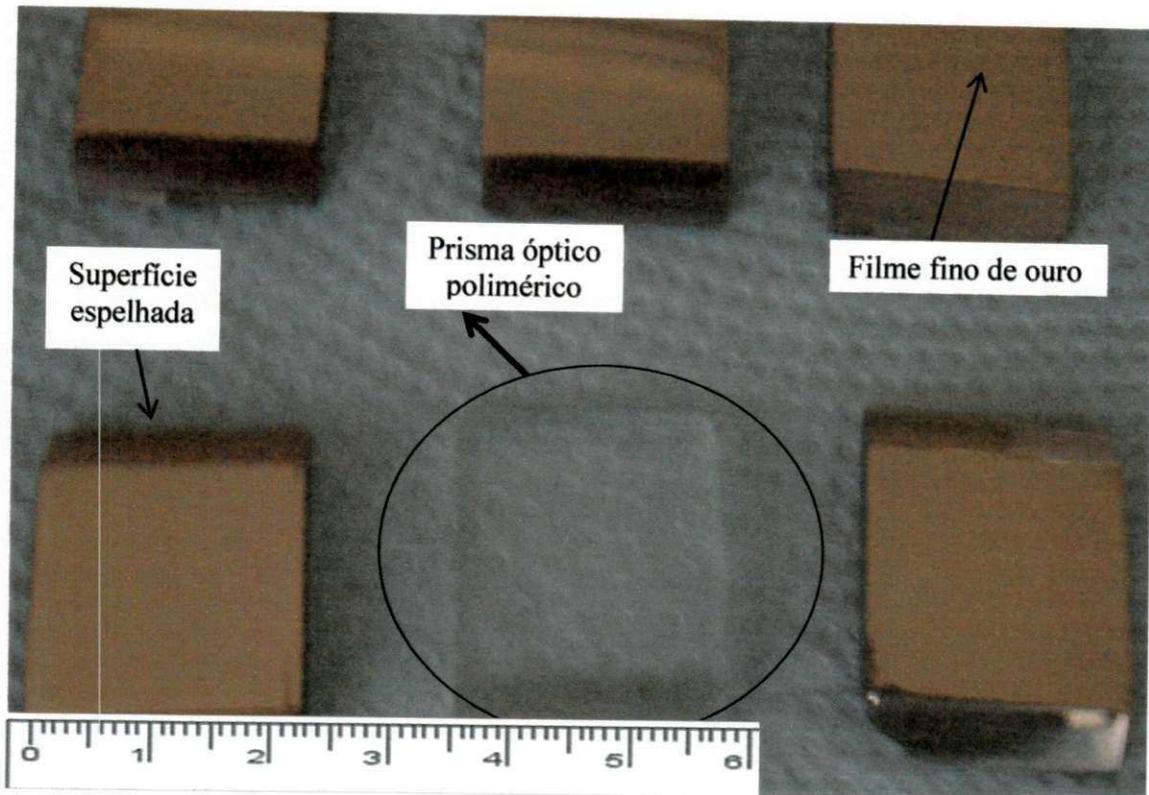


Figura 4.11 – Fotografias do prisma óptico.

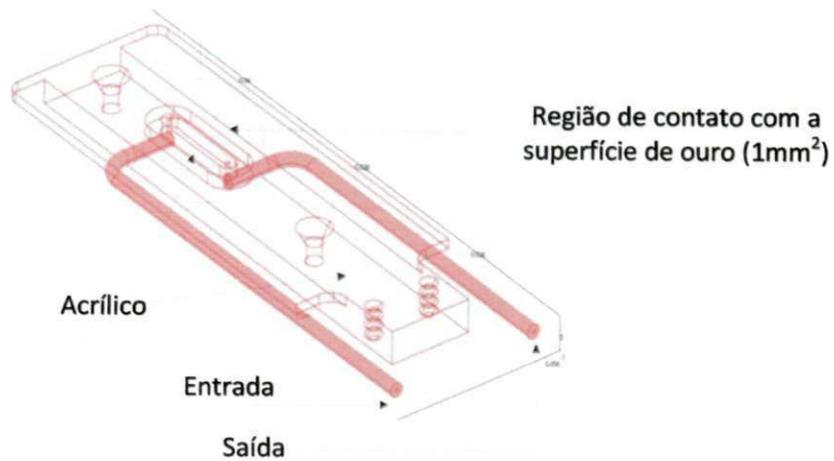


Figura 4.12 – Célula de fluxo do biossensor.

a) Célula de fluxo

A célula de fluxo, Figura 4.12, é um microcanal com dimensões e velocidade de fluxo controlada, por onde passa o analito para daí então entrar em contato com o *biochip*. A célula de fluxo acoplada no *biochip* possui cavidade com área de 1mm^2 .

b) Bomba

A plataforma utiliza uma bomba peristáltica cuja função é impulsionar o analito presente no amostrador (SAMPLER) através da *célula de fluxo*. Todos os experimentos foram realizados utilizando a bomba REGLO *Digital MS* [46] da empresa Ismatech. A bomba possui 8 roletes e pode operar a uma velocidade de 1.6–160 rpm, atingindo taxas de fluxo variando entre 0.002 – 57 ml/min.

c) Amostradores

A amostragem automática, associada aos biossensores baseado no fenômeno SPR, torna-os ainda mais atraentes no quesito ferramentas analíticas de compostos químicos/biológicos quando a quantidade de substâncias a serem analisadas é grande e o tempo em que essas ficam em contato com a superfície sensível é crítico. Entre os principais sistemas de amostragem, pode-se citar as multi-válvulas e os *autosamplers* (Figuras 4.13). Tais equipamentos exigem controles mecânicos precisos, acarretando em preços elevados.

Entre as várias alternativas para construção ou aquisição de sistemas de amostragem automática, pode-se utilizar a de Moreira *et al* [47] que propõe um *autosampler* de baixo custo com identificação dos analitos por código de barras. Entretanto, no presente trabalho todas as trocas de substâncias foram realizadas manualmente.

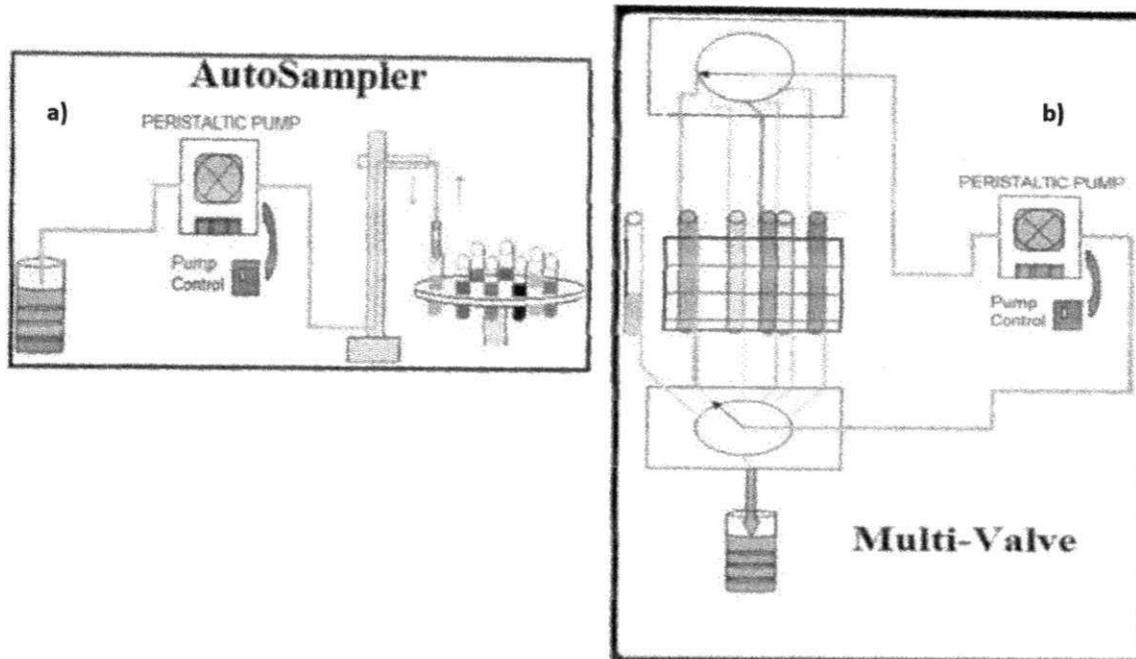


Figura 4.13 – Exemplo de sistemas automáticos de amostragem a) *autosampler* e b) multiválvula.

4.2.4.3 Estrutura física das partes mecânicas do biossensor

Modo WIM

Diante do exposto, ver-se que o conjunto $A = \{\text{lente colimadora, diafragma, polarizador, LED, biochip, célula de fluxo}\}$ compõem a estrutura interna do equipamento operando no modo WIM desenvolvido neste trabalho. A estrutura física proposta para o biossensor contendo os componentes básicos, do modo WIM, encontra-se na Figura 4.14. A fonte de luz fica na base da estrutura. Utilizando hastes e peças de encaixe específicas para montagens ópticas (comercializadas pela empresa ThorLabs) os elementos ópticos são dispostos de forma apropriada para obtenção do efeito SPR. A célula de fluxo é afixada em uma peça metálica para então aplicar-se uma pressão contra o *biochip*. Um cabo de fibra óptica é fixado na estrutura logo abaixo do prisma para captar o espectro de luz que sai do

biochip. Pode-se consultar uma imagem real do esquema proposto na montagem experimental da Figura 5.16.

Modo AIM

Já para o modo AIM, o conjunto elementos básico é composto $A = \{\text{lente colimadora, lente cilíndrica, espelho, LED, biochip, célula de fluxo}\}$. A estrutura física proposta para o biossensor contendo os componentes básicos, do modo AIM, encontra-se na Figura 4.15. O espelho é fixado na estrutura logo abaixo do prisma para captar a luz que sai do *biochip* e refleti-la na câmera CCD. Pode-se consultar uma imagem real do esquema proposto na Figura 5.16.

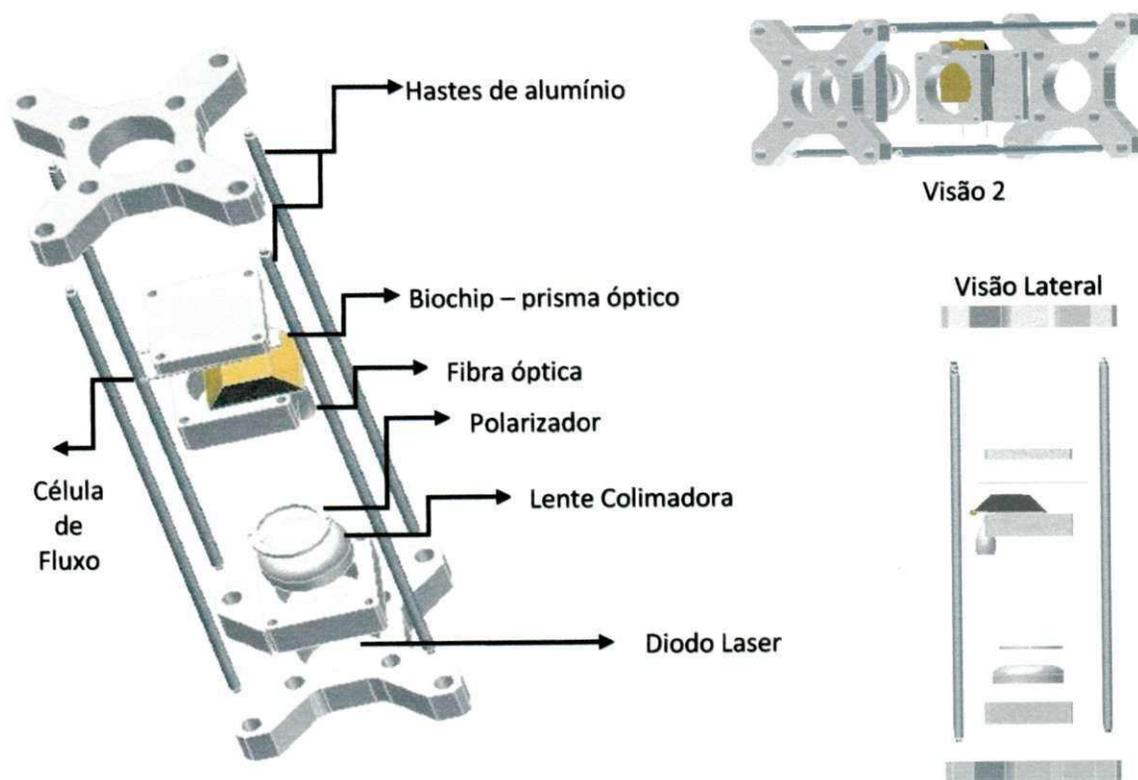


Figura 4.14 – Estrutura das partes mecânicas e outras partes que compõem o sistema embarcado do sistema biossensor proposto – WIM

4.2.4.4 Componentes Eletrônicos

Espectrômetro

O biossensor operando no modo de interrogação espectral necessita detectar a variação do comprimento de onda através do espectro da fonte luminosa. O transdutor óptico-elétrico escolhido foi o espectrômetro de fibra óptica *USB4000-VIS-NIR* [48] da empresa Ocean Optics, que cobre a faixa de comprimento de onda entre 350nm a 1000nm. O USB4000 possui conversor AD de 16bits, resolução de 0.3nm (com pixels de tamanho $8\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$) e alta relação sinal-ruído, em torno de 300:1, que permitem uma boa análise da sensibilidade refratométrica do *biochip*. Um cabo de fibra óptica em montagem adaptada foi empregado para ser utilizado em conjunto com o espectrômetro.

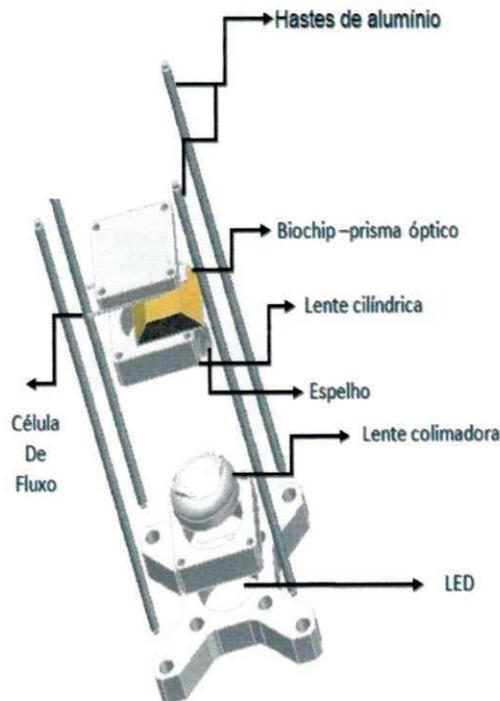


Figura 4.15 – Estrutura das partes mecânicas e outras partes que compõem o sistema embarcado do sistema biossensor proposto - AIM.

Câmera CCD

Haja vista que o biossensor proposto também pode operar no modo de interrogação angular, há a necessidade de detectar o ângulo de incidência onde ocorreu a ressonância através da intensidade luminosa dos pixels. O transdutor óptico-elétrico escolhido foi a câmera *LCI-USB Camera* [49] comercializada pela empresa Thorlabs. Com um elemento CCD unidimensional, possui conversor AD com 12 bits de resolução com pixels de tamanho $7\mu m \times 200\mu m$.

Pico-ITX

A UACPE foi desenvolvida em uma arquitetura x86 para evitar a tarefa de recompilar um driver para o espectrômetro e para a câmera CCD. A UACPE é responsável por:

- i. Verificar a correta geração do fenômeno SPR;
- ii. Controlar o(s) detector(es) óptico(s);
- iii. Processar o(s) sinal(ais) capturado(s) pelo(s) detector(es);
- iv. Suavizar a curva SPR;
- v. Detectar o momento (ângulo/comprimento de onda) em que ocorreu a ressonância;
- vi. Apresentar os resultados.

A Pico-ITX EPIA PX10000G [50], é uma mini placa-mãe de dimensões reduzidas, 10 x 7.2 cm, composta por um processador VIA C7 de 1Ghz, Chipset VIA VX770, memória principal DDR2 533Mhz SO-DIMM de 1GB, controlador VGA VIA UniChrome Pro II Graphics com MPEG-2/MPEG-4 e acelerador de vídeo WMV9, suportando uma resolução máxima de 1920x1440, conexões IDE ATA 133, SATA, LAN, USB 2.0, RS-232, LVDS/DVI, VGA além de conexões multimídia. A temperatura de operação é de 0°C~50°C sob uma umidade de 0% ~ 95% (umidade relativa, sem condensação).

4.3 Resumo

Tratou-se aqui a das partes que compõem o sistema computacional para o biossensor desenvolvido. Também descreveu-se todas as partes eletrônicas, ópticas, fluidicas e mecânicas que compõem o sistema proposto. As partes descritas são então organizadas conforme Figura 4.18.

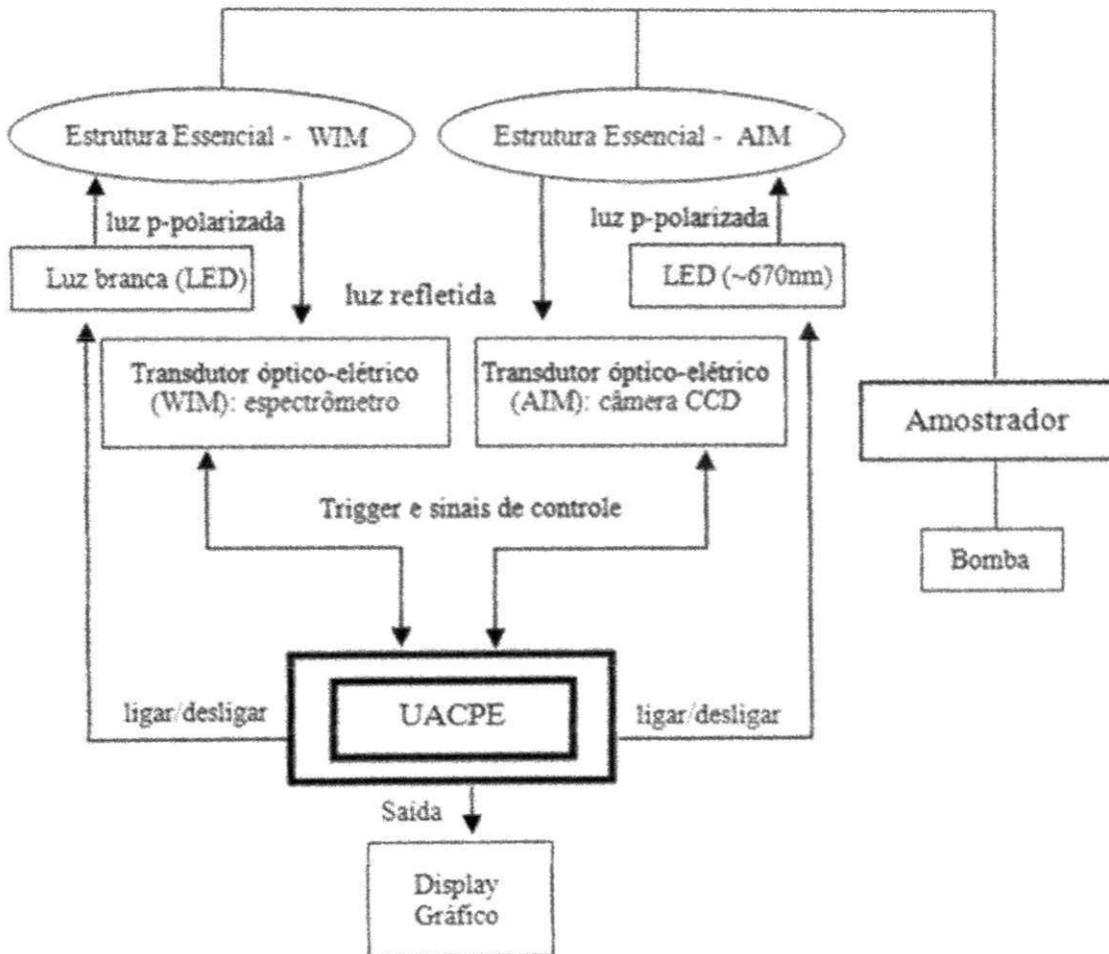


Figura 4.16 – Disposição dos elementos que compõem a plataforma para o biossensor proposto. As estruturas essenciais foram apresentadas nas Figuras 4.14 e 4.1.

Capítulo 5

Construção da solução

5.1 Introdução

Este capítulo aborda as tomadas de decisões para prova de conceito do biossensor composto pelos elementos descritos no capítulo anterior.

5.2 Respostas dos transdutores

Para a correta utilização dos transdutores óptico-elétricos faz-se necessário desenvolver a relação entre o número do pixel e sua correspondência ao comprimento de onda e/ou ao ângulo de incidência. As próximas seções relatam tal relação para os equipamentos utilizados.

5.2.1 Espectrômetro

De acordo com o fabricante, a relação entre o número do pixel e o comprimento de onda é fornecida pelo polinômio de terceira ordem descrito na equação 5.1 [51]:

$$\lambda_p = I + C_1p + C_2p^2 + C_3p^3 \quad (5.1)$$

- em que:
- λ_p , é o comprimento de onda para o pixel p ;
 - l , o comprimento de onda do pixel θ ;
 - C_1 , o primeiro coeficiente do polinômio ($nm/pixel$);
 - C_2 , o segundo coeficiente do polinômio ($nm/pixel^2$);
 - C_3 , o terceiro coeficiente do polinômio ($nm/pixel^3$);
 - p , o número do pixel;

O equipamento já vem calibrado de fábrica, mas devido a condições ambientais e com o tempo de uso todo espectrômetro sofre uma descalibração. Para o processo de ajuste dos coeficientes de calibração do USB4000, captura-se um espectro de uma fonte de luz e anotam-se alguns valores de comprimento de onda (oriundo da calibração de fábrica) e seu pixel correspondente em uma tabela conforme Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Valores experimentais e teóricos para o comprimento de onda e seus pixels correspondentes.

<i>Valor Experimental (nm)</i>	<i>Pixel</i>	<i>Pixel²</i>	<i>Pixel³</i>	<i>Valor esperado (nm)</i>	<i>Diferença</i>
253.65	175	30625	5359375	253.56	0.09
296.73	296	87616	25934336	296.72	0.01
302.15	312	97344	30371328	302.40	-0.25
313.16	342	116964	40001688	313.02	0.13
334.15	402	161604	64964808	334.19	-0.05
365.02	490	240100	117649000	365.05	-0.04
404.66	604	364816	220348864	404.67	-0.01
696.54	1491	2223081	3314613771	696.70	-0.15
706.72	1523	2319529	3532642667	706.62	0.10
727.29	1590	2528100	4019679000	727.24	0.06
738.40	1627	2647129	4306878883	738.53	-0.13
751.47	1669	2785561	4649101309	751.27	0.19

Selecionando o comprimento de onda experimental como a variável dependente (Y) e os valores número do pixel, número do pixel ao quadrado e número do pixel ao cubo como as variáveis independentes (X), a partir de uma regressão é possível obter os parâmetros da equação 5.1. Deve-se observar o valor do coeficiente de determinação (R^2) obtido após a regressão uma vez que valores muito próximo a 1, situação em que se tem uma regressão perfeita [52], atesta-se um cálculo correto. Na Tabela 5.2 é expressa a resposta da regressão para os dados da tabela anterior.

Tabela 5.2 – Valores estatísticos da regressão para a resposta do espectrômetro.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0.999999831
R-Quadrado	0.999999661
R-quadrado ajustado	0.999999607
Erro padrão	1,07845E-12
Observações	17

A interseção e os coeficientes C_1 , C_2 e C_3 encontrados após a regressão, encontram-se na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Coeficientes de calibração para relação pixel x comprimento de onda

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>
Interseção (I)	345,8182	7,13485E-14
Variável C_1	0,214747	1,69449E-16
Variável C_2	-6,00344E-06	1,07977E-19
Variável C_3	-2,93936E-10	1,94619E-23

Com os parâmetros em mãos, estima-se os valores de comprimentos de onda associado a cada pixel a partir de (5.1). Os valores estimados com a regressão ilustrada na Figura 5.1 encontram-se na coluna “Valor esperado” da Tabela 5.1.



Figura 5.1 – Gráfico Comprimento de Onda x Pixel

5.2.1.1 Funcionamento do Hardware

O processo de aquisição de um espectro no USB4000 possui os estados expressos na Figura 5.2.

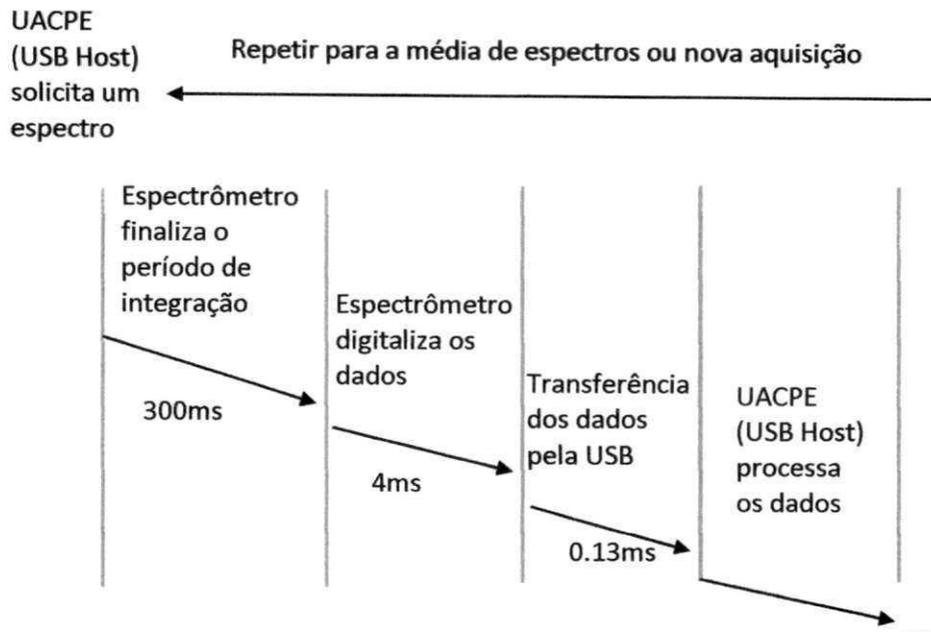


Figura 5.2 – Etapas para a aquisição do sinal do espectrômetro.

A UACPE, que assume o papel de HOST no protocolo USB, inicia o processo de aquisição a partir do momento em que solicita o espectro. Ao final do tempo de integração, definido pelo usuário, o espectrômetro digitaliza os dados utilizando um conversor AD com resolução de 16 bits. O tempo de integração define o tempo de exposição do elemento CCD a luz incidente, ou seja, determina a quantidade de luz absorvida por cada pixel. O tempo de integração assumiu valores em torno de 300ms nos experimentos realizados.

Na especificação técnica do USB4000 [51], encontra-se a descrição dos pixels segundo a Tabela 5.4. Como mencionado na tabela, existem um total de 3.681 pixels dos quais apenas 3.648 são pixels opticamente ativos.

Tabela 5.4 – Descrição de todos os pixels operando com o software proprietário

Pixel	Description
1–5	Not usable – (5)
6–18	Optical black pixels – (13)
19–21	Transition pixels – (3)
22–3669	Optical active pixels – (3648)
3670–3681	Not usable – (12)

Utilizando a interface USB, o software do fabricante (que não possui as funcionalidades desejadas) disponibiliza apenas 3648 pixels. Em contrapartida, a operação manual do equipamento, a partir desta mesma interface, captura um total de 3840 pixels, um acréscimo de 159 pixels, como se observa na Tabela 5.5. Da Tabela 5.5, é possível perceber que um espectro é composto por 14 pacotes de dados e 1 pacote de controle, para confirmar a recepção do espectro, e que cada pixel possui 2 bytes de tamanho, acarretando um total de 7680 bytes por espectro.

Tabela 5.5 – Descrição dos pacotes referente aos pixels operando manualmente o espectrômetro. Detalhe para o formato de cada pixel.

Pacote	Bytes	Pixels
0	512	0-255
1	512	256-511
2	512	512-767
3	512	768-1023
4	512	1024-1279
5	512	1280-1535
...	512	...
14	512	3584-3840
15	1	Pacote de Sincronização

Formato do Pixel			
Byte 0	Byte 1	Byte 2	Byte 3
Pixel 0 LSB	Pixel 0 MSB	Pixel 1 LSB	Pixel 1 MSB
...			
		Byte 511	Byte 512
...	...	Pixel 255 LSB	Pixel 255 MSB

Analisando a discrepância em relação ao total de pixels das Tabelas 5.4 e 5.5, verificou-se que o sensor de imagem CCD utilizado pelo espectrômetro, o Toshiba TCD1304AP [53], possui uma configuração que totaliza 3694 pixels, distribuídos conforme Figura 5.3.

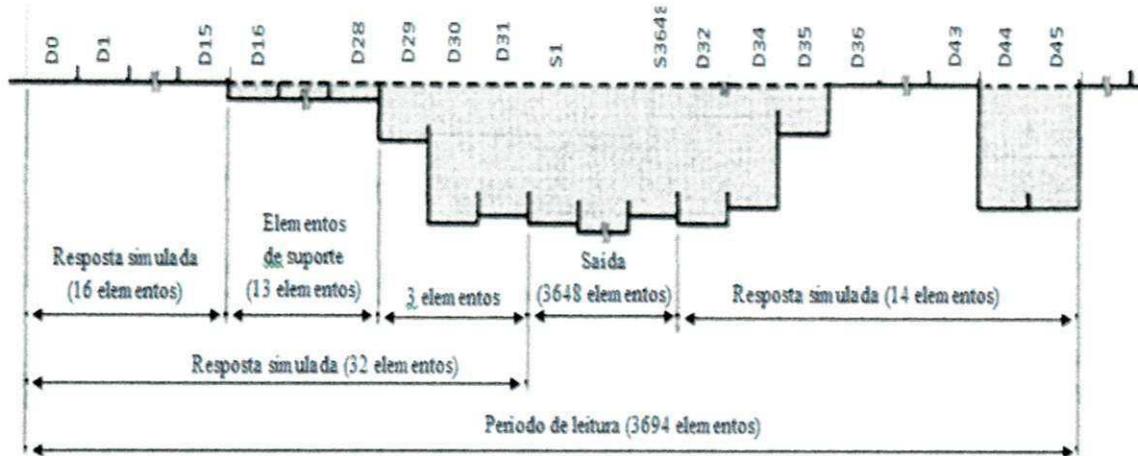


Figura 5.3 – descrição dos pixels do sensor Toshiba TCD1304AP.

Comparando a Tabela 5.4 com a Figura 5.3 constata-se que, efetivamente, há apenas 3648 pixels ativos. Os 5 primeiros pixels da Tabela 5.4 fazem alusão a 5 pixels dos primeiros dezesseis pixels simulados pelo TCD1304AP. Os 13 elementos de suporte em conjunto com os próximos 3 elementos da Figura 5.2 correspondem aos pixels 6-18 (*Optical black pixels*) e aos pixels 19-21 (*Transition pixels*) na Tabela 5.4 respectivamente. Os pixels não utilizados da Tabela 5.4 referem-se a 12 dos últimos 14 elementos do sensor CCD. Tomando a Tabela 5.6, ver-se que os pixels opticamente ativos (Tabela 5.5) encontram-se entre os pacotes 1 ao 14 e referem-se aos 3648 elementos de saída na Figura 5.3.

Diante do exposto, o USB4000 leva 4ms para digitalizar todos os 3648 pixels [51]. A partir do protocolo USB 2.0 *high speed* (480 Mbps) um espectro é transferido no tempo de 0.13ms. Após a transferência, a UACPE deve ser capaz de processar os dados concorrentemente a solicitação de um novo espectro, para procedimentos de suavização do ruído nos dados (detalhes na subseção 5.5), ou sincronizando o momento da visualização do espectro na tela, referente ao processo de análise de um determinado analito.

a) Funcionamento do CCD

Como mencionando anteriormente, o USB4000 usa o detector Toshiba TCD1304AP CCD que tem seu funcionamento descrito pela Figura 5.4. Os sinais para seu correto funcionamento são:

- *Shutter (SH)*: que define o tempo de integração;
- *Integration Clear Gate (ICG)*: é utilizado para resetar o detector entre os tempos de integração;
- *Master Clock (M)*: é o sinal que norteia a saída dos dados do sensor para o espectrômetro.

b) Funcionamento segundo tipo de Trigger

O USB4000 suporte quatro modos de trigger, os quais são ajustados com o comando “Trigger Mode”. Os principais modos de trigger são [51]:

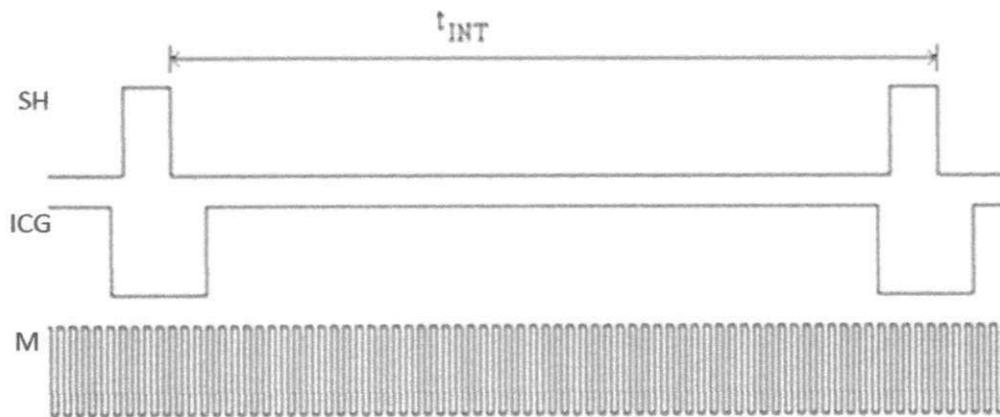


Figura 5.4 – Funcionamento do sensor Toshiba TCD1304AP

1- Normal (Free run)

Nesse modo de operação, define-se o valor para o clock (tempo) de integração e o espectrômetro continuamente faz a varredura do elemento CCD gerando os sinais SH, ICG e M.

2- External Hardware Trigger

Nessa configuração, um hardware externo é responsável por iniciar o processo de aquisição, ver Figura 5.5. O Trigger_Externo é o sinal TTL que define o momento em que começa o período (tempo) de integração, quando este assume o valor alto. Enquanto não for sentido o sinal Trigger_Externo, o espectrometro não adquire nenhum espectro. Existe um pequeno atraso entre o momento em que o Trigger_Externo vai para nível alto e o início do período de integração. Esse atraso é definido como t_{SU-HT} e é especificado com valor entre $10\mu s - 12\mu s$. Uma vez iniciado o período de integração este deve ser previamente configurado com um tempo maior que $t_{INT} > 3800\mu s$. O dado é transferido para o UACPE e o espectrômetro fica ocioso esperando para o próximo trigger.

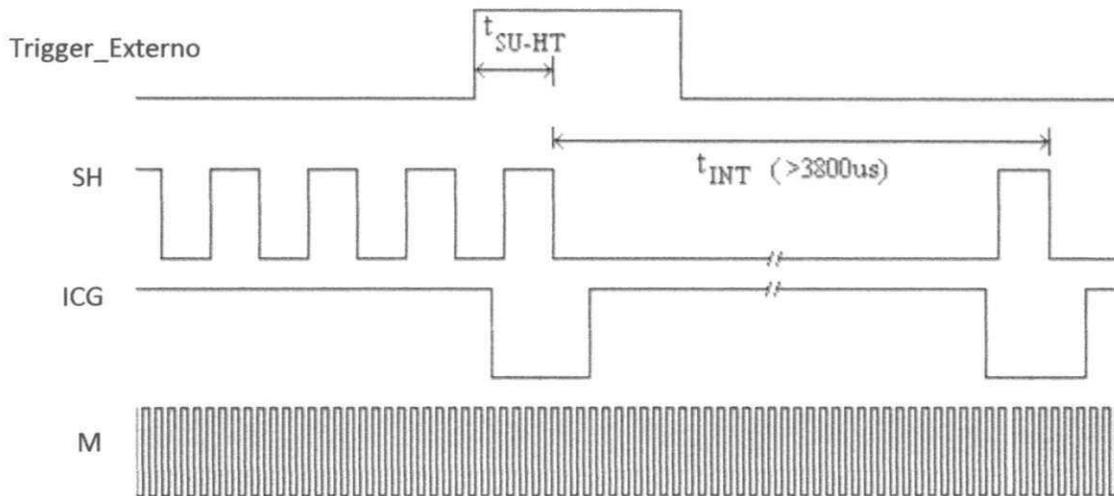


Figura 5.5 – Funcionamento no modo “External Hardware Trigger”

3- External Synchronization Trigger

Diferentemente do modo “External Hardware Trigger” onde o sinal Trigger_Externo é utilizado somente para iniciar o processo de aquisição segundo o tempo de integração previamente definido, o “External Synchronization Trigger” é regido pelo sinal Trigger_Externo como se observa na Figura 5.6. Para que haja um processo contínuo de aquisição de dados faz-se necessário a aplicação constante do sinal de Trigger_Externo. A frequência do sinal de trigger deve ser superior a 5ms e não exceder os 60s. O t_{SU-HT} assume valores entre $8\mu s - 10\mu s$.

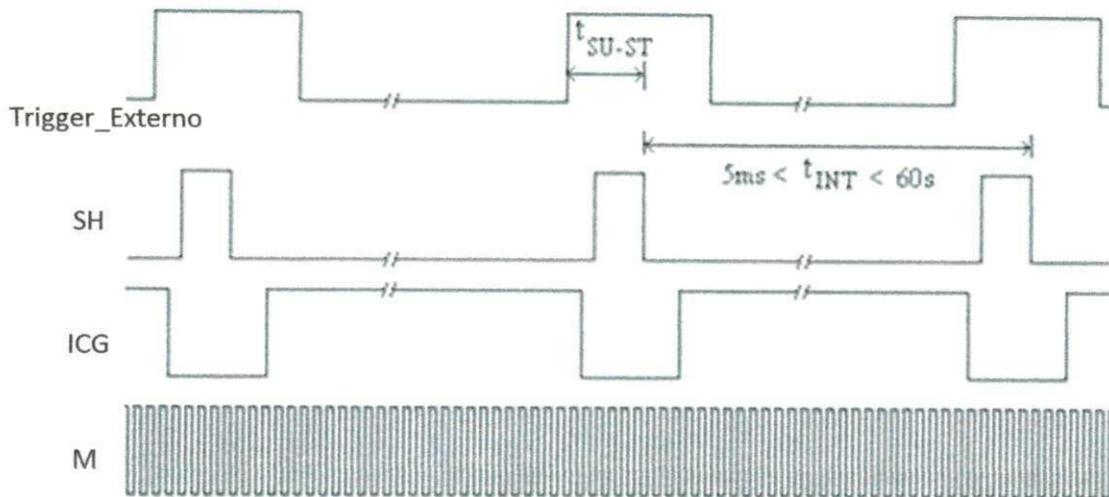


Figura 5.6 – Funcionamento no modo “External Synchronization Trigger”

O modo de operação “4- External Software Trigger” possui funcionamento idêntico ao “External Hardware Trigger”, com o sinal TTL sendo simulado por meio do software. A operação em modo “Free Run” foi utilizada

5.2.2 Câmera CCD

Para relacionar a posição do pixel com o ângulo de incidência, faz-se necessário o cálculo geométrico referente ao posicionamento entre a lente cilíndrica e o prisma. Para isso, referencia-se a Figura 5.7. A lente colimadora possui um comprimento de 10mm e uma distância focal de 20mm , entretanto a luz que incide na parte especular do prisma possui uma abertura óptica de 4mm , como mostra o caminho óptico ilustrado a figura.

Ao desenvolver o caminho óptico da luz até chegar à câmera, Figura 5.8, ver-se que a região do elemento CCD que é opticamente ativa, está limitada pelo ângulo θ . Através da Figura 5.8 temos que θ equivalente a 2φ , ou seja, $\theta = 22,6^\circ$

A câmera possui uma densidade de pixel igual a 100 pixel/mm (3000 pixels do detector CCD utilizado pela câmera dividido por 30mm de comprimento do mesmo). Sendo a região opticamente ativa limitada pelo ângulo θ calculado anteriormente, tem-se um total de $2,26^\circ/\text{mm}$, conseqüentemente um coeficiente de

0,0226 °/pixel. Com as informações do parágrafo anterior, encontrou-se a relação Pixel x Ângulo expressa pela equação 5.2 e Figura 5.9.

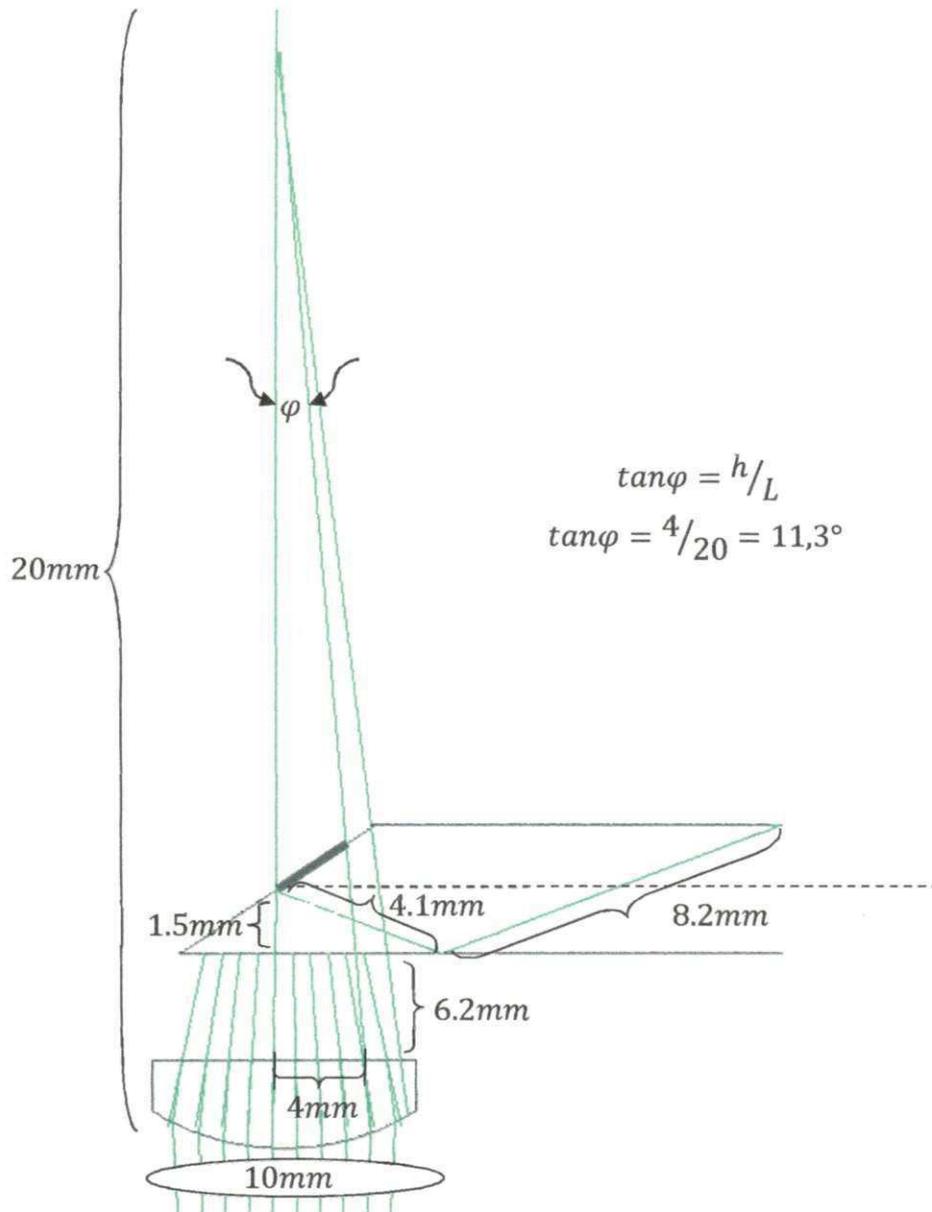


Figura 5.7 – Análise geométrica do caminho óptico. Uma análise da distância entre a lente cilíndrica e o prisma pode ser encontrada em [13].

5.2.2.1 Funcionamento do Hardware

Assim como o espectrômetro, o funcionamento da câmera também é regido pelo parâmetro “tempo de integração”. Conforme descrito em [54], um aumento no tempo e

integração aumenta a quantidade de luz acumulada pelo CCD, o que implicada em valores menores de tensão e corrente fornecidos ao LED para evitar a saturação do CCD. Já uma diminuição nesse tempo, implica em maiores valores de tensão e corrente devido a diminuição da luz absorvida.

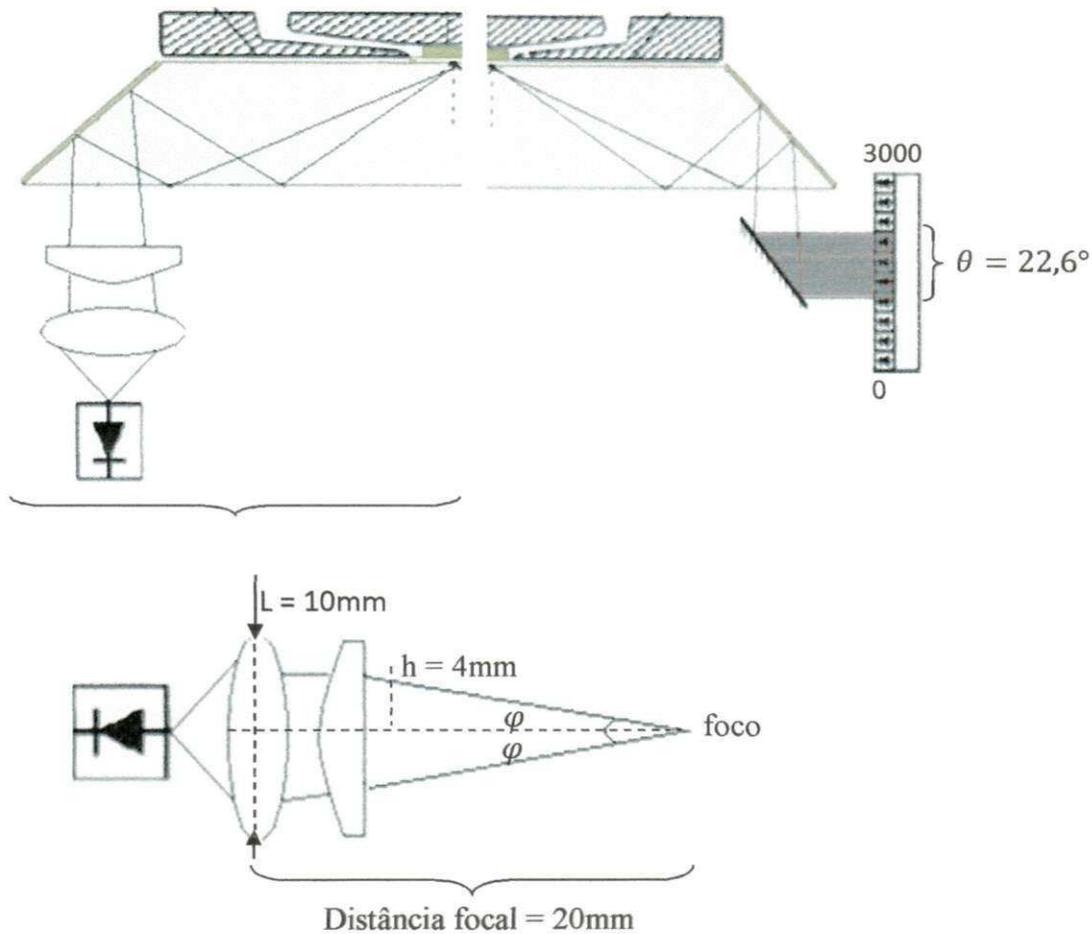


Figura 5.8 – Análise geométrica para cálculo da relação entre pixel e ângulo de incidência – chegada da luz.

Guardada as devidas proporções em relação ao USB4000, ao fornecer o parâmetro tempo de integração a câmera é capaz de adquirir os dados, digitalizá-los e transferi-los pela interface USB. Possui um modo de “Trigger Externo” com funcionamento semelhante ao “External Synchronization Trigger” do espectrômetro.

O *driver* da LC1-USB foi desenvolvido com o framework VISA [55] da National Instruments, As aplicações controladoras de instrumentos com *drivers* escrito nesse framework devem ser compatíveis com o mesmo, tornando-o o fator determinante na escolha das ferramentas de software para o desenvolvimento da aplicação.

$$\theta_i = 0.0226pixel_i + 23.20 \quad (5.2)$$

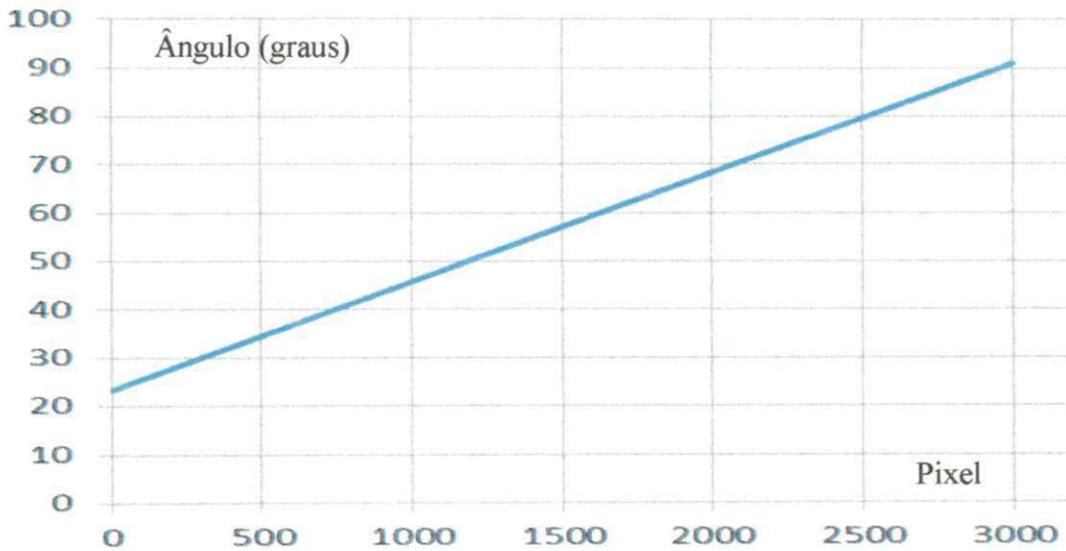


Figura 5.9 – Gráfico Ângulo de Ressonância x Pixel

5.3 A UACPE

A arquitetura x86 da pico-ITX possibilita a incorporação de várias opções de sistemas operacionais e, conseqüentemente, um conjunto de possibilidades na escolha da linguagem de programação para o desenvolvimento da aplicação. As seções 5.3.1 e 5.3.2 descrevem os softwares desenvolvidos nesse trabalho.

5.3.1 Sistema Operacional (SO)

O Linux Mint foi utilizado como base para criação do sistema operacional instalado na UACPE por ser uma das distribuições Linux gratuitas com boa relação da utilização do hardware. Para customização do Linux Mint foi utilizado a ferramenta *Ubuntu Customization Kit* (UCK). As etapas para customização estão descritas abaixo:

- a) **Instalação:** Para instalar o UCK, a partir de sua versão .deb, o comando abaixo deve ser executado:

```
$ sudo dpkg -i uck_1.4.1_all.deb
```

- b) **Montagem da ISO do Linux:** Deve-se entrar no diretório de trabalho do UCK, que fica em ~/tmp/, copiar o arquivo .ISO do Linux Mint e executar o seguinte comando:

```
$ sudo uck-remaster-unpack-iso nome_da_arquivo_iso.iso
```

- c) **Diretório de trabalho "/" da ISO:** Este é o diretório raiz da distribuição do linux para o biossensor proposto. É a partir dele que são realizadas as modificações necessárias para a personalização da distribuição. Para que este diretório esteja apto a modificação é necessário o comando abaixo:

```
$ sudo uck-remaster-unpack-rootfs
```

Em seguida, entra-se neste diretório, em um ambiente "chroot" através do comando:

```
$ sudo uck-remaster-chroot-rootfs
```

- d) **Reconfiguração de repositórios para instalação de pacotes:** Uma vez que entra-se no *prompt* como *root* da imagem .ISO da distribuição a ser modificada, pode ser necessário atualizar a lista de repositórios contida no arquivo *"/etc/apt/sources.list"*.
- e) **Instalação/Remoção de pacotes:** Depois de atualizada a lista de repositórios, a ISO está pronta para receber, ou perder pacotes (programas), ou seja, está apta à customização. Pode-se usar os comandos *"apt-get"* ou o *"dpkg"*.

f) *Recompactar a ISO*: Depois de feitas as modificações, faz-se necessário recompactar a ISO personalizada. Para isto, deve-se sair do ambiente “*chrooted*”, utilizando a combinação de teclas “CTRL+D”, retornando ao *prompt* de usuário do sistema base. Em seguida Neste ponto precisamos reempacota-se o *root* da nova ISO e criar-se a ISO final com os comandos abaixo:

```
$ sudo uck-remaster-pack-rootfs
```

```
$ sudo uck-remaster-pack-iso
```

No diretório “~/tmp/remaster-new-files/” encontra-se uma nova ISO com o sistema personalizado.

Os pacotes e aplicações mantidas no sistema operacional foram aqueles cuja presença é essencial ao funcionamento dos softwares embarcados, a exemplo da máquina virtual Java para a aplicação controladora do USB400 e framework VISA para a aplicação do modo AIM. Ademais, aplicações que conferem funcionalidades básicas de um computador pessoal, como é caso do Ambiente Gráfico LXDE, foram mantidas.

5.3.2 Software embarcado

O princípio de funcionamento do software controlador do biossensor, para ambos os modos de operação, está descrito no fluxograma ilustrado na Figura 5.10. Após a detecção do transdutor (USB4000 ou LC1-USB), há a possibilidade de configurar os parâmetros de suavização dos dados. Configurado tais parâmetros, tem início o processo de aquisição dos dados. Para o cálculo da curva SPR, faz-se necessário calibrar o biossensor com um sinal de referência. Com a curva SPR calculada, realiza-se o processo de suavização da mesma para o posterior cálculo dos parâmetros investigados.

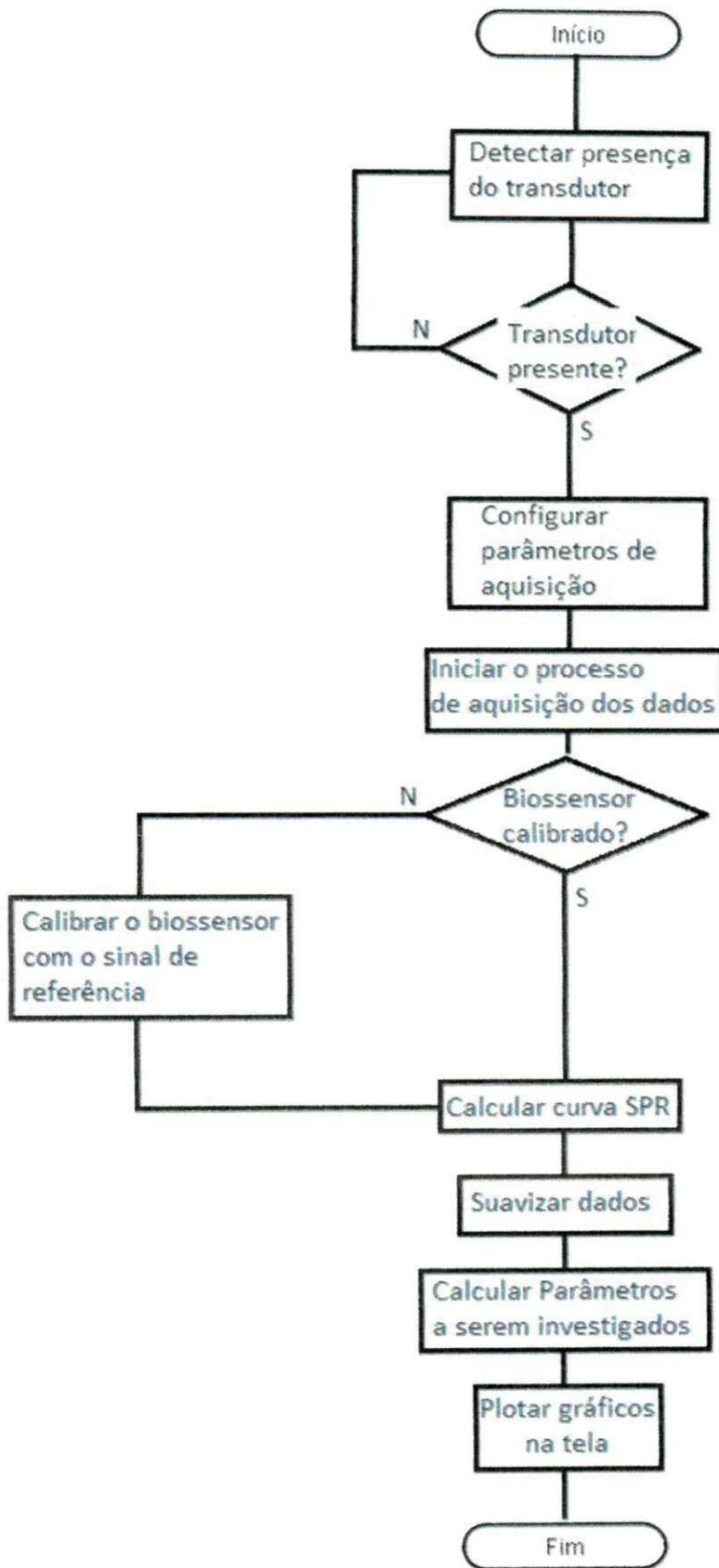


Figura 5.10 – Fluxograma do software embarcado.

5.3.2.1 Descrição dos menus e botões para o sistema controlador do espectrômetro

O software elaborado para operar no modo de interrogação espectral foi desenvolvido utilizando a linguagem de programação Java e foi denominado de “SPR Station - WIM”. O *driver* do equipamento foi escrito em Java, daí a escolha da linguagem por proporcionar maior interoperabilidade entre a aplicação e o equipamento. Na Figura 5.11 é exibido a tela inicial do programa.

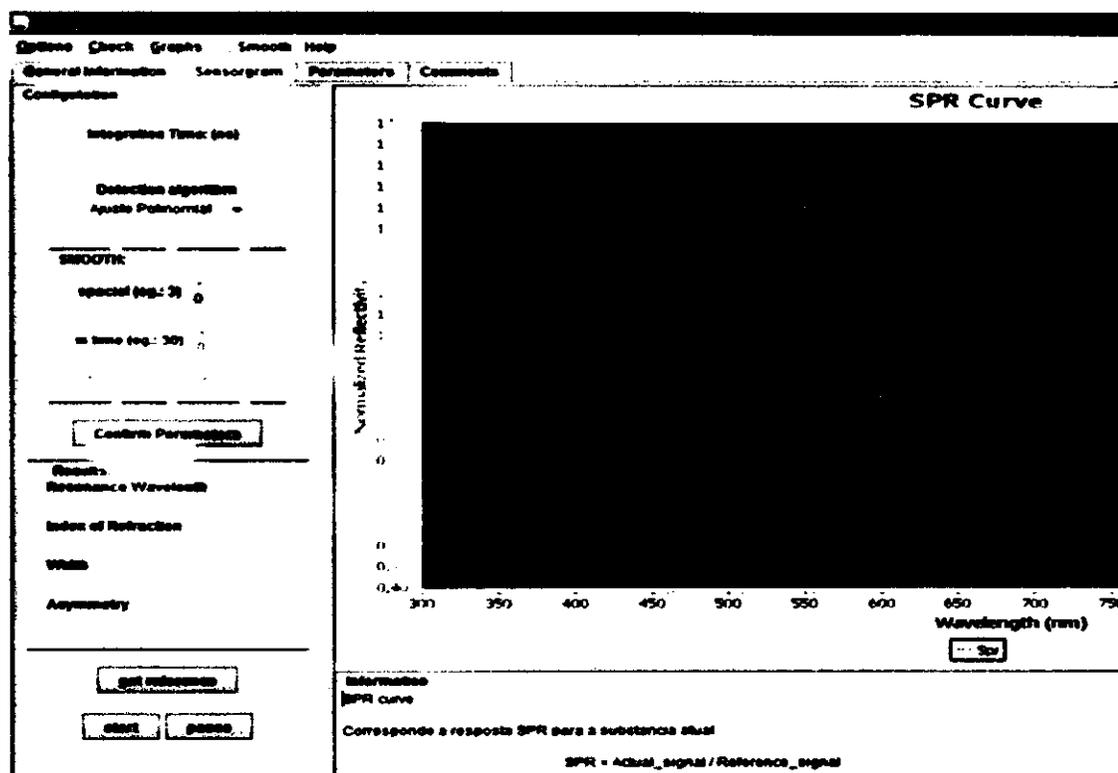


Figura 5.11 – Tela inicial do software para o modo WIM, aba “General Information”.

O software é majoritariamente composto por gráficos que expressam o comportamento das variáveis envolvidas no processo de análise de substâncias. Possui uma barra de menus e quatro abas com objetivo de separar os gráficos de acordo com o relacionamento das variáveis. No menu “Check” há a opção “Check Spectrometer” que informa ao usuário se o USB4000 está conectado à UACPE. No menu “Options”, o usuário pode salvar todos os gráficos na opção “Save as..” bem como abrir os dados referente a uma determinada medição na opção “Open”, ilustrada na Figura 5.12.

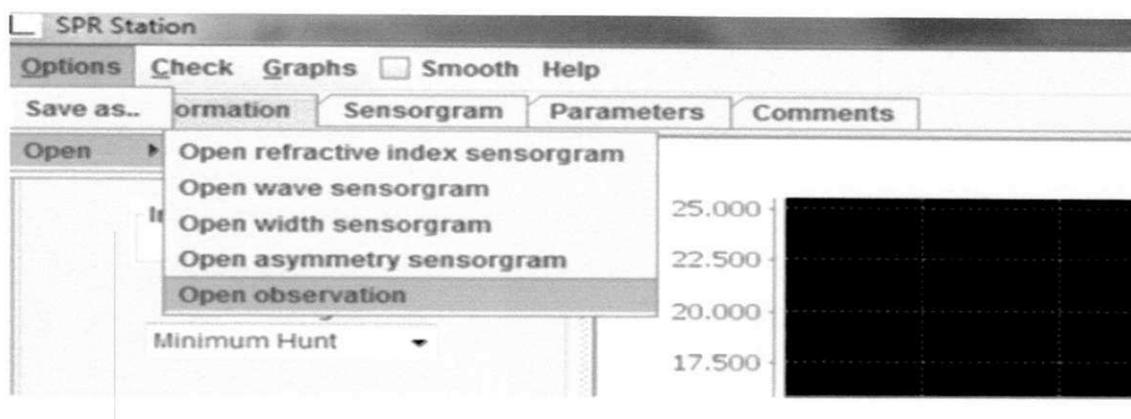


Figura 5.12 – Detalhe para o menu de opções.

No menu “Graphs”, torna-se possível escolher entre os gráficos presentes na aba “**General Information**”. Tais gráficos são referentes a curva spr, botão “SPR Curve”, o sinal de referência (“Reference Signal”) e o espectro atual (“Actual Signal”) capturado pelo USB4000. Ainda na aba “General Informations”, ao selecionar a opção “Smooth”, contida na barra de menus, os parâmetros de aquisição expressos nos campos “Integration Time”, “SMOOTH: spatial”, “SMOOTH: in time” e no botão “Enable Electric Dark Correction”, todos contidos no painel de configuração, tornam-se habilitados. O ajuste de tais parâmetros é efetivado ao clicar no botão “Confirm Parameters”. Ajustado tais parâmetros, pode-se iniciar o processo de análise (“start”) e parar a qualquer momento, clicando no botão “pause”. O sinal do transdutor é continuamente apresentado no gráfico “Actual Signal”, tornando possível visualizar o sinal que se deseja tomar como referência, ao pressionar o botão “get reference”. Para a detecção do momento em que houve a ressonância, o usuário pode escolher o algoritmo na lista intitulada “Detection Algorithm”.

A aba “**Sensorgram**”, Figura 5.13, apresenta os gráficos do monitoramento do comprimento de onda de ressonância e do índice de refração. É apresentado o valor do ruído para as últimas cinco medições apresentadas. Na aba “**Parameters**”, é possível visualizar as variações dos parâmetros largura e assimetria em função do tempo. As abas descritas anteriormente possuem um botão “Clear” para limpar a tela e reiniciar o monitoramento.

Ao ser inicializada, a UACPE automaticamente abre o SPR Station. Para que o usuário não necessite abrir outro programa, a aba “**Comments**” possui uma ampla área para anotações diversas.

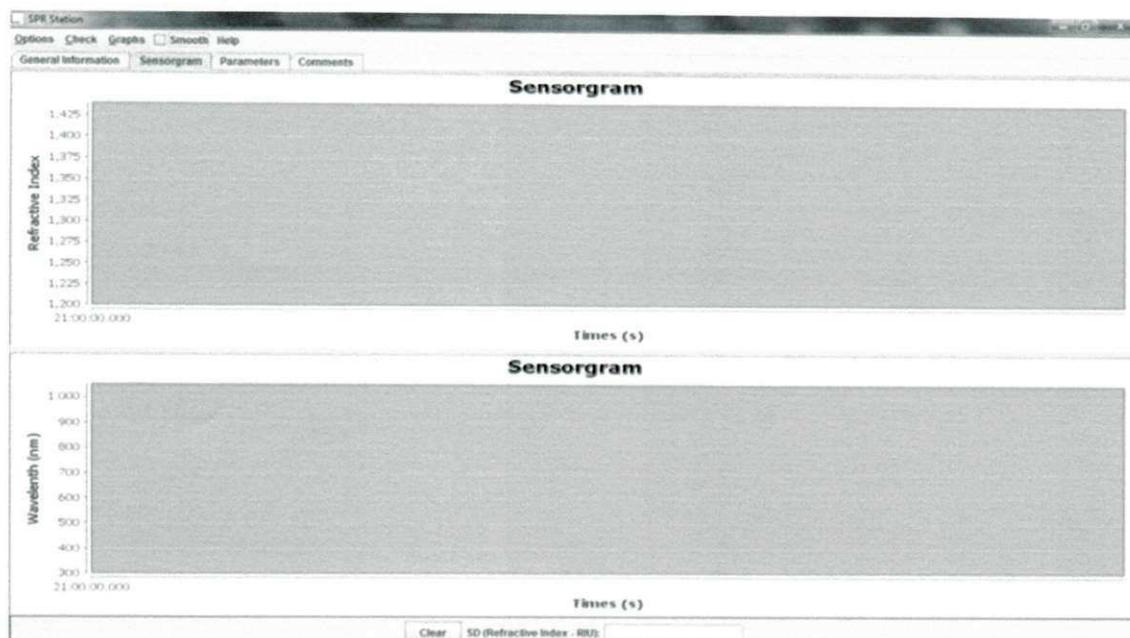


Figura 5.13 – Aba “Sensorgram” com os gráficos Índice de Refração X Tempo e Comprimento de Onda X Tempo. A aba “Parameters” possui a mesma estrutura e apresenta os gráficos Largura X Tempo e Assimetria X Tempo

O software para o modo WIM necessita da API para comunicação com o USB4000, fornecida gratuitamente pela Ocean Optics, além da biblioteca JFreeChart, que provê as ferramentas necessárias para a construção dos gráficos utilizados na aplicação. A JFreeChart é distribuída sob licença LGPL. Na Figura 5.14 são apresentados, visualmente, as dependências do software. Os pacotes *com.oceanoptics.omnidriver.api.wrapper* e *.features.boardtemperature* contém as classes necessárias para manipulação do USB4000. O pacote *Processamento* contém os algoritmos desenvolvidos para trabalhar com o fenômeno SPR. Os demais pacotes referem-se à JFreeChart.

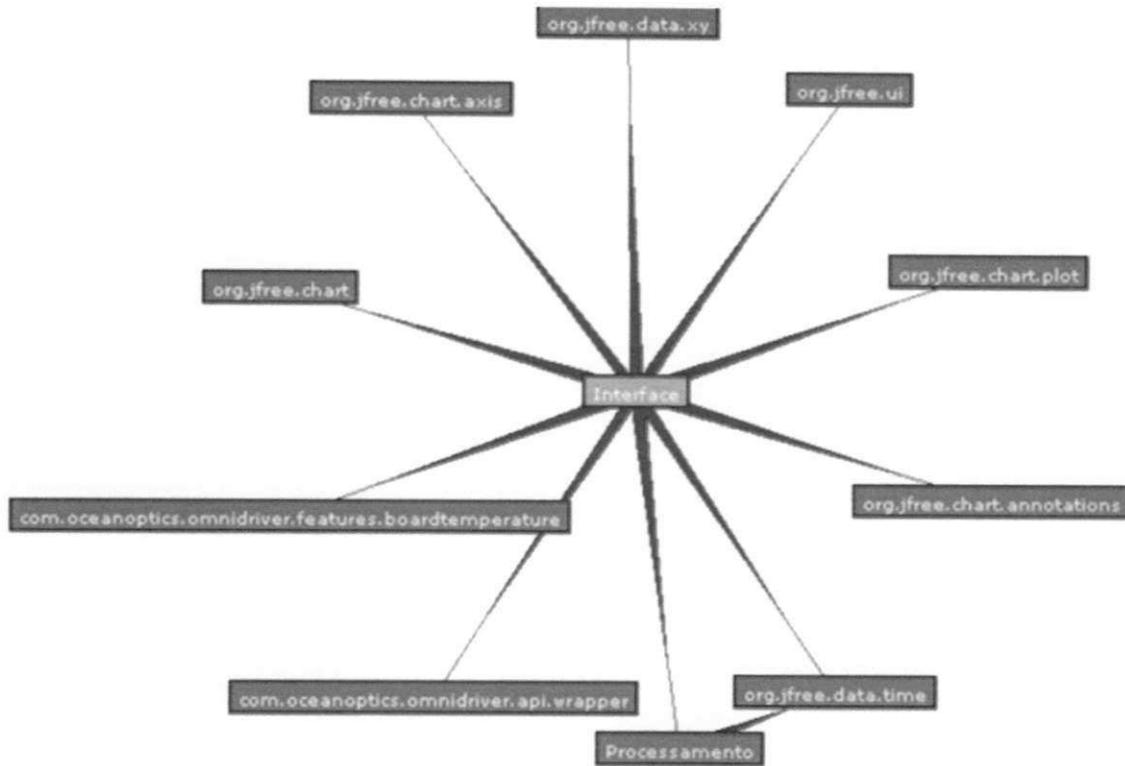


Figura 5.14 – Visualização das dependências do software. Interface é classe detentora do método *main*.

5.3.2.2 Descrição dos menus e botões para o sistema controlador da LC1-USB

O software elaborado para operar no modo de interrogação angular foi desenvolvido utilizando a linguagem de programação C+LabWindows/CVI, pelo fato do driver da câmera ter sido compilado nessa linguagem, e foi denominado de “SprSTATION - AIM”. Como observado na Figura 5.15, a aplicação é também majoritariamente composta por gráficos. Todos os elementos do software ficam desabilitados até que seja verificada a conexão da LC1-USB com a UACPE. Esse procedimento é realizado ao clicar no botão “Find Linear Camera”. Encontrado o transdutor, detalhes sobre o equipamento tais como fabricante e versão do firmware são apresentados ao usuário e todos os componentes da aplicação tornam-se acessíveis.

A aplicação para a LC1-USB possui todas as funcionalidades do software controlador do USB4000, como se observa na Figura 5.15b.

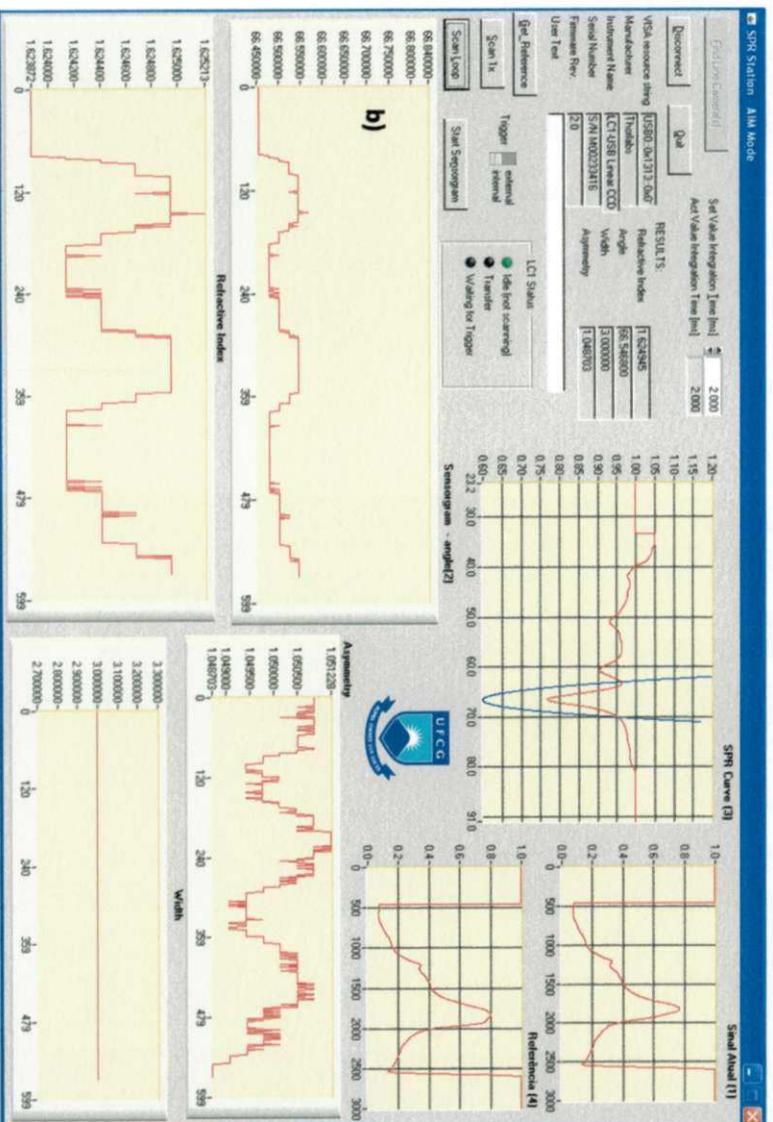
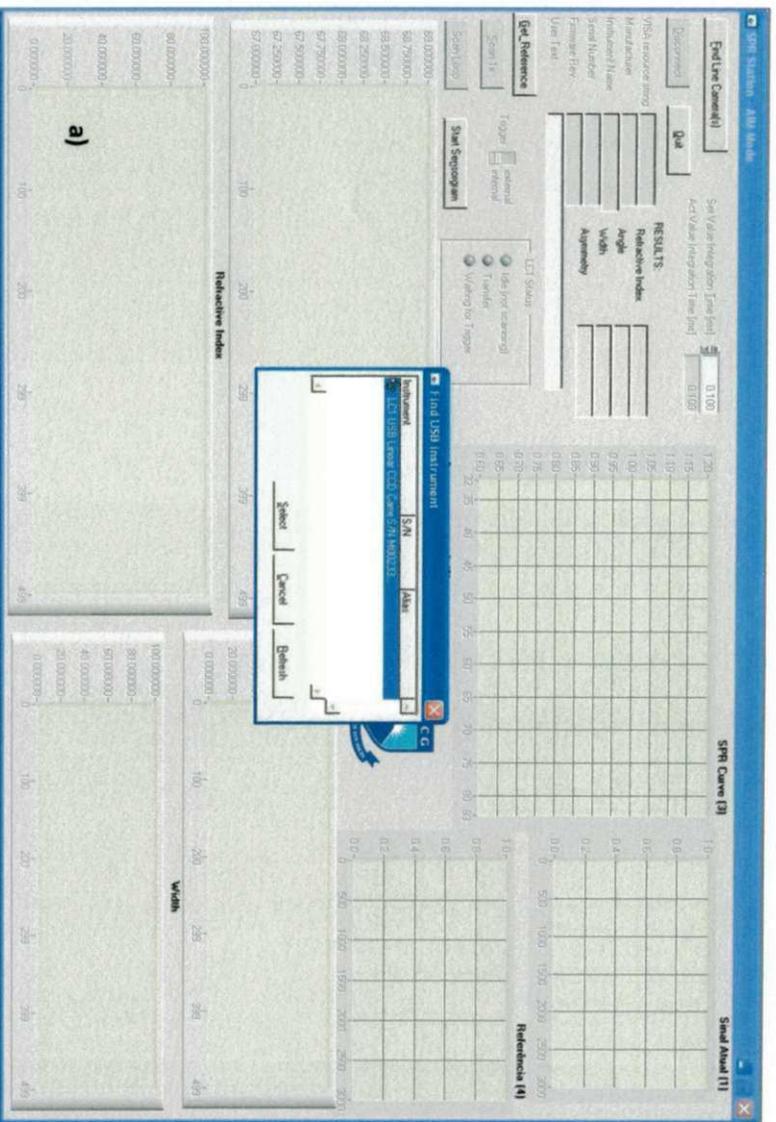


Figura 5.15 – a) Tela inicial da aplicação para o modo AIM com janela listando o detector conectado b) Execução do SPR Station – AIM

5.4 Partes mecânicas e ópticas

Na Figura 5.16 é apresentado o setup experimental para a plataforma do biossensor SPR expressa na Figura 4.20. Os ajustes posicionais dos elementos nas estruturas essenciais para o modo de interrogação espectral e angular podem ser visualizados nas montagens para o modo WIM e AIM. Imagens do espectrômetro, da câmera CDD, da bomba e da UACPE também podem ser visualizados.

5.5 Otimização da resposta do transdutor

A qualidade do biossensor está intimamente relacionada com a precisão com que se determina o momento em que houve a ressonância [32,34,38,44]. Quanto maior a precisão nessa detecção, maior a sensibilidade do equipamento, o que implica dizer que o sistema possui um nível pequeno de ruído.

Após a montagem do biossensor, buscou-se amenizar o ruído da resposta do equipamento. Essa não é uma tarefa fácil, haja vista que o ruído está presente em inúmeras partes que compõem o sistema aqui apresentado.

Problemas oriundos do detector podem ser corrigidos com algoritmos implementados nos softwares controladores. Assim como as técnicas de detecção do mínimo da curva SPR. Entretanto, ao acoplar as várias partes que compõem o biossensor cada uma delas pode acarretar em algum tipo de ruído. Os procedimentos que investigaram os ruídos contidos na solução proposta são descritos nas seções e subseções que se seguem.

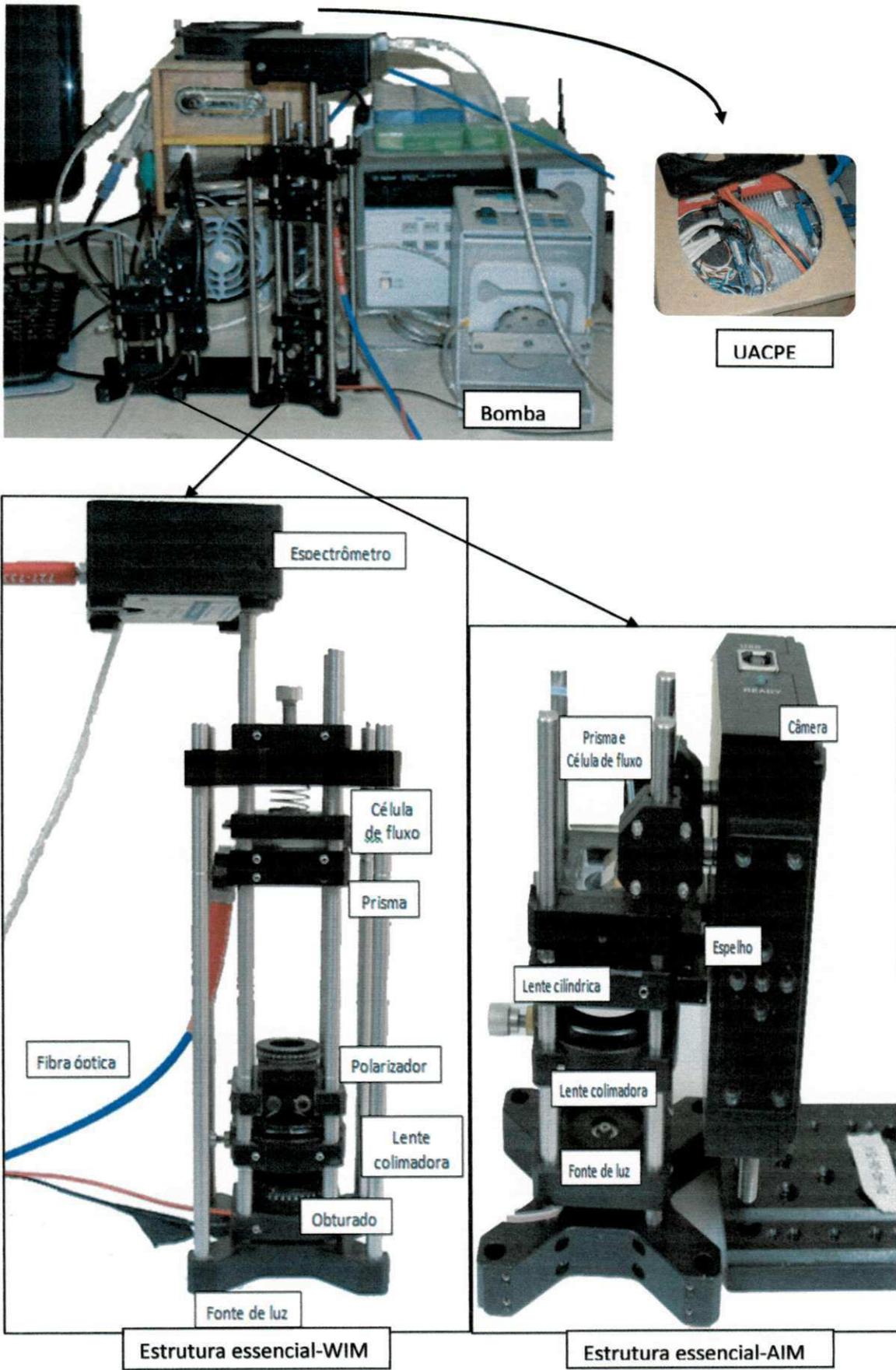


Figura 5.16 – Setup experimental para a plataforma do biossensor SPR desenvolvida.

5.5.1 CCD

Para conseguir boas imagens dos dispositivos de carga acoplada (sensores CCD) fez-se necessário conhecer seu funcionamento e as fontes de ruído que reduzem a qualidade das imagens. O CCD trabalha convertendo fótons em elétrons e os armazena em cada pixel, o qual possui uma capacidade máxima (saturação) de elétrons que pode armazenar. A quantidade máxima de fótons armazenadas por pixel dividido pela média do ruído do sensor é o que define o parâmetro SNR (Signal to Noise Ratio) ou relação Sinal-Ruído. Observe a seguinte situação: se um pixel puder armazenar 90.000 elétrons e a média do ruído for de 30 elétrons/pixel o valor do SNR será de 3000:1. Dessa forma, o SNR determina a qualidade da imagem obtida.

Diferentemente dos semicondutores de metal-óxido complementar, sensores CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor), que convertem a carga de cada pixel em voltagem dentro do próprio pixel, os sensores CCD movem a carga de pixel em pixel, sendo convertido apenas no nó de saída [56]. Uma vez que a região fotoativa do CCD é exposta à luz, um circuito de controle move a carga acumulada de cada pixel para o capacitor do pixel vizinho, semelhante ao funcionamento de um registrador de deslocamento. Ao final, a carga no último capacitor é convertida e amplificada.

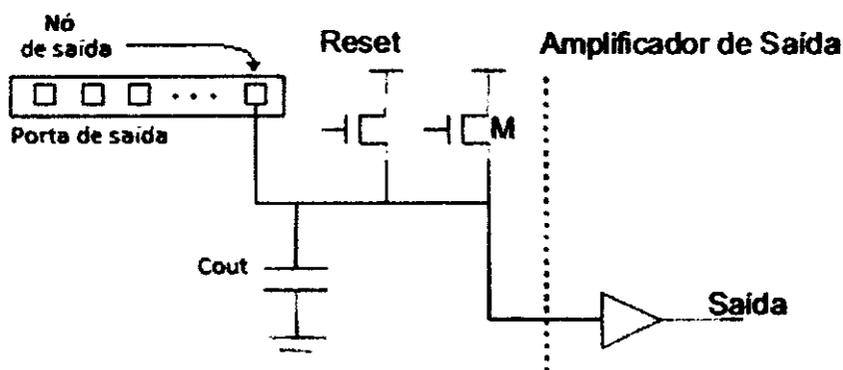


Figura 5.17 – Circuito de um sensor CCD

Na Figura 5.17, é ilustrado o circuito interno de um sensor de imagem CCD para o nó de saída. A carga contida no último pixel da porta de saída é deslocada para o capacitor de armazenamento C_{out} . A carga do capacitor C_{out} é então convertida para um valor de tensão proporcional a sua carga, correspondendo a uma leitura sequencial do valor de cada pixel. Um transistor M seguidor de tensão é utilizado no circuito. Ao final

do tempo de integração para a leitura de um pixel, é aplicado o *reset*, tornando o capacitor C_{out} apto a receber a carga de um novo pixel.

Existe uma série de ruídos que ocorrem entre o tempo de integração até a leitura do pixel. Comumente as manifestações dos ruídos nos sensores CCD são classificadas em *temporais e espaciais*. Os ruídos temporais, por definição, variam no tempo e podem ser amenizados com técnicas de suavização como médias e mediana. Os ruídos espaciais são de natureza distintas, necessitando de técnicas específicas par cada tipo de ruído. Nas próximas subseções são descritos os ruídos combatidos no desenvolver do equipamento.

5.5.1.1 Corrente Escura

A corrente escura é definida como a corrente do fotodiodo quando este não está exposto à luz [57], causada por elétrons gerados termicamente que se acumulam nos pixels. A corrente escura pode ser facilmente minimizada com a refrigeração do CCD e o que “sobrar” de corrente escura pode ser removida através da subtração do sinal atual por um sinal de corrente escura.

Nos transdutores utilizados no equipamento proposto, o sensor CCD é encapsulado pelo fabricante, ou seja, o resfriamento direto no CCD não pode ser realizado, a menos que se desmonte o USB4000 ou a LC1-USB. Assim, apenas a subtração do sinal de corrente escura foi realizada. Como mostra a Figura 5.18a, a corrente escura para o espectrômetro possui intensidade que variam de 1600 a 1750, a depender do pixel investigado. Após a remoção da corrente escura, os níveis de intensidade caíram para uma faixa compreendida entre 40 a 125.

5.5.1.2 Não uniformidade do sensor

Apesar de hoje os sensores CCDs serem desenvolvidos para atender os mais altos padrões de qualidade, a imperfeição ainda existe, ou seja, cada pixel possui uma sensibilidade diferente a luz. A resposta não uniforme também manifesta-se devido a estragos ou sujeiras contidas no sensor que por ventura venham a atrapalhar o caminho óptico. A não uniformidade do sensor foi combatida através da calibração dos transdutores, seção 5.2, cujos procedimentos englobaram etapas de técnicas de “Flat-

field correction” que consistem em ajustar os valores dos pixels das extremidades levando em consideração os valores dos pixels centrais.

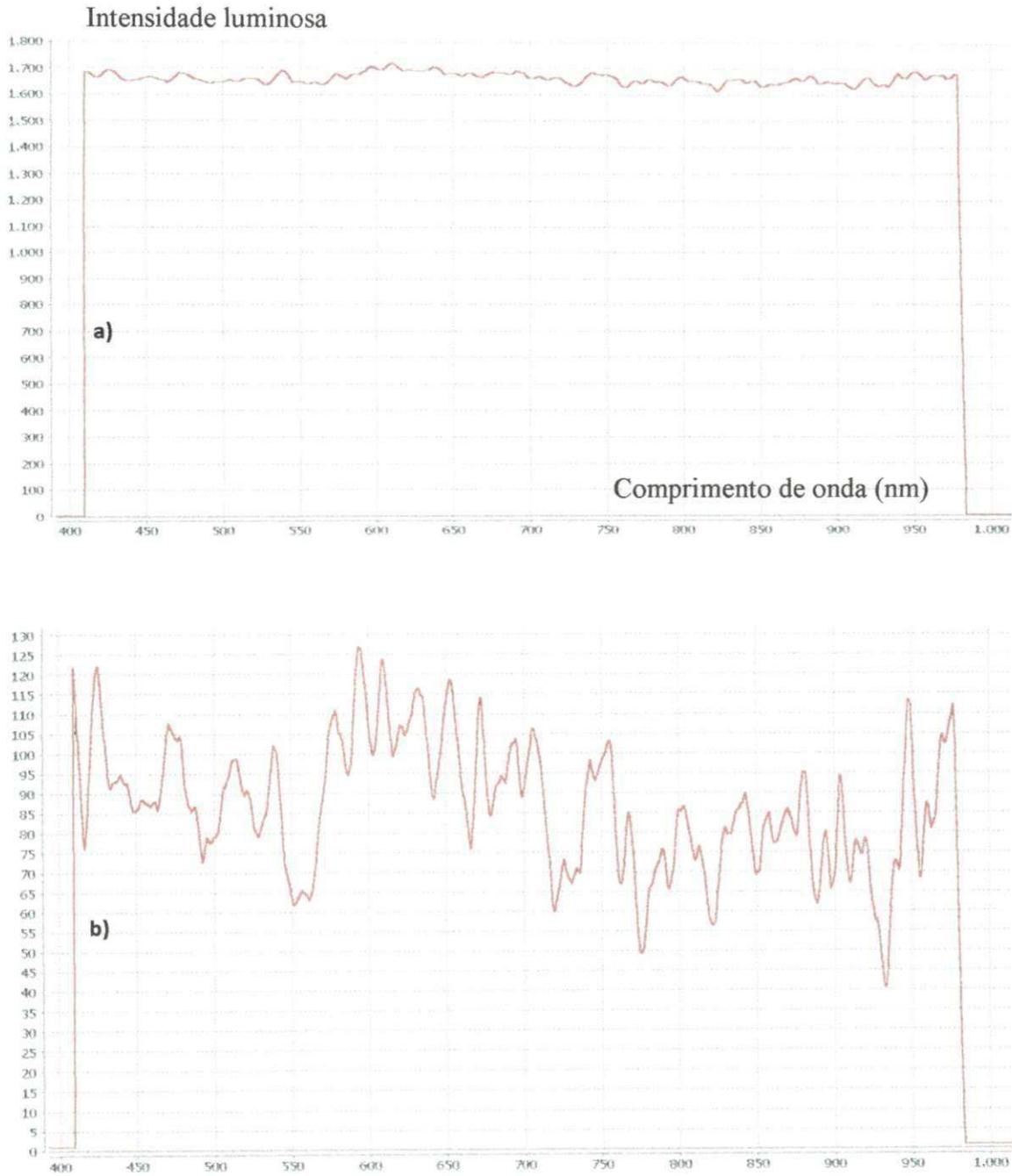


Figura 5.18 – a) Sinal sem a remoção da corrente escura e b) Sinal após a subtração da corrente escura.

5.5.1.3 Shot-noise

O shot-noise ocorre pelo fato de o tempo para a chegada de um fóton no sensor CCD ser um evento aleatório e que independe da chegada de outros fótons, governado assim por uma distribuição de Poisson. A distribuição de Poisson é caracterizada por uma taxa média de chegada (λ) e um intervalo fixo de tempo t , o que aumenta a probabilidade do ruído quanto utilizado sensores com quantidade pequena de pixels e valores baixos para o tempo de integração.

O shot-noise no equipamento proposto foi combatido das seguintes formas:

- 1- Os detectores utilizados possuem uma alta resolução, contendo 3648 pixels para o modo WIM e 3000 pixels para o modo AIM;
- 2- Ajuste experimentais para que fosse possível conseguir o maior tempo de integração possível sem que o sensor chegasse a condição de saturação. Para isso, flutuações na intensidade de luz foram medidas a partir do fotodetector de alta velocidade DET10A/M [63], segundo o esquema da Figura 5.19. A corrente proporcional a intensidade luminosa fornecida pelo fotodetector manteve-se constante, atestando que os ruídos experimentais não são oriundos da fonte luminosa.

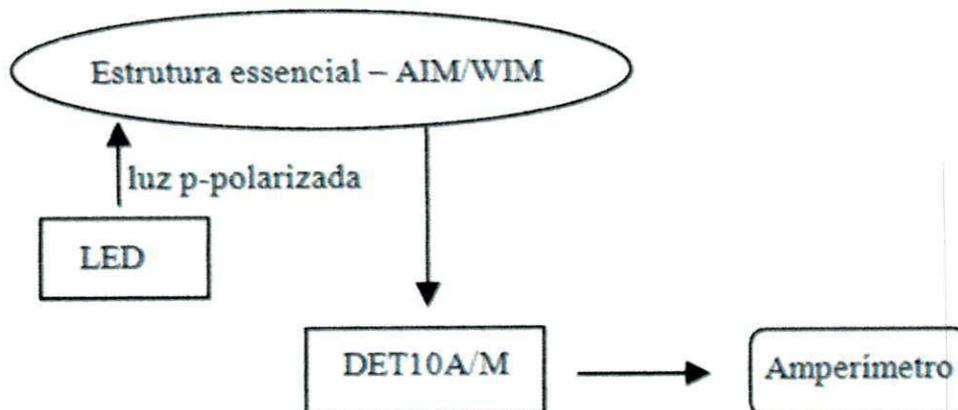


Figura 5.19 – Montagem para medir a qualidade da emissão da fonte luminosa.

5.5.1.4 Pré-processamento da imagem e suavização da Curva SPR

O pré-processamento da imagem do transdutor assim como a curva SPR podem ser suavizados com as técnicas descritas na seção 4.3.2.1.

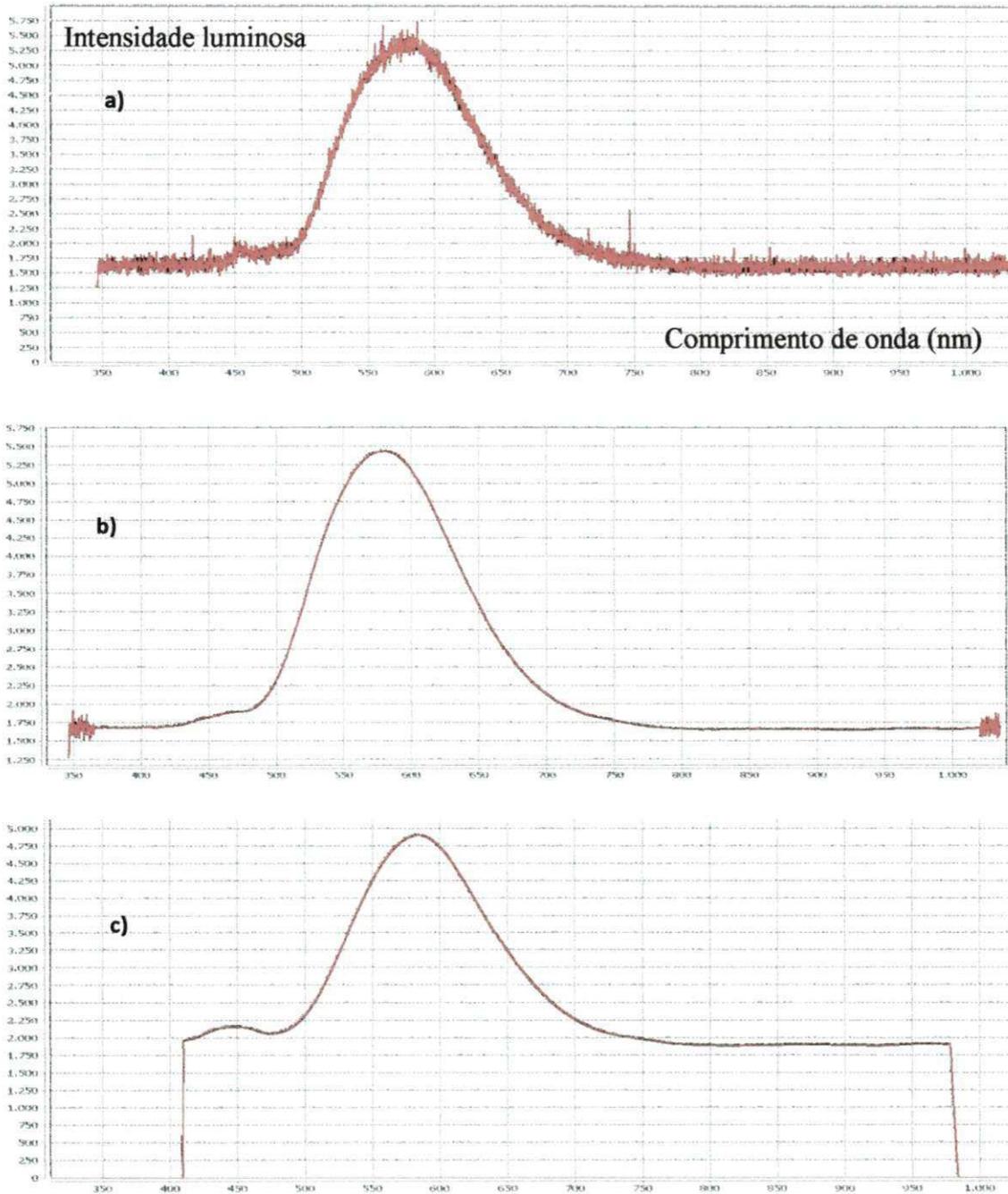


Figura 5.20 – Sinal do transdutor a) bruto, b) após a média móvel usando 90 pixels e uma média espectral para 5 imagens e c) após a mediana usando 32 pixels.

Como mostra a Figura 5.20a, o sinal bruto do transdutor precisa ser suavizado para que a UACPE realize medições com precisão. As técnicas de suavização descritas na seção 4.3.2.1 suavizam o valor do pixel substituindo pela média aritmética dos pixels pertencentes à vizinhança, o resultado é apresentado na Figura 5.20b.

O ruído impulsivo, caracterizado pela ocorrência aleatória de pixels cujos valores de luminosidade diferem significativamente dos valores de seus pixels vizinhos, é combatido com a técnica da Mediana. O **filtro da Mediana** consiste em substituir o valor do pixel pela mediana dos seus pixels vizinhos. Para isso, é preciso realizar a ordenação dos pixels, o que exige um maior poder computacional. Para melhorar o desempenho da Mediana, os pixels correspondentes aos extremos baixo e alto do espectro da fonte de luz foram retirados do cálculo, como retrata a Figura 5.20c.

Os demais ruídos como o *reset-noise* (devido à resistência do canal que causa o ruído térmico durante a aplicação da tensão através do transistor de *reset*), os ruídos oriundo dos amplificadores além de *interferências eletromagnéticas* não foram aqui combatidos por não se ter acesso direto ao elemento CCD dos equipamentos.

Os prismas obtidos com esses procedimentos forneceram ótimas respostas para a curva SPR, com aproximadamente 70% de absorção da luz pelos plasma de superfície (*deep*), ressonância ocorrendo em 680nm, largura de 167nm e assimetria de 1.28, como mostra a Figura 5.21.

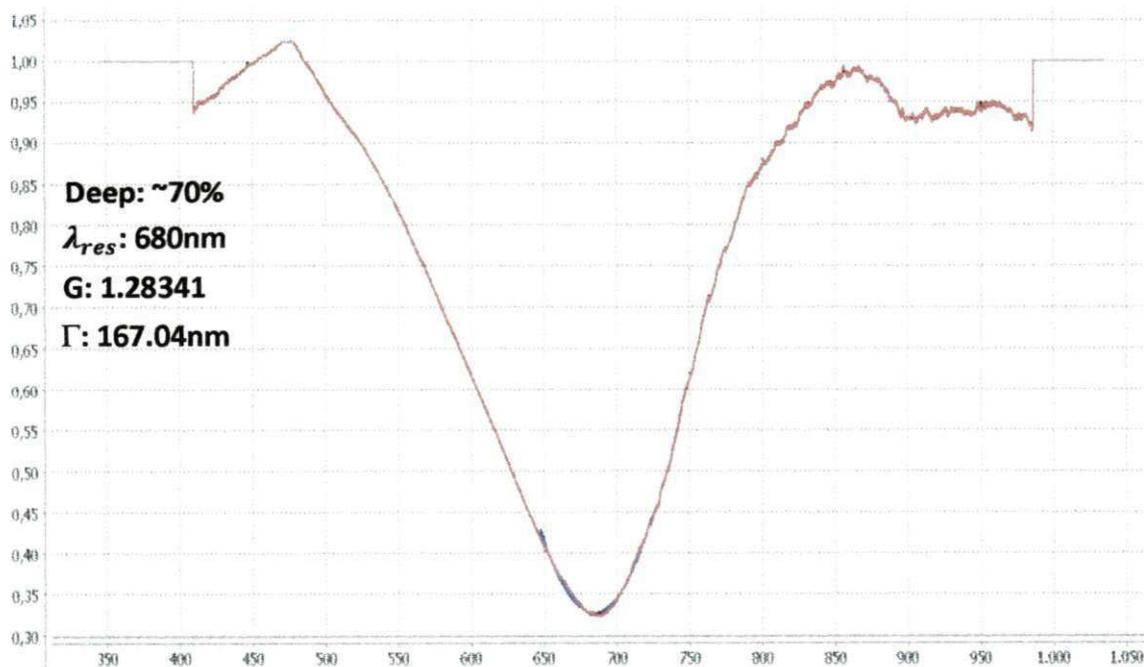


Figura 5.21 – Curva SPR para os prismas coberto com o *sputtering* K550x.

5.6 Resumo

Neste capítulo foram relatados os procedimentos necessários para o funcionamento do biossensor proposto. Detalhes sobre a customização do Sistema Operacional e sobre os softwares embarcados para os modos de operação AIM e WIM foram apresentados. Os algoritmos de suavização e detalhes sobre a unificação das partes óptica, mecânicas, eletrônicas e outras partes foram aqui retratados. Como produto final, tem-se o biossensor apresentado na Figura 5.16.

Capítulo 6

Resultados experimentais

6.1 Introdução

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos na utilização do biossensor. As figuras contidas neste capítulo ilustram os resultados para cada modo de operação. Testes com ligações reversíveis e irreversíveis foram realizados para testar a funcionalidade do biossensor

6.2 Discussão de resultados

6.2.1 Ligações reversíveis

Na Figura 6.1 é apresentado o resultado obtido pelo biossensor proposto operando no modo de interrogação espectral. O experimento consiste em monitorar a superfície sensível e verificar a resposta do biossensor quando a substância é alterada.

Definição 6.1 Denomina-se *dry cell* a imagem do sensor CCD quando o ar está em contato com a superfície sensível do *biochip*. Denomina-se *wet cell* a imagem do CCD quando se tem água por sobre a camada metálica do *biochip*.

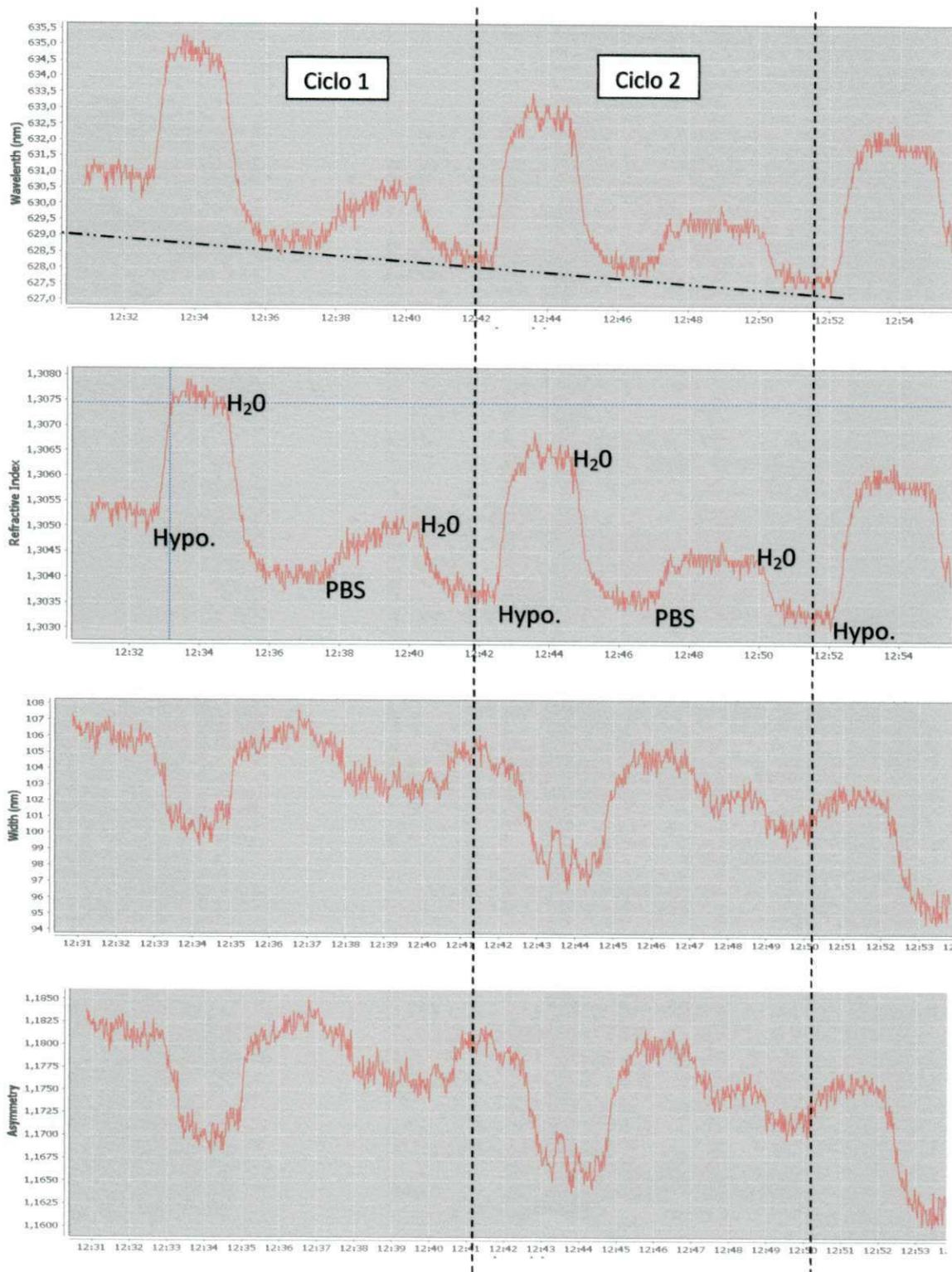


Figura 6.1 – Sensorgrama, no modo WIM, para os parâmetros comprimento de onda de ressonância, índice de refração, largura e assimetria, respectivamente.

Ao capturar-se a *dry cell* obtêm-se uma curva SPR estacionário em 1, uma vez que o sinal atual é referente ao ar, isto é, igual ao sinal de referência. No momento em que a água (H_2O) entra na célula de fluxo, *wet cell*, surgem os *plamons* de superfície e com isso presencia-se uma queda acentuada na curva SPR. Nesse momento, inicia-se o monitoramento. Quando mudamos a substância para uma solução de hipoclorito (Hypo.) o valor do comprimento de onda de ressonância aumenta. Retorna-se ao *wet cell* e troca-se a substância por uma solução de PBS (Phosphate Buffered Saline) e novamente observa-se um crescimento no λ_{res} . E retornar-se novamente para a situação de *wet cell*. Os procedimentos descritos compõem o chamado **ciclo** de teste ou ensaio de teste e são utilizados para a quantificação das variações do comprimento de onda de ressonância $\Delta\lambda_{res}$ e do índice de refração Δn .

Repetiram-se os experimentos por vários ciclos e os resultados foram equivalentes, o que atesta a consistência das respostas e garante uma reprodutibilidade de experimentos. Como se observa na Figura 6.1, o comportamento do índice de refração e do comprimento de onda de ressonância são diretamente relacionados, isto é, quando uma aumenta o outro também aumenta. O mesmo ocorre com os parâmetros largura e assimetria. Contudo, a largura e a assimetria possuem um comportamento inverso ao $\Delta\lambda_{res}$ pois seu crescimento acarretou em uma diminuição de tais parâmetros.

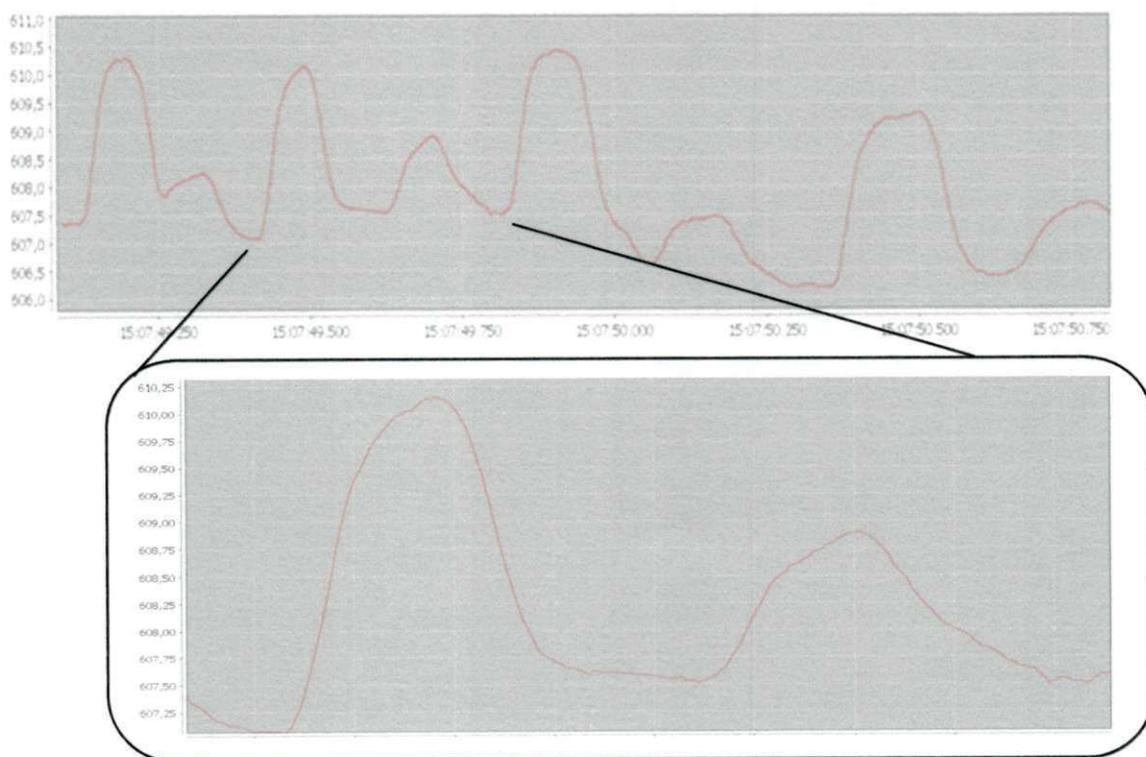


Figura 6.2 – Sensorgrama do $\Delta\lambda_{res}$ suavizado. Detalhe para ampliação de um ciclo.

Em cada ciclo, a passagem do hipoclorito remove impurezas contidas na superfície, claramente observado no deslocamento do $\Delta\lambda_{res}$ para as mesmas substâncias em cada ciclo de medição.

A suavização dos dados experimentais foi realizada, como mostra a Figura 6.2. Na figura é apresentado o sensorgrama do comprimento de onda de ressonância com uma ampliação dos dados referentes a um único ciclo de medição.

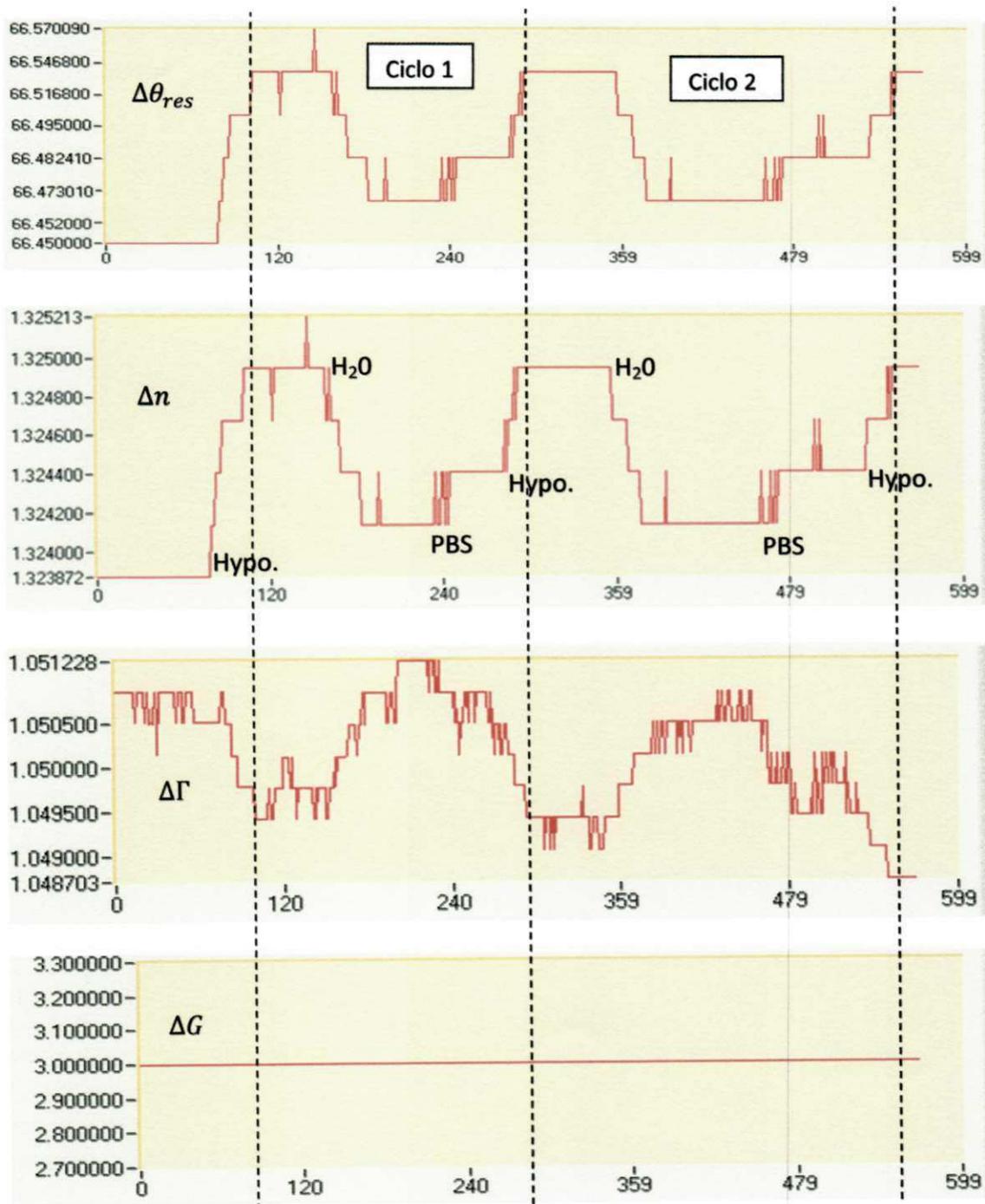


Figura 6.3 – Sensorgrama, no modo AIM, para os parâmetros ângulo de ressonância, índice de refração, largura e assimetria respectivamente.

Resultados semelhantes também foram obtidos com o modo de interrogação angular. Como mostra a Figura 6.3, o comportamento do índice de refração é diretamente proporcional ao ângulo de ressonância enquanto a assimetria relaciona-se inversamente ao $\Delta\theta_{res}$. A largura da curva SPR permaneceu constante durante os ciclos experimentais devido às variações do ângulo de ressonância terem sido pequenas.

6.2.2 Comparação com o VirTech

A validação dos resultados obtidos com o biossensor proposto para os modos de operação espectral e angular foi realizada comparando os resultados obtidos com o equipamento comercial VirTech. De posse dos dados expressos na Figura 6.4, a Tabela 6.1 mostra o quadro comparativo entre os equipamentos.

Tabela 6.1 – Quadro comparativo entre os equipamentos utilizados

	Resultados ($\Delta\theta_{res}$ e/ou $\Delta\lambda_{res}$)	
	Hipoclorito	PBS
VirTech	$5 \times 10^{-3} RIU$	$2 \times 10^{-3} RIU$
Biossensor WIM	$2.5 \times 10^{-3} RIU$	$1.1 \times 10^{-3} RIU$
Biossensor AIM	$1.3 \times 10^{-3} RIU$	$4 \times 10^{-4} RIU$

Os resultados demonstram uma maior sensibilidade por parte do Virtech em relação ao equipamento desenvolvido e este operando no modo WIM possui uma maior sensibilidade em relação ao modo AIM. As diferenças entre os modos WIM e AIM se deve a dois fatores primordiais: 1) a redução do ruído da câmera utilizada como transdutor foi menos eficiente do que o tratamento para o espectrômetro e 2) a qualidade do prisma utilizado no modo AIM é inferior ao utilizado no modo WIM.

Apesar de todos os ajustes descritos no Capítulo 5, a curva SPR para o modo WIM é mais larga, isto é, o valor mínimo é menos acentuado – facilmente percebido ao comparar as curvas spr das Figuras 2.10 e 2.13. Essa característica torna a detecção do mínimo suscetível a pequenos deslocamentos da posição de ressonância, o que dificulta a distinção entre substância com índices de refração muito próximo diminuindo sua sensibilidade.

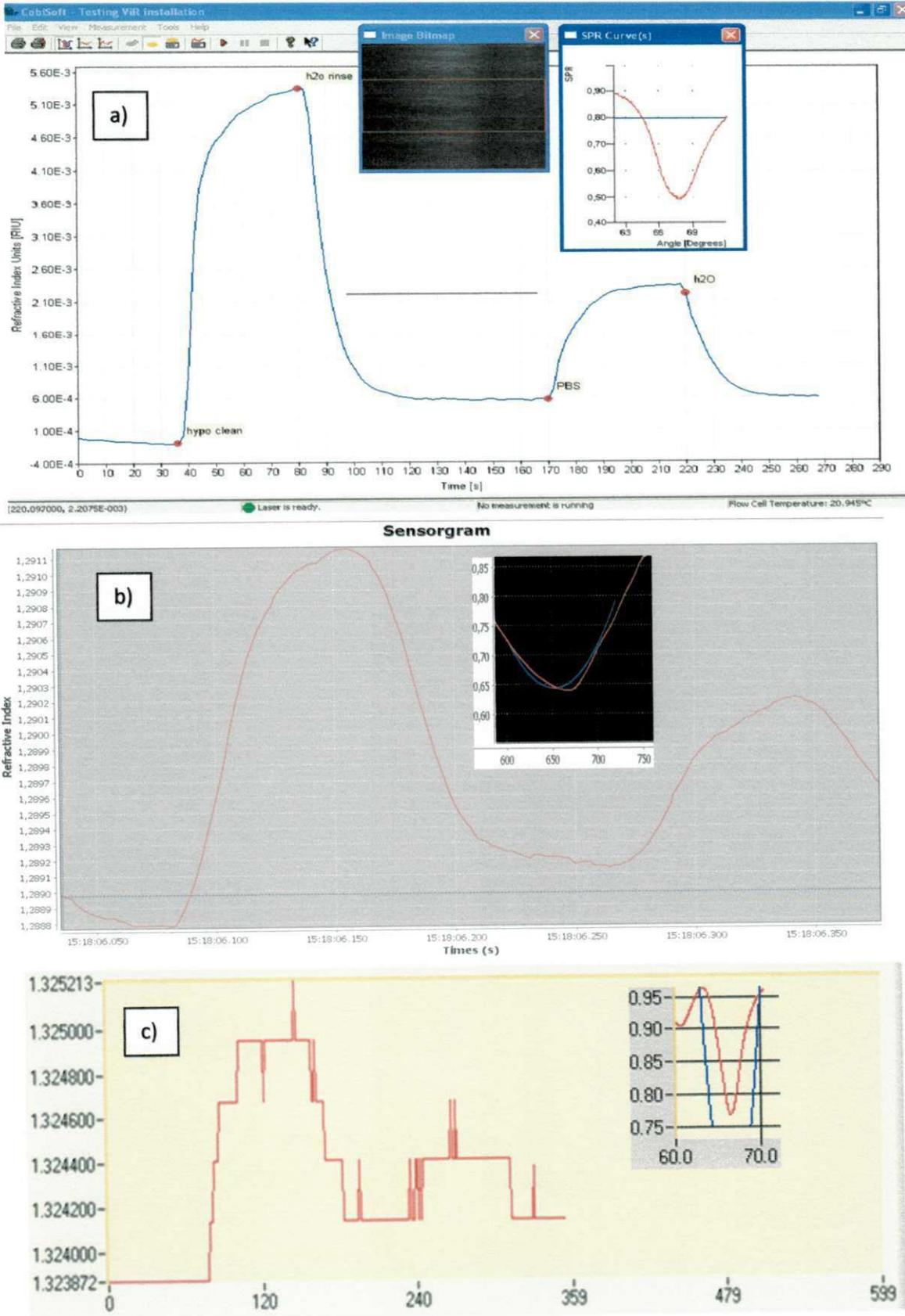


Figura 6.4 – Respostas para as montagens a) VirTech b) modo WIM e c) modo AIM

6.2.3 Ligações irreversíveis

Experimentos utilizando solução hidrófoba foram realizados para verificar a resposta do biossensor. Os sensorgramas para $\Delta\lambda_{res}$ e Δn referente à deposição de uma solução da proteína *neutravidina*, a concentração de 0,01 mg/ml, são apresentados na Figura 6.5.

Definição 6.2 A injeção de proteína na superfície sensível do *biochip* resulta em um aumento contínuo da variação do índice de refração Δn , até que se atinja a saturação. Esse momento é denominado de *monolayer* ou monocamada insolúvel.

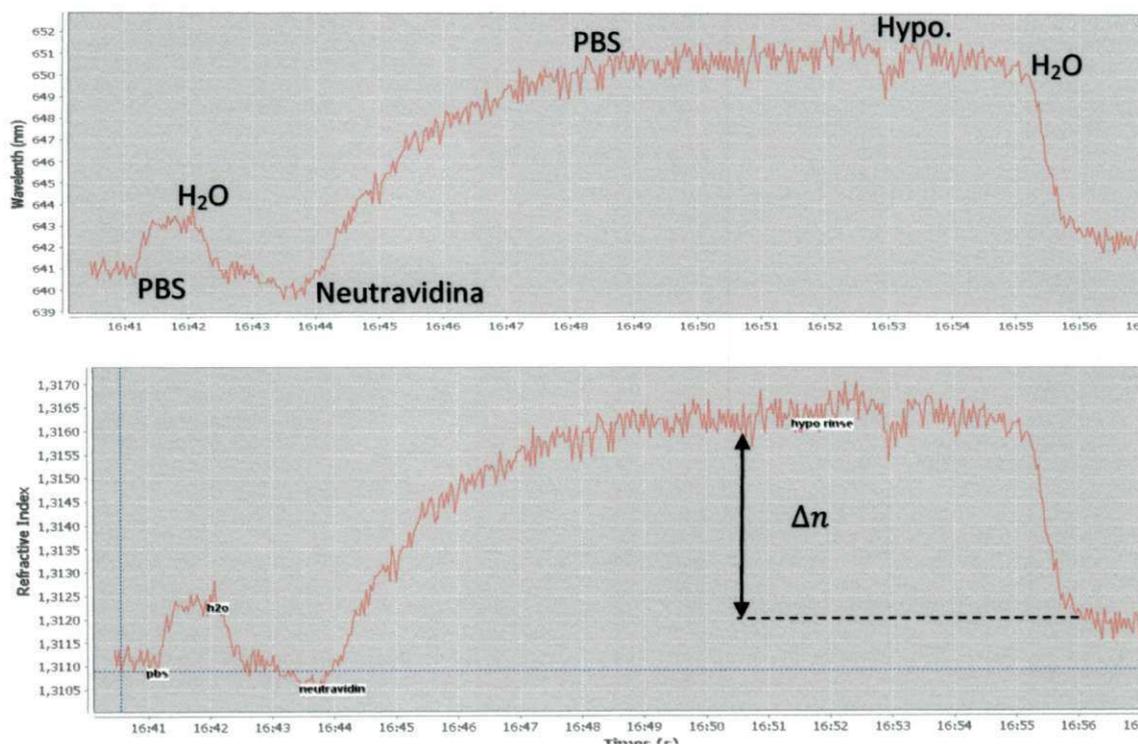


Figura 6.5 – Respostas para a deposição de neutravidina.

Após atingida a situação de *wet cell*, verificou-se a resposta do biossensor para uma solução de PBS. Em seguida, retornou-se para a *wet cell* e deu-se início ao processo de deposição da neutravidina. A *monolayer* foi alcançada cerca de 4 minutos após iniciada a deposição. Em seguida, introduziu-se PBS para checar efetivamente a formação da monocamda insolúvel, atestada por uma permanência do Δn . A *monolayer* foi então removida após a passagem de hipoclorito. Por fim, ao introduzir água, o valor da variação do índice de refração retorna para a condição de *wet cell*.

Após a suavização do sensorgrama (Figura 6.6a) comparou-se o resultado obtido com o VirTech (Figura 6.6b). O biossensor proposto obteve o mesmo valor de Δn , igual a $4 \times 10^{-3} RIU$, comprovando a eficiência e corretudo das respostas do biossensor proposto.

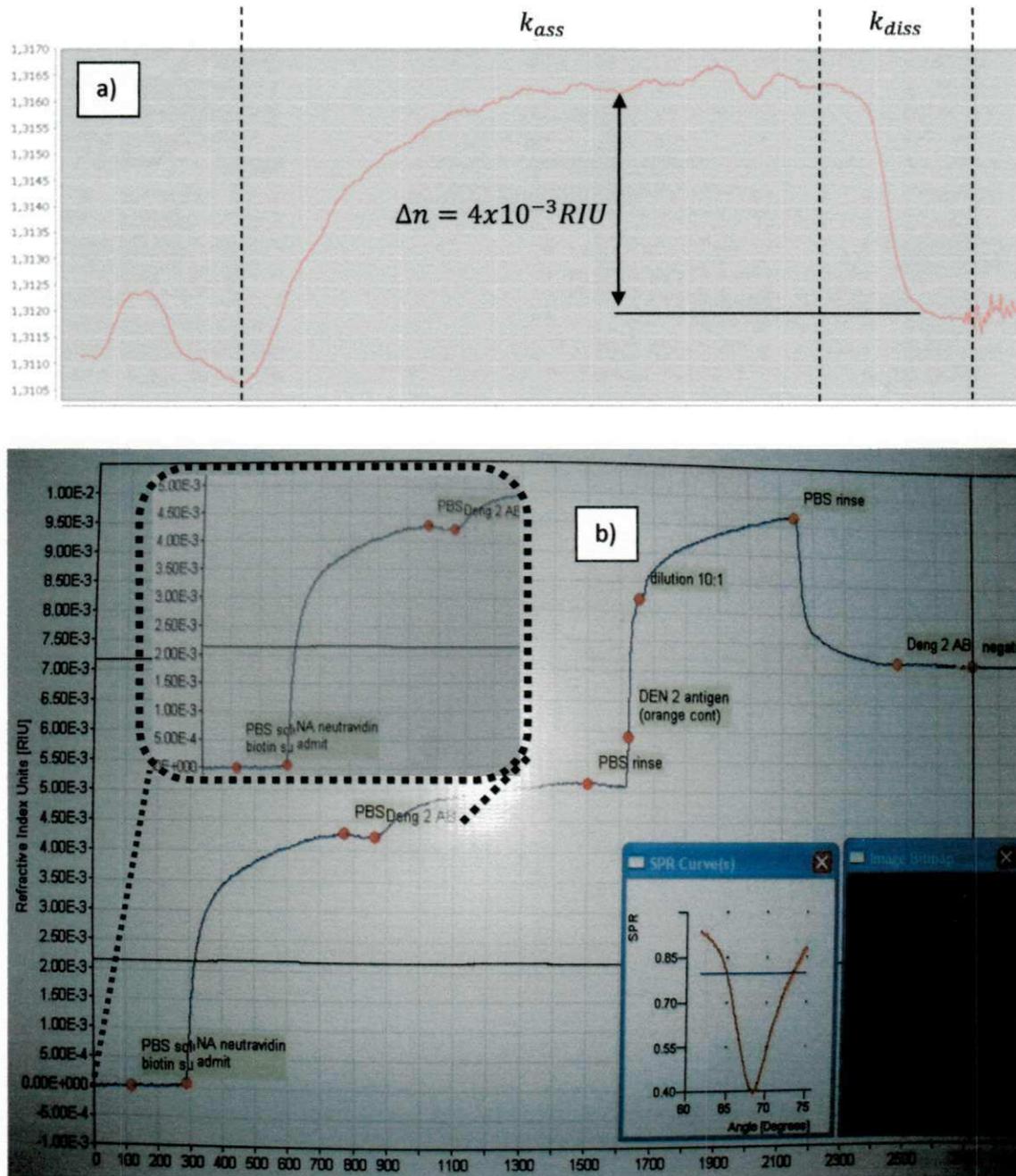


Figura 6.6 – Respostas para a deposição de neutravidina: a) sensorgrama suavizado referente ao biossensor proposto e b) resposta do VirTech

6.2.3.1 Constantes Cinéticas

Como mencionado na seção 2.4.3, o aumento da massa na camada formada junto à superfície do sensor causa um aumento proporcional no valor do índice de refração medido pelo biossensor. Esse aumento na massa, para as ligações irreversíveis, está associado a um evento de ligação, ligação essa referente a adsorção da neutravidina nos experimentos realizados.

De acordo com a Figura 6.6ª, o aumento na resposta se deve à formação do complexo, ou seja, o aumento na concentração de neutravidina, enquanto a diminuição da resposta, após a injeção do analito, se deve à dissociação do complexo, de acordo com a equação 6.1.



A taxa de formação da camada e a taxa com que esta é desfeita, são expressas pelas constantes de adsorção (k_{ass}) e dissociação (k_{diss}), respectivamente. O equilíbrio cinético ($k_{equilíbrio}$) é expresso pela relação k_{ass}/k_{diss} .

Durante a injeção, a concentração do analito injetado (A_0) é transportada para a superfície sensível do *biochip* por meio de convecção e difusão, em que sua concentração na superfície sensível (A) aumenta devido à formação do complexo [62]. Isto é, a concentração da neutravidina na superfície do *biochip* (A) está relacionada com a concentração da neutravidina que é injetada (A_0) por meio do coeficiente de transporte de massa (k_m), equação 6.1.



O coeficiente de transporte de massa é dependente do coeficiente de difusão da proteína, da dimensão da célula de fluxo além da taxa de fluxo com que o analito é injetado [62].

A fase de adsorção é descrita pela reação biomolecular entre o analito, em um solução de concentração C , e os sítios livres para ligação na superfície do *biochip* ($R_{max} - R_t$) menos a dissociação que ocorre simultaneamente durante o processo. [63]:

$$\frac{\partial R_t}{\partial t} = k_{ass}C(R_{max} - R_t) - k_{diss}R_t \quad (6.3).$$

Quando integrado, obtém-se:

$$R_t = \frac{k_{ass}CR_{max}}{k_{ass}C + k_{diss}} (1 - e^{-(k_{ass}C + k_{diss})t}) \quad (6.4).$$

Isolando a constante de adsorção tem-se:

$$k_{ass} = [\ln(R_{t1}/R_{tn}) + k_{diss} * R_{tn}]/(R_{max} - C) \quad (6.5),$$

em que: R_{t1} é a resposta referente ao início da adsorção, R_{tn} é a resposta da adsorção no tempo n e R_{max} é resposta máxima na situação de *monolayer*.

A fase de dissociação é avaliada a partir da equação 6.6 [63]:

$$\frac{\partial R_t}{\partial t} = -k_{diss}R_t \quad (6.6).$$

Quando integrado, obtém-se:

$$k_{diss} = \ln(R_{t1}/R_{tn})/(t_n - t_1) \quad (6.7),$$

em que R_{t1} é a resposta da dissociação no instante inicial e R_{tn} é a resposta da dissociação no tempo n .

Tabela 6.2 – Valores calculados para as constantes cinéticas da adsorção da neutravidina

	Resposta	
	Índice de Refração	Comprimento de onda
k_{ass}	$1.28 \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$	$4.07 \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$
k_{diss}	$4.17 \times 10^{-3} s^{-1}$	$1.30 \times 10^{-2} s^{-1}$
k_{obs}	$1.28 s^{-1}$	$4.09 s^{-1}$
$k_{equilíbrio}$	$3.07 \times 10^4 M^{-1}$	$3.13 \times 10^4 M^{-1}$

Com os valores para os parâmetros k_{ass} e k_{diss} calculados (Tabela 6.2), torna-se possível a análise gráfica da adsorção e dissociação através das equações 6.8 e 6.9, respectivamente.

$$\text{Adsorção} = R_{eq}(1 - e^{-k_{obs}t_n}) \quad (6.8),$$

$$\text{Dissociação} = R_{t1}(e^{-k_{diss}(t_n - t_1)}) \quad (6.9),$$

em que $R_{eq} = R_{max}C/[C(k_{diss}/k_{ass})]$ e $k_{obs} = (k_{ass} \cdot C) + k_{diss}$.

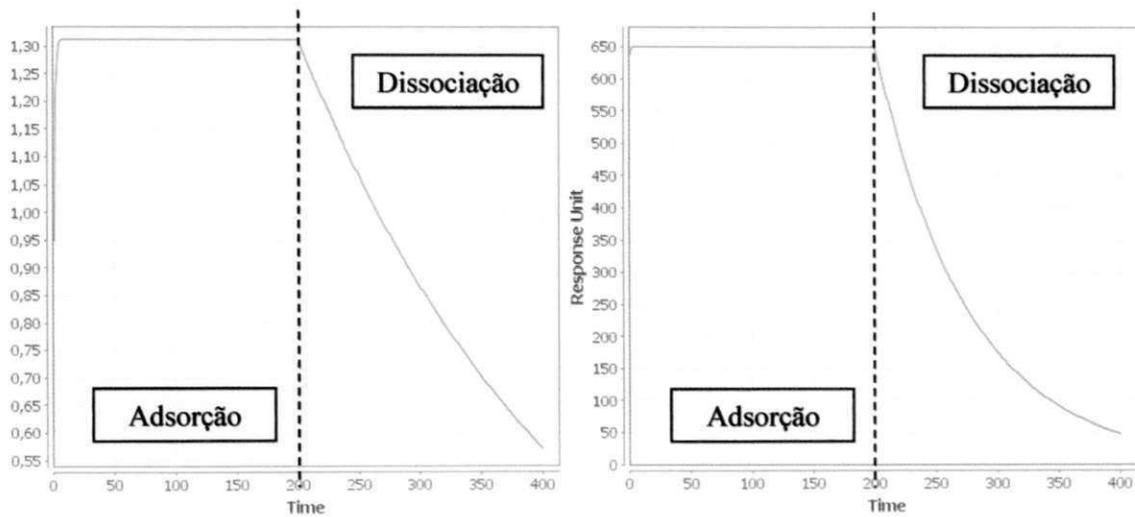


Figura 6.7 – Respostas para a constantes de adsorção e dissociação calculadas em função do sensorgrama para o a) índice de refração e para o b) comprimento de onda.

Como mostrado na Figura 6.7, o valor de k_{ass} aumenta até se estabilizar a saturação da adsorção (*monolayer*). Ao lavar a superfície do prisma com o hipoclorito ocorre a remoção da neutravidina. Em seguida, introduz-se água na célula de fluxo e o composto vai se dissolvendo uma taxa expressa por k_{diss} , conforme ilustrado, até retorna-se para situação de *wet cell*.

6.3 Conclusão

Diante dos resultados apresentados na seção 6.2 pode-se perceber coerência no funcionamento do biossensor proposto com o equipamento da VirTech, atestando a viabilidade do biossensor proposto. Os valores obtidos para o índice de refração das substâncias tiveram valores diferentes com o passar dos testes devido à interação química entre a cola do alumínio, fixado nas paredes laterais do prisma e usado como espelho para refletir os raios luminosos, e o prisma. Pelo que foi investigado, com o passar do tempo, a cola vai interagindo com o polímero do qual é composto o *biochip*, alterando o ângulo de incidência da luz e, conseqüentemente, deslocando os valores de $\Delta\lambda_{res}$ e $\Delta\theta_{res}$. Apesar disso, o biossensor obteve em sua resposta um desvio padrão de 5.82×10^{-5} RIU, que pode ser considerado pequeno mesmo com a proximidade entre as substâncias analisadas.

O Ajuste Polinomial foi a técnica utilizada para determinação do valor mínimo da curva SPR. A técnica do Primeiro Momento introduziu bastante ruído nas medições para o modo WIM devido a curva SPR para este modo ser bastante larga, tornando a posição do centro geométrico da curva bastante sensível ao ruído. A suavização dos sensorgramas foi realizada por meio do filtro da Mediana, para uma máscara de 3 pixels, máscaras maiores acarretam perda de informação.

O cálculo das constantes cinéticas é de suma importância para análise de interações biomoleculares [62,63] além de enaltecer a característica da não necessidade de marcadores para análise biomolecular do biossensor SPR.

Capítulo 7

Conclusões e trabalhos futuros

O presente trabalho relatou a construção de um sistema computacional desenvolvido especialmente para um biossensor baseado na ressonância de plasma de superfície. Seu desenvolvimento, passando pela descrição dos componentes utilizados e de que forma esses foram acoplados até os procedimentos realizados para que o sistema funcionasse, é retratado em detalhes nesta dissertação.

A idéia de utilizar componentes que fossem flexíveis ao ponto de permitir que o biossensor operasse tanto no modo de interrogação angular quanto no modo de interrogação espectral mostraram-se válidas, haja vista a qualidade dos resultados obtidos experimentalmente. Contudo, o fator primordial que viabilizou essa “operação dupla” se deve ao prisma óptico utilizado, apesar dos problemas que esse apresentou durante a realização do trabalho.

Na construção de um biossensor devem ser levados em consideração a seleção do elemento biológico apropriado, seleção do método de imobilização, seleção do transdutor adequado (luz, mudança de massa, PH, calor), o projeto do biossensor considerando a faixa de medição, linearidade e minimização de interferência e o empacotamento do biossensor. Pela investigação, foi possível concluir que o biossensor está pronto para ser utilizado como equipamento laboratorial para análise de interações biomoleculares. A detecção de substâncias específicas é factível desde que haja a imobilização do elemento de reconhecimento na superfície do *biochip*.

Um exemplo de adsorção de proteína foi realizado. Uma solução de neutravidina foi previamente preparada e analisada com o equipamento. O biossensor proposto apresentou resultados coerentes.

As técnicas de suavização do ruído utilizadas mostraram-se essenciais à operação do equipamento, uma vez que o equipamento foi utilizado para detectar

substâncias com índices de refração muito próximos, em torno de 10^{-4} RIU, exigindo que o nível de ruído operasse na ordem de 10^{-5} RIU. Dentre os algoritmos implementados para detecção do valor de ressonância, o método do Ajuste Polinomial foi o único que ofereceu níveis adequados de ruído para o nível de distinção (diferenças de índices de refração) entre os analitos investigados.

A análise morfológica da curva SPR foi embutida no biossensor permitindo o cálculo da largura e assimetria em medições realizadas com o biossensor. As respostas obtidas estão de acordo com as simulações para os modos AIM (Figura 3.2a) e WIM (Figura 3.2b) além de estar em equidade operacional com o VirTech.

Investigar novas maneiras de minimizar o ruído do equipamento, atacando vertentes como o controle de temperatura, algoritmos de processamento de dados e detecção do mínimo da curva SPR e procedimentos para fabricação e cobertura do *biochip*, são alguns dos aspectos que podem vir a melhorar o funcionamento do biossensor.

Estudos sobre a detecção simultânea de substâncias (múltiplos *spots*) para cada um dos modos de operação, além de um estudo de como combinar os modos de operação WIM e AIM em um único prisma merecem destaque.

Otimizações no sistema fazem-se necessárias para que se presencie sua atuação em campo. Entretanto os resultados mostram que esta pesquisa é o início de posteriores trabalhos, visto que há a necessidade de minimizar a subjetividade dos diagnósticos e para tanto o biossensor SPR fornece respostas precisas da presença ou não de substâncias (analito) de interesse.

Referências

- [1] DECIT - Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde. Health Technology Assessment: institutionalization of actions in the Brazilian Ministry of Health. *Rev. Saúde Pública*, v. 40, n. 4, p. 743-747, 2006.
- [2] KUBIK, T.; BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M. Nanotechnology on duty in medical applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* v.6, n. 1733, 2005.
- [3] VO-DINH, Tuan; CULLUM, Brian. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J Anal Chem*, v. 366, p. 540-551, 2000.
- [4] AHN, Chong H.; CHOI, Jin-Woo; BEAUCAGE, Gregory; NEVIN, Joseph H.; LEE, Jeong-Bong; PUNTAMBEKAR, Aniruddha. Disposable Smart Lab on a Chip for Point-of-Care Clinical Diagnostics. *PROCEEDINGS OF THE IEEE*, v. 92, n. 1, JANUARY 2004
- [5] ZAYTSEVA, Natalya V.; MONTAGNA, Richard A.; LEE, Eun Mi; BAEUMNER, Antje J. Multi-analyte single-membrane biosensor for the serotype-specific detection of Dengue virus. *Bioanal. Chem.* v. 380, p. 46-53, 2004.
- [6] POHANKA, Miroslav; SKLÁDAL, Petr; KROËA, Michal. Biosensors for Biological Warfare Agent Detection. *Defence Science Journal*, v. 57, n. 3, p. 185-193, Mai 2007.
- [7] MOREIRA, C.S.; BARRETO NETO, A.G.S.; LIMA, A.M.N.; TRIRSTRUP, Carsten; NEFF, F. H. Exchangeable low cost polymer biosensor chip for surface plasmon resonance spectroscopy, *Procedia Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 1479-1482 Set 2009.
- [8] THIRSTRUP, W. Z. C.; NEFF, H. Surface plasmon resonance sensor. Patent Application Publication, v. 0018194 A1, 2005
- [9] IUPAC. *IUPAC Compendium of Chemical Technology*. 1997. Disponível em: <<http://www.iupac.org/goldbook/B00663.pdf>> Acessado em: 06 Mar 2010.
- [10] RODRIGUEZ, Maria Lorena López. *Transdutores e Sensores: Biosensores*. Bioing, 1999.
- [11] CHINOWSKY, T. M. *Optical Multisensors based on Surface Plasmon Resonance*. Tese doutorado. University of Washington, 2000.
- [12] FURTADO, Roselayne Ferro; DUTRA, Rosa Amália Fireman; ALVES, Carlucio Roberto; PIMENTA, Maria Gardenny Ribeiro; GUEDES, Maria Izabel Florindo. *Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos*. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fortaleza, 2008.

- [13] MOREIRA, Cleumar da Silva. Projeto e realização de um biochip óptico, para aplicações biológicas baseado no princípio de ressonância de plasmons de superfície. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande 2010.
- [14] GIL, M. Ángel L.; APODACA, F. O. O. de. Inmunosensores: herramientas analíticas con un gran potencial de futuro. *Schironia*, n. 1, Nov 2002.
- [15] TOBISKA, Petr. Advanced Data processing for Spr Biosensor. Doctoral Thesis. Charles University. Faculty of Mathematics and Physics. Institute of Radio Engineering and Electronics Academy of Sciences of the Czech Republic. Prague, 2005.
- [16] TURNER, A. P. F. Biosensors: Past, present and future. *Cranfield University*, 1996 Disponível em <<http://www.cranfield.ac.uk/health/researchareas/biosensorsdiagnostics/page18795.html>>. Acessado em 14 Jul 2010.
- [17] LIEDBERG, Bo; NYLANDER, Claes; LUNDSTRÖM, Ingemar. Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started. *Biosensors & Bioelectronics* v. 10, p 1-9, 1995.
- [18] RICH, Rebeca L.; MYSZKA, David G. Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition*, v. 19, p.478-534, 2006.
- [19] APADOCA, Fidel Ortega Ortiz de. Biosensores y Biochips: Herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. Instituto da España: Real Academia Nacional de Farmacia, Madri 2006.
- [20] THÉVENOT, Daniel R.; TOTH, Klara; DURST, Richard A.; WILSON, George S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, p. 121–131, 2001.
- [21] D’ORAZIO, Paul. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. v.334, p. 41-69, Issues 1-2, Ago 2003.
- [22] BICKERSTAFF, Gordon F. Immobilization of enzymes and cells. *Methods in Biotechnology*, Vol. 1. *Humana Press Inc* 1997.
- [23] DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim. Nova*, v.27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- [24] MORGAN, Claire L.; NEWMAN, David J.; PRICE, Christopher P. Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clinical Chemistry* 42, No.2 1996.
- [25] MARAZUELA, María Dolores; MORENO-BONDI, María Cruz. Fiber-optic biosensors: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 372, p. 664–682, 2002.
- [26] WHITE, Richard. M. Acoustic sensors for physical, chemical and biochemical applications. *Proceedings of 1998 IEEE INTERNATIONAL FREQUENCY CONTROL SYMPOSIUM*, p. 587–594, 1998.

- [27] FERREIRA, Antonio Aparecido Pupim. YAMANAKA, Hideko. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. *Quim. Nova*, Vol. 29, n.1, p. 137-142, 2006.
- [28] HECHT, Eugene, *OPTICS*. 4ª Edição. Addilson Wesley, 2002.
- [29] NOGUEIRA, Elisabete; GUIMARÃES, Pedro. Óptica e Optoeletrônica - Equações de Fresnel. Disponível em <<http://www.defi.isep.ipp.pt/~emn/OPTICA/teorica/sebenta/equaFRESNEL1.pdf>> Acessado em 21 Abr. 2010.
- [30] PÉREZ, Carlos Ariel Samundio. O modelo do elétron livre de Drude completa 100 anos. *Cad.Cat.Ens.Fis.*, v.17, n.3: p.348-359. Passo Fundo – RS. 2000
- [31] KANSO, M.; CUENOT, S.; LOUARN, G. Roughness effect on the SPR measurements for an optical fibre configuration: experimental and numerical approaches. *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 9 586–592, 2007.
- [32] HOMOLA, Jiri; YEE, Sinclair S.; GAUGLITZ, Günter. Surface plasmon resonance: review. *Sensors and Actuators B*, v. 54, p. 3–15, 1999.
- [33] ÖZDEMIR, S. K.; TURHAN-SAYAN, G. Temperature effects on surface plasmon resonance: Design considerations for an optical temperature sensor. *Journal of Lightwave Technology*, v. 21, n. 3, p. 805–814, 2003.
- [34] NEFF, H.; ZONG, W.; LIMA, A.M.N.; BORRE, M.; HOLZHÜETER, G. Optical properties and instrumental performance of thin gold films near the surface plasmon resonance. *Thin solid Films*, v. 496, p. 688–697, October 2006.
- [35] GARCIA, Maria N. Velasco-; MOTTRAM, Toby. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosystems Engineering*, v. 84, p. 1-12, 2003
- [36] DEITEL, H. M. DEITEL, P. J. *Java Como Programar*. 6ª Edição. Porto Alegre: Bookman. 2005.
- [37] NATIONAL INSTRUMENTS. What Is LabWindows/CVI. Disponível em <http://www.ni.com/lwcv/what_is.htm> Acessado em 27 Ago 2011.
- [38] THISTRUP, C.; ZONG, W.; BORRE, M.; NEFF, H.; PEDERSEN, H.C.; HOLZHÜETER, G. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. *Sensors Actuators B:Chemical*, v. 100, n. 3, p. 298–308, Mai 2004.
- [39] MOREIRA, C. S. ; Lima, A. M. N. ; H. Neff . Sistema Reconfigurável para Monitoramento de Temperatura Baseado na Ressonância de Plásmons de Superfície. Congresso Brasileiro de Automática, 2008.
- [40] National Direct Network “SPR Evaluation Kit” Disponível em: <<http://ndn.co.th/products%20index/Instrument%20biosensor.html>> Acessado em 14 Jul 2011.

- [41] SERNELIUS, Bo E. Surface modes in physics. 1. ed. Berlin: Wiley-VCH, 2001, p. 24-64.
- [42] FILHO, Carlos Alberto de Souza. Desenvolvimento de um sistema eletrônico de aquisição e processamento para biossensores. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande 2006.
- [43] NENNINGER, Garet G.; PILIARIK, Marek; HOMOLA, Jiri. Data analysis for optical sensors based on spectroscopy of surface Plasma. Measurement Science and Technology v. 13, p. 2038-2046. 2002.
- [44] EDMUND OPTICS, Unmounted Linear Glass Polarizing Filters. Disponível em <<http://www.edmundoptics.com/onlinecatalog/displayproduct.cfm?productID=1558>> Acessado em 23 Set. 2010.
- [45] LUXEON STAR, Power light source - Luxeon Star. Disponível em <<http://www.ledsupply.com/docs/Luxeon-StarI.pdf>> Acessado em 12 Set 2010.
- [46] ISMATECH, Web site. Disponível em <http://www.ismatec.com/images/pdf/manuals/Reglo_Digital_new.pdf> Acessado em 22 Set. 2010.
- [47] MOREIRA, C.S.; BARRETO, A.G.S.; OLIVEIRA, Leiva C.; LIMA, A.M.N.; LOUREIRO, F.C.C.; NEFF, H. A low-cost autosampler for surface plasmon resonance biosensor platforms. XIX IMEKO World Congress. 06 Set 2009.
- [48] OCEAN OPTICS, USB4000 Miniature Fiber Optic Spectrometer, Disponível em <<http://www.oceanoptics.com/products/usb4000.asp>> Acessado em 21 Set. 2010.
- [49] THORLABS, LC1-USB Linear Camera Disponível em <<http://www.thorlabs.us/catalogPages/963.pdf>> Acessado em 27 Out 2011.
- [50] VIA Technologies, Pico ITX EPIA PX1000G <<http://www.via.com.tw/en/products/embedded/ProductDetail.jsp?id=472>> Acessado em 12 de Ago 2011.
- [51] OCEAN OPTICS, USB4000 Datasheet.
- [52] JAIN, Raj. The art of computer systems performance analysis: Techniques for Experimental Design, Measurement, Simulation and Modeling. Wiley-VCH, 1991.
- [53] TOSHIBA, CCD Linear Image Sensor TCD1304AP Datasheet.
- [54] OLIVEIRA, Leiva C.; GRILO, Luiz C.P.; LIMA, A.M.N; MELCHER, Elmar K.U. Controller for surface plasmons resonance based biosensor using Reconfigurable Computing and Virtual Instruments. IX Semetro World Congress, Set 2011
- [55] NATIONAL INSTRUMENTS. National Instruments VISA. Disponível em <<http://www.ni.com/visa>> Acessado em 27 Ago 2011.

- [56] LITWILLER, Dave, CMOS vs. CCD: Maturing Technologies, Maturing Markets. *Photonics Spectra*, p.54-59, Ago 2005
- [57] GAMAL, A. E.; ELTOUKHY, H. Cmos image sensors. *IEE Circuits and Devices Magazine*, v. 21, n. 3, p. 6–20, Jun 2005.
- [58] YAMAMOTO, Masahiro. Surface Plasmon Resonance (SPR) Theory: Tutorial. 7. Mai 2007.
- [59] CARVALHO, Rosangela M. de; RATH, Susanne; KUBOTA, Lauro T. Spr - uma nova ferramenta para biossensores. *Química Nova*, v. 26, n. 1, 2006.
- [60] AKARMAN, Mauro. A elaboração do Vidro. CETEV-Centro Técnico de Elaboração do Vidro, SAINT-GOBAIN Vidros Brasil, Nov 2000.
- [61] THORLABS, High-Speed Photodetectors – DET10A/M. Disponível em <<http://www.thorlabs.com/catalogpages/v20/1286.pdf>> Acessado em 3 Dez 2011.
- [62] MYSZKA, David G. Kinetic analysis of macro molecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 8, n. 1, p. 50-57, Fev 1997.
- [63] NIEBA, Lars; KREBBER, Anke; PLÜCKTHUN, Andreas. Competition BIAcore for Measuring True Affinities: Large Differences from Values Determined from Binding Kinetics. *Analytical Biochemistry*, v. 234, n. 67, p. 155–165, 1996.
- [64] KRICKA, Larry J. Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century. *Clinica Chimica Acta* n. 307, p.219-223, 2001.
- [65] TURNER, Anthony P.F. Biosensor for Diabetes Care. Cranfield University. BioSensing Technology Conference, 2009.
- [66] MORROW, K. John. L. Label-Free Biosensors Show Early Promise: Optical and Nonoptical Platforms Are On the Heels of Conventional ELISA. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, v. 27, n. 4, Feb 2007
- [67] ATTRIDGE, J. W.; DANIELS, P. B.; DEACON, J. K.; ROBINSON, G. A.; DAVIDSON, G. P. Sensitivity enhancement of optical immunosensors by the use of a surface plasmon resonance fluoroimmunoassay. *Biosensors & Bioelectronics*, n.6, p. 201-214, 1991.
- [68] PRESSMAN, R. S. Engenharia de Software. São Paulo: McGraw Books do Brasil, 1995.
- [69] GUERRERO, C. V. S.. MEDITE - Uma Metodologia Orientada a Modelos para Concepção de Interfaces Ergonômicas. Dissertação de Mestrado em Informática. UFCG. Campina Grande, PB. Fevereiro de 2002.

[70] PATERNÒ, F.. Tools for Task Modelling: Where we are, Where we are headed. 1st International Workshop on Task Models and Diagrams for user interface design. Bucharest, Romania. Julho de 2002.

[71] LAUESEN, S.. Task Descriptions as Functional Requirements. IEEE Software 2003. p.58-65. Disponível em www.itu.dk/people/slauesen/Papers/IEEEtasks.pdf. Acessado em 01 Dez de 2011.

Apêndice A

A1. Ajustes do prisma óptico

Uma vez que não havia mais prisma em condições funcionais para realização dos experimentos, novos prismas tiveram de ser “trabalhados” para tornarem-se operacionais. As seções A1.1 e A1.2 descrevem os trabalhos realizados sobre o prisma antes da realização dos experimentos.

A1.1 *Annealing*

O *annealing* é um processo em que o calor é aplicado em um material a fim de mudar sua estrutura interna de tal forma que o material vai se tornar mais “suave” [60]. Usado na fabricação de vidro e na indústria metalúrgica o *annealing*, ou recozimento, nada mais é do que o aquecimento e o posterior esfriamento lento e homogêneo do material [60]. Assim, o prisma foi aquecido até a temperatura de relaxamento das tensões, mantidos a esta temperatura pelo tempo necessário ao relaxamento e resfriados controladamente até a temperatura ambiente, diminuindo o *stress* do material.

A Figura A.1 mostra diferentes prismas sob uma polarização TM. Com essa polarização a luz deve ser bloqueada, o que fornecerá o fenômeno SPR. Nos prismas que não possuem *annealing* a luz atravessa-o, não obtendo a polarização necessária. A figura também traz imagens de prismas polidos e não polidos mostrando que esse processo também é importante para um bom resultado.

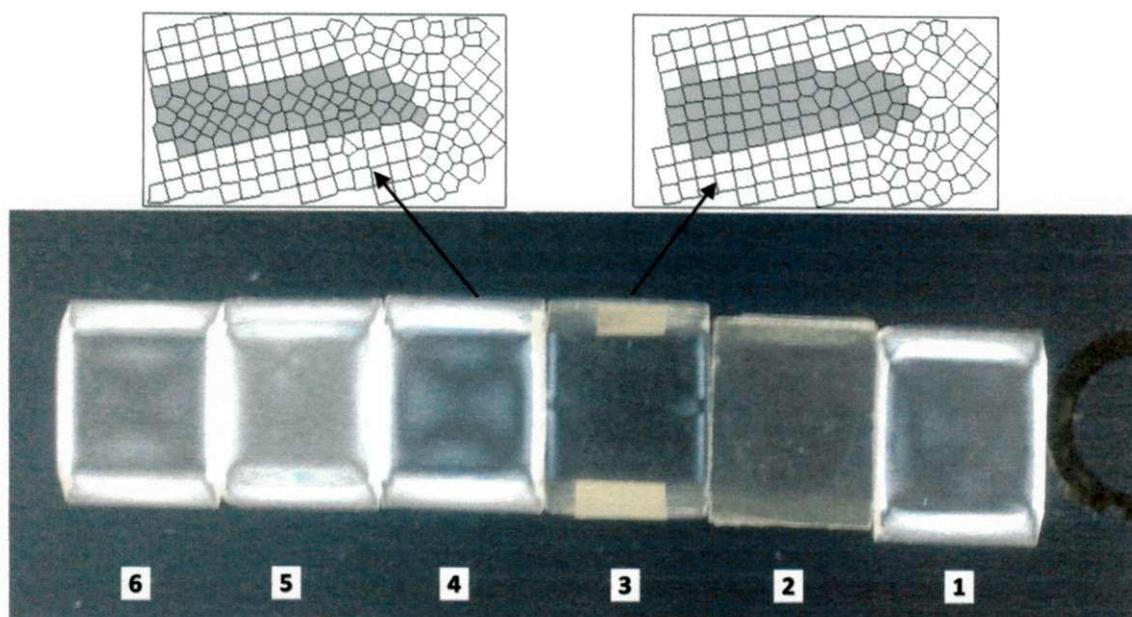


Figura A.1 – Fotografia para prismas com (1,2,3) e sem (4,5,6) *annealing*, com destaque para diferenças em suas estruturas internas, polidos (3,4) e não polidos (1,2,5,6).

A1.2 Camada metálica

Na tentativa de cobrir o prisma com a camada de ouro de 50nm foi usado, inicialmente, o equipamento da empresa Sanyu, modelo SC-701, pertencente ao laboratório de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande. O laboratório não possui argônio, sendo a pressão para criar o vácuo realizada sob gás atmosférico. O controle da corrente é totalmente manual, o que aumenta a incerteza sobre a espessura da camada obtida. Após a deposição, os prismas foram testados e observou-se uma alta fragilidade no filem de ouro (Figura A.2b) e a não obtenção da resposta SPR (Figura A.2a).

Para obter uma melhor qualidade da deposição do filme metálico, utilizou-se o equipamento de pulverização catódica K550x da empresa Emitech pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal da Paraíba, sediado na cidade de João Pessoa. Conforme mencionado no manual do equipamento, deve-se ajustar a pressão do argônio para 1pis ou 0.3 bar , ajustar o equipamento para operar no

vácuo de 1×10^{-1} mbar e especificar a corrente de deposição e o tempo de permanência dos prismas na câmara de vácuo.

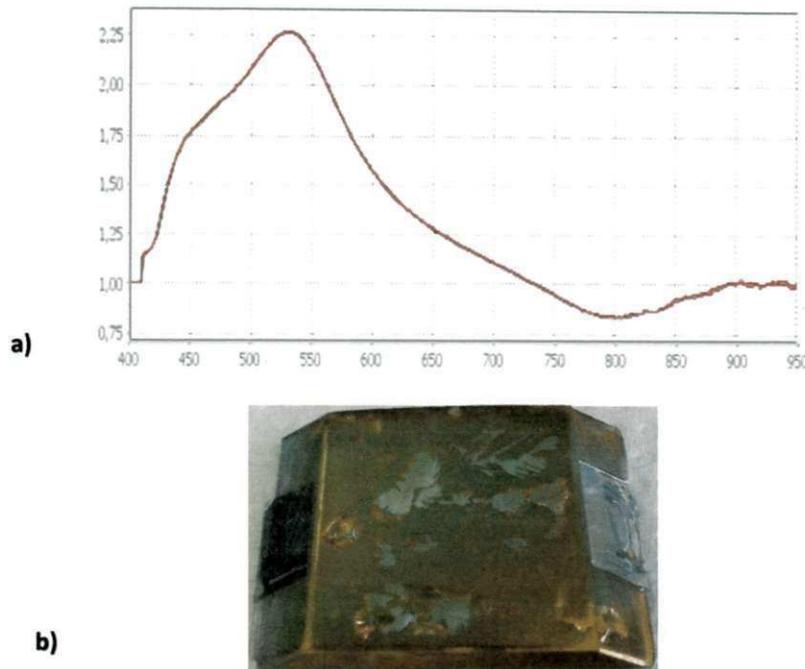


Figura A.2 – a) Curva SPR distorcida obtida com o b) prisma cuja superfície metálica foi depositada com o *sputtering* Sanyu SC-701

O ajuste do tempo e da corrente de deposição são necessários para estimar a espessura do filme depositado. O equipamento fornece essa relação através do gráfico da Figura A.3. Baseando-se no gráfico, e sabendo que o equipamento possui uma restrição operacional de 4 minutos, ajustou-se a corrente em 40mA, o que obter-se-ia aproximadamente 12.5nm deixando o prisma exposto durante 2 minutos, totalizando os 50nm.

Ao retirar os prismas, três prismas eram colocados dentro da câmara de vácuo por procedimento, percebeu-se que a camada de ouro obtida estava muito abaixo dos 50nm. Com isso repetiu-se o processo por mais cinco vezes, totalizando 10 minutos a uma corrente de 40mA. Esses procedimentos foram necessários para a obtenção de respostas com o nível de qualidade apresentado na Figura 5.12.

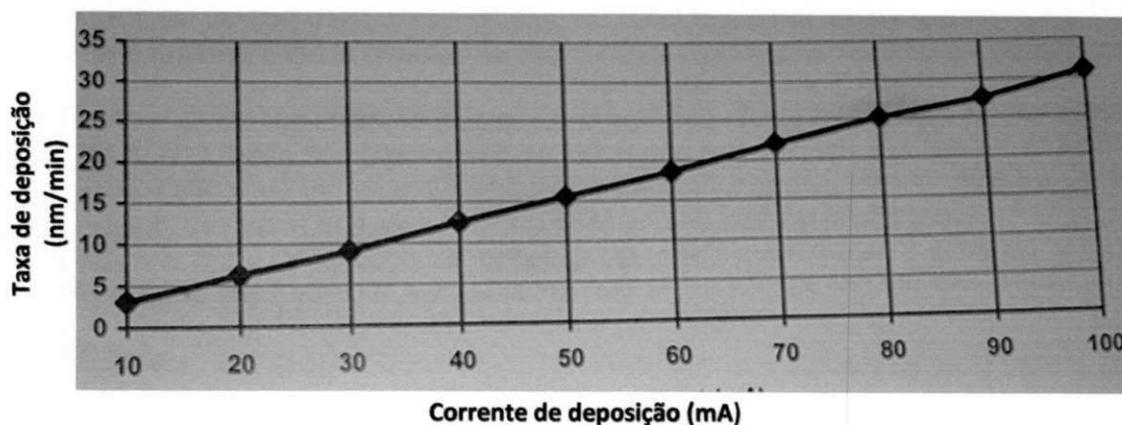


Figura A.3 – Gráfico que mostra a espessura esperada em função da taxa de *sputtering* a 1×10^{-1} mbar

A2. Ajustes na Célula de Fluxo

Os prismas não possuem uma superfície completamente plana, o que ocasiona a formação de bolhas, entrada de ar dentro da célula, ao acoplarmos a célula de fluxo ao prisma, como retrata a Figura A.4. A presença de bolhas torna o acompanhamento do fenômeno SPR bastante difícil, uma vez que o sinal a ser medido torna-se igual ao sinal tomado como referência, ou seja, o sinal referente ao ar.

Esse problema foi amenizado com os seguintes ajustes:

- Calços para amenizar o desnível entre o prisma óptico e a peça de encaixe;
- Troca do sentido de deslocamento do fluido dentro da célula de fluxo: troca-se a **geração do vácuo** dentro da célula por uma remoção do ar presente na célula aplicando uma **pressão** sobre a mesma.

A troca do sentido de deslocamento mostrou-se bastante eficiente uma vez que o perfil de concentração da substância dentro da célula de fluxo está mais próximo da entrada da célula, ou seja, antes de passar pela região onde é usada para medição do efeito SPR (região de contato com a superfície de ouro).

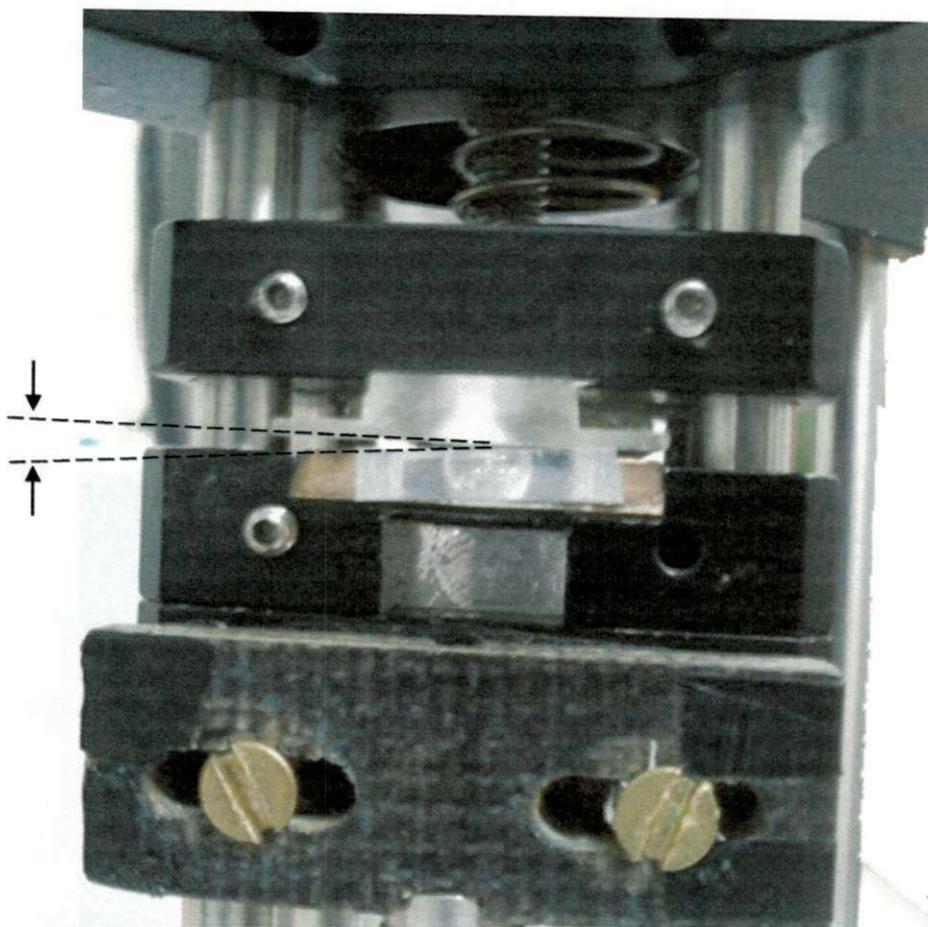


Figura A.4 – Célula de fluxo acoplada ao prisma. Detalhe para o desnível responsável pela formação de bolhas dentro da célula.