

# Contribuição ao Projeto de Sistemas Multianalíticos Baseados em Ressonância de Plasmons de Superfície

Carlos Alberto de Souza Filho

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande - Campus de Campina Grande como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências no Domínio da Engenharia Elétrica.

Área de Concentração: Processamento da Informação

Antônio Marcus Nogueira Lima, Dr..

Orientador

Helmut Neff, Dr.

Orientador

Campina Grande, Paraíba, Brasil

©Carlos Alberto de Souza Filho, Março de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

S726c

Souza Filho, Carlos Alberto de.

Contribuição ao projeto de sistemas multianalíticos baseados em ressonância de plasmons de superfície / Carlos Alberto de Souza Filho. – Campina Grande, 2017.

150 f. il.: color.

Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. Antônio Marcus Nogueira Lima, Prof. Dr. Helmut Neff".

Referências.

1. Biossensor. 2. Ressonância de Plasmons de Superfície. 3. SPR. 4. *Smartphone*. I. Lima, Antônio Marcus Nogueira. II. Neff, Helmut. III. Título.

CDU 621:539.194(043)

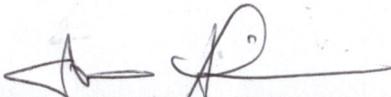
**"CONTRIBUIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIANALÍTICO  
BASEADO NA RESSONÂNCIA DE PLASMA DE SUPERFÍCIE"**

**CARLOS ALBERTO DE SOUZA FILHO**

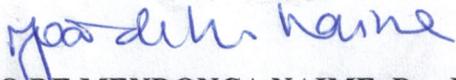
**TESE APROVADA EM 28/03/2017**

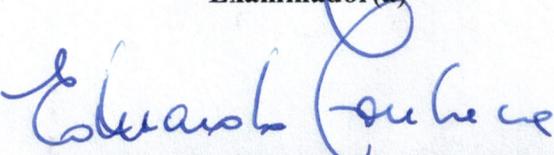
  
**ANTONIO MARCUS NOGUEIRA LIMA, Dr., UFCG**  
Orientador(a)

  
**FRANZ HELMUT NEFF, Dr, UFCG**  
Orientador(a)

  
**ANGELO PERKUSICH, D.Sc., UFCG**  
Examinador(a)

  
**ELMAR UWE KURT MELCHER, Dr., UFCG**  
Examinador(a)

  
**JOÃO DE MENDONÇA NAIME, Dr., EMBRAPA**  
Examinador(a)

  
**EDUARDO FONTANA, Ph.D., UFPE**  
Examinador(a)

**CAMPINA GRANDE - PB**

## **Dedicatória**

Dedico este Trabalho de Doutorado a toda minha família e amigos os quais foram essenciais para formação da minha pessoa, permitindo que tivesse força e perseverança necessárias. Dedico especialmente aos meus filhos Carlos Eduardo Medeiros Oliveira Souza e Ana Beatriz Medeiros Oliveira Souza, pois, sempre me deram uma alegria renovadora e foram o principal motivo para que nunca desistisse diante das dificuldades encontradas. Dedico a minha esposa Anelise Medeiros que foi meu porto seguro encarando e enfrentando todos os problemas ao meu lado. Dedico ao meu irmão André Sales de Souza, sem o qual não teria forças para superar os momentos mais difíceis que passei em função do doutorado.

# Agradecimentos

Agradeço acima de tudo a Deus por me dar forças, paciência e saúde para enfrentar e superar todas as barreiras encontradas.

Agradeço aos professores Antônio Marcus Nogueira de Lima, Dr. e Helmut Neff, Dr., pela orientação, paciência, compreensão e colaboração sem as quais não seria possível realizar este trabalho.

Agradeço ao Professor Marcos Moraes que sempre me motivou e me apoiou com seu vasto conhecimento na solução de problemas encontrados durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço ao meu pai Carlos Alberto por ter me ensinado, ainda quando muito pequeno, o significado e valor da perseverança, sem a qual não se alcança nenhum objetivo.

Agradeço a minha mãe Marilene por todo o carinho, amor e por ter me ensinado que a honestidade deve sempre prevalecer, sendo a educação a única forma de se progredir honestamente.

Agradeço aos meus filhos Carlos Eduardo e Ana Beatriz, pois proporcionaram e proporcionam os momentos mais felizes da minha vida. Eles me confortam e me dão alegria em momentos tristes e de angústias, o que me deu forças e motivos para perseverar e nunca desistir diante de todas as dificuldades encontradas na tentativa de terminar o doutorado.

Agradeço a minha esposa Anelise Medeiros que reconheceu a necessidade de assumir responsabilidades que eram minhas para que pudesse me dedicar a conclusão do doutoramento, demonstrando apoio e dedicação como companheira e mãe.

Agradeço a meu irmão André Sales por sua fé, amizade, apoio e orientação nos momentos difíceis em que mais precisei.

Agradeço a minha cunhada Naara pela motivação sincera e sem cobranças.

Agradeço a professora Fernanda Cecília Correia Lima Loureiro que foi essencial para que não desistisse por todo seu apoio, reconhecimento e amizade.

Agradeço a todos os meus amigos que tive oportunidade de compartilhar conhecimentos durante todo este período, dentre eles Arlido, Alfranke, Cleomar, Jadson Lee e Hermano.

Agradeço ao professor Alexsandro José Virgínio que sempre se ofereceu a ajudar e incentivou para que pudesse dar continuidade ao trabalho. Agradeço aos companheiros professores do departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal da Paraíba, em especial a Alexsandro, Fabrício, Protásio, José Maurício, Lucas, Nady, Juan e todos do grupo do almoço e café pelos momentos de descontração e apoio.

Agradeço aos meus amigos Bosco Lourimar, Elcio de Lucena, Hugo Paiva e Eliza Fernanda pela amizade, apoio e compreensão para superar todas as dificuldades encontradas.

Também agradeço ao CNPq e à CAPES que proporcionou o suporte financeiro para viabilizar a realização deste trabalho.

## Resumo

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um sistema multianalítico portátil baseado em Ressonância de Plasmons de Superfície (SPR). A solução proposta visa transformar um dispositivo computacional portátil comercial existente, como *smartphones*, *tablets* e *notebooks*, em um instrumento capaz de analisar substâncias orgânicas e inorgânicas. Desta forma minimiza-se consideravelmente o custo comparado aos dispositivos convencionais baseados em SPR, além de proporcionar a utilização em locais remotos e abrir a possibilidade da utilização por usuários nas mais diversas aplicações, como por exemplo realização de exames residenciais para prevenção de doenças e análise da qualidade da água. Foi demonstrado que é possível utilizar a própria tela do dispositivo para gerar a luz que excita o efeito SPR, o que torna o sistema flexível para modificar o comprimento de onda da luz utilizada e obter informações adicionais em relação aos sistemas convencionais. Os resultados obtidos comprovaram que é possível excitar o efeito SPR através de uma luz policromática para o modo de interrogação angular, encontrando a influência da componente do comprimento de onda desejada através de um filtro realizado por *software* no sinal de imagem captado. Além disto foi proposta a utilização da análise morfológica da curva SPR para identificação da substância a ser medida, o que reduz a complexidade computacional e aumenta a sensibilidade do instrumento. Os resultados obtidos com a análise morfológica demonstraram a possibilidade de identificação de características não observadas com o monitoramento da condição de ressonância. Com o monitoramento dos valores da largura  $\Gamma$  e assimetria da curva  $G$ , foi possível observar efeitos da variação do soluto e das condições da superfície. Para minimizar o efeito das variáveis espúrias, foi proposto um modelo matemático que permite analisar a relação sinal ruído do sistema decomposto em cada componente básico. Neste modelo foi considerado as variáveis de controles disponíveis, como corrente de injeção e tempo de integração, além da influência da temperatura. Com base neste modelo foi demonstrado que a variação do comprimento de onda da fonte de luz é mais crítica do que a temperatura. Desta forma, foram propostas duas alternativas para controlar a fonte de luz, modificando o valor da corrente para manter constante o comprimento de onda sem a necessidade do controle da temperatura.

**Palavras-chave:** Biossensor, Ressonância de Plasmons de Superfície, SPR, *smartphone*

## Abstract

This work presents the development of a Surface Plasmon Resonance (SPR) portable system. The proposed solution aims to transform a portable commercial computing device, such as smartphone, tablet or a notebook, in an instrument able to analyze organic and inorganic substances. In this way considerably reduces the cost compared with conventional devices based on SPR, besides providing the use in remote locations and turn possible to applying in several purposes by any users, such as residential exams for disease prevention and water quality analysis. It was demonstrated the possibility to use the device's screen to generate the light source for excite the SPR effect, which turns the system flexible to modify the light wavelength used and acquire additional information compared to conventional systems. The results showed that it is possible to excite SPR effect through a polychromatic light to the angular interrogation mode, finding the desired influence of wavelength component using a software filter in captured image signal. Furthermore it was proposed to use SPR curve morphological analysis for substance identification to be measured, which reduces the computational complexity and increases the instrument sensitivity. The morphological analysis results demonstrated the possibility of identify characteristics didn't observed by monitoring the resonance condition. Monitoring the values of the SPR line broadening  $\Gamma$  and asymmetry  $G$ , it was observed effects of changes in solute and surface conditions. To minimize the spurious variables effect, it was proposed a mathematical model that allow analyze the signal noise relationship of the system that was decomposed in each basic component. In this model was considered the control variables available, as light source's current and camera integration time, further the temperature influence. Based in this model it was demonstrated that light source wavelength drifts is more critical than temperature effect. Thus it was proposed two ways for control the light source, changing the current for maintain constant the wavelength without temperature control.

**Keywords:** Biosensor, Surface Plasmon Resonance, SPR, smartphone

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Objetivos . . . . .	6
1.1.1	Objetivos específicos . . . . .	6
1.2	Principais contribuições . . . . .	7
1.3	Estrutura do documento . . . . .	9
<b>2</b>	<b>Biossensores baseados em Ressonância de Plasmons de Superfície</b>	<b>10</b>
2.1	Ressonância de plasmons de superfície . . . . .	10
2.2	Descrição do biossensor . . . . .	12
2.2.1	Transdutor físico químico . . . . .	12
2.2.2	Modelagem matemática . . . . .	13
2.3	Obtenção da condição de ressonância . . . . .	16
2.3.1	Ajuste polinomial . . . . .	16
2.3.2	Primeiro momento . . . . .	17
2.4	Biossensores SPR Convencionais . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Morfologia da curva SPR</b>	<b>20</b>
3.1	Definição dos parâmetros . . . . .	20
3.1.1	Energia do sinal bruto . . . . .	22
3.1.2	Ruído do ângulo de ressonância . . . . .	22
3.2	Sensibilidade paramétrica . . . . .	23
3.2.1	Sensibilidade com relação à espessura . . . . .	23
3.2.2	Sensibilidade com relação ao índice de refração . . . . .	31
3.2.3	Sensibilidade com relação à temperatura . . . . .	32
3.3	Caracterização da forma da curva SPR . . . . .	38
3.3.1	Determinação da largura da curva . . . . .	38
3.3.2	Contribuição da morfologia e rugosidade da superfície . . . . .	39
3.4	Resultados experimentais . . . . .	42
3.4.1	Adsorção de BSA . . . . .	42

3.4.2	Determinação das características individuais de $\Gamma$ . . . . .	49
3.5	Conclusões . . . . .	52
<b>4</b>	<b>Análise do sinal e ruído em biossensores SPR</b>	<b>54</b>
4.1	Modelo sugerido . . . . .	55
4.1.1	Influência da temperatura . . . . .	56
4.1.2	Influência da fonte de luz . . . . .	56
4.1.3	Influência do conjunto ótico . . . . .	62
4.1.4	Influência do <i>biochip</i> . . . . .	64
4.1.5	Influência do fotodetector . . . . .	83
4.1.6	Influência do conversor AD . . . . .	86
4.2	Compensação do diodo <i>laser</i> . . . . .	87
4.3	Resultados experimentais . . . . .	88
4.3.1	Análise do ruído temporal . . . . .	88
4.3.2	Caracterização do diodo <i>laser</i> . . . . .	99
4.3.3	Compensação do diodo <i>laser</i> . . . . .	103
4.4	Conclusões . . . . .	104
<b>5</b>	<b>Projeto da solução embarcada</b>	<b>106</b>
5.1	Arquitetura . . . . .	106
5.2	Estrutura mecânica . . . . .	108
5.2.1	Suporte de Mesa . . . . .	108
5.2.2	Estrutura tipo Capa . . . . .	113
5.3	Software . . . . .	116
5.3.1	Interface . . . . .	116
5.3.2	Descrição do funcionamento . . . . .	118
5.4	Resultados experimentais . . . . .	122
5.4.1	Determinação do espectro de luz do SIII . . . . .	122
5.4.2	Plataforma experimental . . . . .	123
5.4.3	Resultados obtidos com a câmera frontal . . . . .	124
5.4.4	Análise do sinal de luminância . . . . .	131
5.4.5	Resultados obtidos com a câmera posterior . . . . .	136
5.5	Conclusões . . . . .	138
<b>6</b>	<b>Considerações Finais</b>	<b>139</b>
6.1	Trabalhos Futuros . . . . .	142
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>144</b>

# Lista de Símbolos e Abreviaturas

$\Delta n_{eff}$	Varição do índice de refração efetivo	[RIU]
$\Gamma$	Largura da Curva SPR	[°]
$\Gamma_{ads}$	Componente de $\Gamma$ dependente da camada adsorvida ou da solução	[°]
$\Gamma_{Intr}$	Componente Intrínseca de $\Gamma$ independente de $T$	[°]
$\Gamma_{morf}$	Componente de $\Gamma$ dependente da morfologia do filme de ouro	[°]
$\Gamma_T$	Componente de $\Gamma$ dependente de $T$	[°]
$\lambda$	Comprimento de Onda da Luz	[m]
$\lambda_{res}$	Comprimento de Onda de Ressonância	[m]
$\mu_d$	Número de elétrons presentes na câmera sem incidência de luz	[]
$\mu_e$	Média de elétrons gerados pelos fótons incidentes na câmera	[]
$\mu_i$	Número de elétrons gerados pela corrente escura	[]
$\mu_p$	Média de fótons que incide na câmera	[]
$\mu_y$	Média do sinal de saída da câmera	[]
$\rho_{rms}$	Valor rms da modulação da espessura do filme ou parâmetro da rugosidade da superfície	[m]
$\sigma_{\theta_{res}}$	Desvio Padrão do ruído do pixel do ângulo de ressonância	[]
$\sigma_d$	Desvio padrão do ruído de escuro	[]
$\sigma_e$	Desvio padrão do número de elétrons gerados	[]
$\sigma_q$	Desvio padrão do ruído de quantização	[]
$\sigma_y$	Desvio padrão do ruído de saída	[]
$\theta_{res}$	Ângulo de Ressonância	[°]
$\epsilon_{mi}$	parte imaginária da permissividade elétrica do condutor	[ $F.m^{-1}$ ]
$\epsilon_{mr}$	parte real da permissividade elétrica do condutor	[ $F.m^{-1}$ ]
$E_{sig}$	Energia do sinal bruto de imagem	[unidade do pixel]

$G$	Assimetria da Curva SPR	[-]
$I_a$	Corrente da região ativa do diodo <i>laser</i>	[A]
$I_{lim}$	Corrente de limiar do diodo <i>laser</i>	[A]
$I_L$	Corrente de fuga do diodo <i>laser</i>	[A]
$k_{sp}$	vetor de onda de plasmons de superfície	[rad.m <sup>-1</sup> ]
$k_x$	componente x da luz incidente	[rad.m <sup>-1</sup> ]
$N$	Número de portadores de carga	[]
$n_{ef}$	Índice de Refração Efetivo	[RIU]
$n_i$	índice de refração do meio i	[RIU]
$P$	Potência ótica do diodo <i>laser</i>	[W]
$R$	Coefficiente de Reflexão	[]
$S_i$	Número de fótons gerados no modo longitudinal i	[]
$S_{px}$	Sensibilidade do Parâmetro p em relação a variável x[unidade de p/ unidade de x]	
$s_y$	Desvio padrão do ruído espacial	[]
$T$	Temperatura	[°C]
$t_{exp}$	Tempo de exposição da luz para o sensor de imagem	[s]
ABS	Acrylonitrile Butadiene Styrene	
AD	Analógico Digital	
DSNU	Não Uniformidade do Sinal Escuro	
EAOD	Elemento de Acoplamento Ótico de Difração	
EAS	Etanol diluído em água	
HPC	Hipo-Clorito	
HSA	Albumina de Soro Humano	
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	
$L$	Comprimento da cavidade ressonante do <i>laser</i>	[m]
PRNU	Não Uniformidade da Resposta do Fóton	
PS	plasmons de superfície	
RIU	Unidade de Índice de Refração	
SNR	Relação sinal Ruído	

SPR	Ressonância de Plasmons de Superfície	
SPW	Onda de Plasmons de Superfície	
w	raio do feixe de <i>laser</i>	[m]

# Lista de Tabelas

3.1	Contribuições individuais para a largura da curva . . . . .	41
4.1	Parâmetros Utilizados para simulação do diodo <i>laser</i> com as equações de taxa .	59
4.2	Parâmetros Utilizados no Cálculo do Índice de Refração do Ouro . . . . .	66
4.3	Parâmetros Utilizados no Cálculo do Índice de Refração da Água . . . . .	68
4.4	Parâmetros Utilizados no Cálculo do Índice de Refração do Substrato . . . . .	71

# Lista de Figuras

2.1	Princípio SPR . . . . .	11
2.2	Transdutor Físico Químico. . . . .	12
2.3	Modelo de 4 Camadas para o Biochip . . . . .	14
2.4	Representação da Técnica de Ajuste Polinômial para Obtenção da condição de ressonância . . . . .	17
2.5	Diagrama de Blocos de um Biossensor SPR convencional . . . . .	18
3.1	Características da Morfologia da Curva SPR . . . . .	21
3.2	Variação dos parâmetros da morfologia da curva em relação a espessura da camada sensível . . . . .	25
3.3	Sensibilidade paramétrica em relação a espessura da camada sensível . . . . .	26
3.4	Variação dos parâmetros da morfologia da curva em relação a espessura da camada sensível utilizando-se o ajuste polinomial . . . . .	27
3.5	Variação dos Parâmetros da morfologia da curva em relação a espessura da camada sensível utilizando-se o Primeiro Momento . . . . .	28
3.6	Influência da Utilização do Primeiro Momento no cálculo de $\Gamma$ e $G$ . . . . .	29
3.7	Influência do valor da linha base na determinação de $\Gamma$ . . . . .	30
3.8	Influência do valor da linha base na determinação de $G_R$ . . . . .	30
3.9	Sensibilidade paramétrica em relação ao índice de refração da camada sensível . . . . .	32
3.10	Influência da temperatura no ângulo de ressonância . . . . .	35
3.11	Influência da temperatura no valor da largura da curva $\Gamma$ . . . . .	35
3.12	Influência da temperatura no valor da assimetria da curva $G_R$ . . . . .	36
3.13	Variação relativa dos parâmetros $\theta_{res}$ , $\Gamma$ , $G_R$ em função da temperatura . . . . .	37
3.14	Largura $\Gamma$ em Função da temperatura e determinação da largura intrínseca $\Gamma_{Intr}$ . . . . .	38
3.15	Variação da Largura $\Gamma$ em função da espessura do ouro $d_2$ . . . . .	39
3.16	Módulo da Razão entre Largura e Espessura $S_d$ . . . . .	40
3.17	Imagem do <i>biochip</i> obtida pelo microscópio eletrônico . . . . .	41
3.18	Análise do Ciclo de Adsorção de BSA Utilizando o Primeiro Momento . . . . .	43
3.19	Ciclo de Adsorção de BSA Utilizando o Ajuste Polinomial . . . . .	44
3.20	Análise do Ruído no Ciclo de Adsorção de BSA . . . . .	47

3.21	Ciclo de Adsorção de BSA 2 . . . . .	48
3.22	Sensorgrama de HPC e EAS . . . . .	50
3.23	Análise do Ciclo de Adsorção de BSA . . . . .	51
4.1	Diagrama de Blocos de um Biossensor SPR para Análise do Sinal e Ruído . . .	55
4.2	Potência do <i>Laser</i> em função da corrente de injeção $I$ para as temperaturas de $25^{\circ}C, 40^{\circ}C$ e $60^{\circ}C$ . . . . .	60
4.3	Potência do <i>Laser</i> em função da corrente de injeção $I$ para as temperaturas de $25^{\circ}C, 40^{\circ}C$ e $60^{\circ}C$ . Variação da corrente de limiar $I_{lim}$ em função da temperatura. Variação do comprimento de onda em função da temperatura. . .	61
4.4	Densidade de fluxo radial do feixe de <i>Laser</i> . . . . .	61
4.5	Estrutura do Conjunto Ótico para expansão e colimação do feixe de luz . . . . .	62
4.6	Variação da Largura do Feixe do <i>Laser</i> em Função da Temperatura . . . . .	64
4.7	Partes real $\epsilon_{mr}$ e imaginária $\epsilon_{mi}$ da função dielétrica do ouro em função da temperatura . . . . .	66
4.8	Partes real $\epsilon_{mr}$ e imaginária $\epsilon_{mi}$ da função dielétrica do ouro em função do comprimento de onda . . . . .	67
4.9	Variação do índice de refração da água em função da temperatura . . . . .	69
4.10	Variação do índice de refração da água em função do comprimento de onda . . .	69
4.11	Variação do índice de refração do Substrato em função da Temperatura . . . . .	71
4.12	Variação do índice de refração do Substrato em função do Comprimento de Onda . . .	72
4.13	Estrutura Física do <i>Biochip</i> da Vir . . . . .	73
4.14	Estrutura Física do <i>Biochip</i> da Vir . . . . .	74
4.15	Valor do espaçamento da grade de difração em função da posição de entrada $X_2$ . . .	76
4.16	Caminho ótico do feixe de luz . . . . .	79
4.17	Fluxograma para determinação da posição de saída do feixe de luz . . . . .	80
4.18	Posição de Saída Feixe de Luz para os comprimentos de onda principais de cada componente primária gerada pela tela do SIII, com $\theta_{in} = 0$ . . . . .	81
4.19	Posição de saída feixe de Luz para os comprimentos de onda principais de cada componente primária gerada pela tela do SIII, com $\theta_{in} = 0^{\circ}$ . . . . .	82
4.20	Modelo de Transferência de Fótons para Câmeras . . . . .	83
4.21	Diagrama de blocos para controle do diodo laser . . . . .	87
4.22	Desvio padrão do ruído em função do número de pontos utilizados para a média . . .	90
4.23	Análise no domínio da Frequência do Ruído do sinal . . . . .	90
4.24	Variação do sinal do pixel com a diminuição da Temperatura . . . . .	92
4.25	Variação do sinal do pixel com o aumento da Temperatura . . . . .	93
4.26	Comportamento da Corrente do Laser em função da Temperatura . . . . .	93

4.27	Comportamento no domínio da frequência da variação do sinal do pixel com a variação da temperatura . . . . .	94
4.28	Variação do Sinal de Imagem em função da Corrente . . . . .	95
4.29	Valor médio do sinal do pixel em função do valor da corrente do laser . . . . .	96
4.30	Desvio padrão do sinal do pixel em função do valor da corrente do laser . . . . .	96
4.31	Desvio padrão do sinal do pixel em função do valor médio . . . . .	97
4.32	Variação do sinal do pixel em função do tempo de integração . . . . .	98
4.33	Variação da Intensidade Luminosa do <i>Laser</i> em função da Corrente para as temperaturas de $16^{\circ}C$ $25^{\circ}C$ $40^{\circ}C$ $60^{\circ}C$ . . . . .	99
4.34	Variação da Intensidade Luminosa do <i>Laser</i> em função da Temperatura para uma corrente de $10mA$ . . . . .	100
4.35	Variação do espectro de luz do diodo <i>Laser</i> em função da temperatura para uma corrente de $10mA$ . . . . .	101
4.36	Variação do comprimento de onda principal do <i>Laser</i> em função da Temperatura	101
4.37	Variação espectro de luz do diodo <i>Laser</i> em função da corrente para temperatura de $25^{\circ}C$ . . . . .	102
4.38	Variação do comprimento de onda principal do <i>Laser</i> em função da Corrente .	102
4.39	Variação do Ponto de operação com controle de potência ótica e com controle do comprimento de onda . . . . .	104
5.1	Arquitetura de Hardware do Sistema Proposto . . . . .	106
5.2	Estrutura Mecânica . . . . .	108
5.3	Estrutura Mecânica desenvolvida em ABS para o <i>case</i> de mesa . . . . .	109
5.4	Célula de fluxo frontal, tampa da célula de fluxo, suporte de alumínio e <i>biochip</i> da VIR . . . . .	110
5.5	Visão posterior da estrutura mecânica desenvolvida em ABS para o <i>case</i> de mesa	111
5.6	Estrutura mecânica para o <i>case</i> de mesa nas visões frontal, laterais e posterior .	112
5.7	Visão em perspectiva da montagem final para o <i>case</i> de mesa . . . . .	112
5.8	Visão em perspectiva da estrutura mecânica para a estrutura tipo Capa . . . . .	113
5.9	Visão frontal dos componentes da estrutura mecânica para o modelo tipo Capa .	114
5.10	Visão posterior dos componentes da estrutura mecânica para o modelo tipo Capa	115
5.11	Visão frontal da montagem para o modelo tipo Capa com os suportes móveis abertos . . . . .	115
5.12	Visão frontal da montagem completa da estrutura mecânica para o modelo tipo Capa . . . . .	116
5.13	Interface gráfica do aplicativo desenvolvido . . . . .	117
5.14	Diagrama de Estados do Aplicativo Desenvolvido . . . . .	118
5.15	Diagrama de Fluxo do estado de operação do aplicativo desenvolvido . . . . .	119

5.16	Diagrama de Classes do Aplicativo Desenvolvido para Android . . . . .	121
5.17	Espectro do sinal de luz da tela do SIII . . . . .	123
5.18	Plataforma Experimental utilizada . . . . .	124
5.19	Curvas SPR obtidas para os canais R,G e B . . . . .	126
5.20	Valor máximo de intensidade para o canal G, valor de intensidade mínima da curva SPR para o canal B e R, posição do valor mínimo da curva para o canal R obtidos no ciclo de limpeza . . . . .	127
5.21	Evolução temporal dos valores de energia do sinal obtidas para o canal R,G e B durante o ciclo de limpeza . . . . .	128
5.22	Valor máximo de intensidade para o canal G, valor de intensidade mínima da curva SPR para o canal R, variação do índice de refração ( $\Delta n_{eff}$ ) para o canal R obtidos no ciclo de adsorção de BSA . . . . .	130
5.23	Evolução do valor da Energia do sinal obtidas para o canal R,G e B durante o ciclo de adsorção de BSA . . . . .	131
5.24	Curvas obtidas através do sinal de luminância da imagem adquirida . . . . .	132
5.25	Variação da energia do Sinal de Luminância . . . . .	133
5.26	Variação do valor Mínimo da Curva em cada região para o Sinal de Luminância	134
5.27	Variação da posição do valor Mínimo da Curva em cada região para o Sinal de Luminância . . . . .	135
5.28	Evolução temporal dos valores de energia do sinal obtidas para o canal R,G e B com a câmera posterior . . . . .	137

# Capítulo 1

## Introdução

A espectroscopia de ressonância de plasmons de superfície (SPR) é uma técnica de medição ótica já bastante estabelecida, empregada preferencialmente na detecção de eventos bioquímicos sem a necessidade de marcadores [HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999]. Recentemente, este método de sensoriamento analítico tem sido aplicado para o monitoramento de microfluidos [NEFF et al., 2007], de difusão molecular [LOUREIRO et al., 2010] e de reações catalíticas de superfície [LARSSON et al., 2009].

Sob condições de contorno específicas, a polarização de plasmons de superfície persiste como uma oscilação eletrônica coletiva do sistema de elétrons livres existentes na superfície metálica. Esta oscilação forma uma onda de densidade de carga longitudinal amortecida que é restrita a se propagar e ser óticamente excitada na interface entre o filme metálico e o meio dielétrico adjacente [HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999]. Isto é responsável por uma absorção da energia proveniente da fonte de luz que é pronunciada na ressonância e caracterizada por um decaimento na intensidade de luz refletida [RAETHER, 1988; PILIARIK; HOMOLA, 2009]. A ressonância pode ser obtida pelo ângulo de ressonância  $\theta_{res}$  (no modo de interrogação angular, MIA) ou pelo comprimento de onda de ressonância  $\lambda_{res}$  (no modo de interrogação espectral, MIE).

Os biossensores que utilizam o princípio de ressonância de plasmons de superfície (SPR) têm se destacado pelo alto grau de sensibilidade, medição em tempo real de interações cinéticas biomoleculares, imunidade a interferência eletromagnética e não necessidade de marcadores. Utilizando uma camada biomolecular específica como camada sensível e métodos de preparação apropriados, alvos seletivos (material viral, bactérias, anticorpos e outros bio-marcadores) podem ser identificados com alta precisão. Esses sensores podem ser classificados de acordo com a forma com que é identificada a ressonância de plasmons, podendo ser divididos em: interrogação angular, interrogação por comprimento de onda, pela fase e pela intensidade.

A configuração de Kretschmann representa a abordagem convencional para projetos de instrumentos comerciais. Essa configuração utiliza a reflexão interna total de uma luz com polari-

zação p em um filme de ouro fino [KRETSCHMANN, 1971]. Recentemente, várias alternativas têm sido elaboradas na tentativa de melhorar a qualidade e precisão dos instrumentos. Pode-se destacar alguns exemplos de configurações existentes atualmente: biossensores com dois leds, com interrogação espectral e dois ângulos de incidência [HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999], de acoplamento e dispersão de ressonância de plasmons de superfície (SPRCD) [PILIARIK et al., 2009], que possibilitam a informação espectral e angular simultaneamente [ALLEYNE et al., 2008].

Pode-se encontrar na literatura várias tentativas de melhorar os sensores baseados em SPR através da união com outras tecnologias. Dentre elas pode-se citar a união de SPR com SAW (Surface Acoustic Wave) [FRIEDT et al., 2003; SHEIKH; BLASZYKOWSKI; THOMPSON, 2008], com elipsometria [HSU; LEE; LEE, 2009; NABOK et al., 2005], com microbalança de quartzo (QCM-D) [REIMHULT et al., 2004], com ressonância de cavidade (CR) [ZHAO et al., 2008] e a união de SPR com SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) [MEYER; RU; ETCHEGOIN, 2011; Yih et al., 2004; LIU et al., 2010].

Os biossensores que utilizam interrogação angular usam uma fonte de luz com banda de comprimento de onda estreita, gerada por um diodo *laser* ou por um LED, que incide em ângulos diferentes sob um filme metálico para excitar o efeito SPR. A luz é refletida e captada pelos fotodetectores que a transforma em um sinal elétrico. O sinal de imagem captado pelo fotodetector é adquirido por uma unidade de processamento que utiliza geralmente a informação da posição do mínimo da curva SPR para calcular o índice de refração ou espessura da camada sensível. Através dos valores do índice de refração e/ou da espessura da camada sensível pode-se calcular concentração de substâncias e características cinéticas das reações químicas.

A posição de ressonância e a forma da curva SPR associada, variam com mudanças nas propriedades óticas da interface do *biochip*. Estas mudanças são relacionadas a variações no índice de refração do analito  $n_3$  ou da presença de uma camada fixada sobre a superfície de ouro [NEFF et al., 2006].

A quantidade obtida pela mudança do ângulo de ressonância  $\Delta\theta_{res}$  ou do comprimento de onda de ressonância  $\Delta\lambda_{res}$  é geralmente a variação temporal do índice de refração efetivo  $\Delta n_{eff}$ . Através deste valor podem ser estimadas características cinéticas da fixação, variações na espessura de substâncias bioquímicas imobilizadas ou outros filmes [C.THISTRUP et al., 2004].

A condição de ressonância depende do índice de refração e da espessura da camada sensível. Geralmente admite-se um dos parâmetros conhecidos e calcula-se o outro. Um problema encontrado para este tipo de sensor é a estimação simultânea do índice de refração  $n_3$  e da espessura  $d_3$  da camada sensível. Existem algumas alternativas que possibilitam a estimação simultânea de  $n_3$  e  $d_3$ , entre elas a utilização de dois LEDs com comprimentos de onda diferentes, um com luz vermelha e outro com luz azul. Desta forma é possível gerar duas curvas SPR distintas para a mesma substância e através destes dois sinais é possível estimar os valores e  $n_3$

e  $d_3$ .

Como o cálculo do índice de refração ou espessura da camada dependem diretamente da condição de ressonância, o método utilizado para determinação desta condição influencia diretamente na precisão do biossensor SPR. Avanços têm sido obtidos na investigação e elaboração de novas técnicas de processamento e análise do sinal SPR. Como alternativa às técnicas tradicionais surgiram novos métodos que tentam minimizar os efeitos do ruído, temperatura, variações na intensidade de corrente [THIRSTRUP; ZONG, 2005]. Pode-se encontrar formas alternativas para obtenção da condição de ressonância como o algoritmo de similaridade local [OWEGA; POITRAS, 2007], do ajuste da curva SPR assimétrica [KURIHARA; NAKAMURA; SUZUKI, 2002] e a parametrização do modelo e projeção linear (MPLP) [TOBISKA; HOMOLA, 2005].

Outro fator que determina a condição de ressonância são as características do metal utilizado. As condições da superfície de filmes de ouro, ainda não utilizados e expostos a um ambiente de solução aquosa, são pouco definidas. Essas condições são instáveis e fortemente dependente do comportamento da superfície do metal, podendo estar no estado hidrofóbico ou hidrofílico.

No estado hidrofóbico as moléculas de água são repelidas, o que indica um ângulo de contato elevado, distribuindo a água em pequenas gotículas. Quando a superfície está sob condições hidrofílicas, as moléculas de água são atraídas formando uma fina camada de água imobilizada. Isto é indicado por um pequeno ângulo de contato.

O tratamento da superfície, através de soluções com elevado valor de pH e presença de íons  $OH^-$ , geralmente cria uma superfície hidrofílica. Este estado é obtido após vários ciclos consecutivos de passagem destas soluções seguidas de água. Em contra partida, quando os filmes são expostos ao ar presente no laboratório por período de tempo curtos ou por passagem de bolhas de ar no fluxo, estes filmes tendem a voltar ao estado hidrofóbico. Isto pode ser detectado por uma simples inspeção visual da água fixada ao filme após a retirada do chip SPR do instrumento.

Várias vertentes foram exploradas na tentativa de melhorar o desempenho e os limites de sensibilidade de instrumentos baseados em SPR [PILIARIK; HOMOLA, 2009]. Neste sentido, a análise da forma da curva SPR oferece uma alternativa mais simples porém ainda pouco explorada [SILIN; BALCHYTIS; YAKOVLEV, 1993].

A largura da curva  $\Gamma$  depende da espessura e da permissividade complexa do filme de metal que compõe o biossensor [KRETSCHMANN, 1971]. O valor de  $\Gamma$  também pode ser utilizado, em conjunto com a variação do ângulo de ressonância, para estimar o valor do índice de refração e da espessura da camada sensível [KOUTSIUOBRA et al., 2007].

Trabalhos teóricos e experimentais, sobre os efeitos da forma da curva SPR em nanopartículas e filmes metálicos finos, foram publicados [PERNER et al., 1998; YUAN; GAO, 2008; MUNESHIKA et al., 2007; QIU et al., 2008] considerando tanto o domínio do com-

primento de onda quanto o da energia. A influência da temperatura relacionada a interação de fóton-SP e a não homogeneidade da superfície devido à rugosidade e/ou presença de impurezas, tem sido atribuídos como mecanismos de espalhamento de plasmons de superfície [HOFFMANN; LENKEFI; SZENTIRMAY, 1998].

Apesar de oferecer imunidade a interferência eletromagnética os biossensores SPR apresentam diversas fontes de ruído que afetam a precisão da medição. As principais fontes de ruído são: o efeito da temperatura, variações na fonte de luz e ruídos causados pelo sensor de imagem. O tempo de integração, temperatura e o nível de corrente utilizados influenciam fortemente na relação sinal ruído do equipamento. A escolha destes valores torna-se então um difícil problema de otimização que deve ser solucionado para o melhor desempenho do biossensor.

A carência de modelos que incluam as influências dos ruídos, dificulta um estudo mais aprimorado que permita melhorar a precisão do equipamento. O estudo do comportamento de biossensores SPR requer um modelo preciso do transdutor utilizado. A otimização dos parâmetros do sistema e a redução do ruído necessita de métodos para prever a resposta SPR com relação ao conhecimento das propriedades dos materiais e estruturas das camadas [HOA; KIRK; TABRIZIAN, 2007]. O modelo matemático é extremamente importante para determinar a melhor técnica para o condicionamento do sinal, assim como o desempenho do sistema sob diferentes configurações.

Existem diferentes modelos para os biossensores de acordo com cada configuração e aplicação. Aproximações para modelos de 3 camadas podem ser feitas simplesmente igualando-se o vetor de onda da luz incidente com o vetor de onda da onda de plasmons de superfície [C.THISTRUP et al., 2004]. Os modelos analíticos mais utilizados são baseados nas equações de Fresnel, que podem estar na forma convencional [RAETHER, 1988] ou matricial [NEFF et al., 2006], para avaliar o desempenho do sistema [HOA; KIRK; TABRIZIAN, 2007]. Existe também o modelo que determina a equação para a curva SPR assimétrica [KURIHARA; NAKAMURA; SUZUKI, 2002]. Entretanto, estes modelos não incluem a influência do ruído sobre o sistema. Pode-se encontrar modelos que acrescentam a formulação matemática para o foto detector e para a grade de difração [ZUREK; MORENO; GARCIA-RUBIO, 2008], porém, não consideram o efeito da temperatura e aproximam o ruído existente por um ruído branco.

A disponibilidade de baixo custo, ausência de marcadores e biossensores portáteis é benéfico para implementação de programas de monitoração ambiental e de saúde pública. Isto é especialmente verdade no caso de países tropicais em desenvolvimento, que sofrem de doenças endêmicas frequentemente não controladas.

Apesar dos avanços supracitados obtidos, biossensores SPR tradicionais são equipamentos que apresentam tamanho e custo relativamente elevados. Isto é devido a rigorosas especificações operacionais que exigem um aparato relativamente complexo para controlar a temperatura, em conjunto com a excitação ótica e detecção das condições de ressonância SPR que pertencem

a interações biomoleculares.

A tecnologia de sistemas embarcados em alta escala de integração é atualmente rotineiramente empregada em *smartphones* de baixo custo, que oferecem alto poder computacional combinado com sensores de imagens CMOS de alta resolução e brilho em um tamanho reduzido. Além disto, uma fonte de luz plana de alta eficiência pode ser proporcionada por uma matriz ativa de diodos emissores de luz orgânicos (AMOLED) que compõe a tela do dispositivo. Estes fatores tornam o uso de *smartphones* e plataformas *System on Chip (SOC)* atrativas para o desenvolvimento de equipamentos de diagnósticos baseado em SPR.

Já é possível encontrar alguns biossensores portáteis que possibilitam a medição e análise de substâncias em campo e em locais remotos [CHINOWSKY et al., 2007; HU et al., 2009; NAIMUSHIN et al., 2003a]. Em paralelo com o desenvolvimento deste trabalho surgiram alternativas que buscam integrar equipamentos biomédicos a celulares. Encontra-se aplicações que analisam o sinal fluorescente de uma amostra [COSKUN et al., 2013; WEI et al., 2013] usando como fonte de luz um *laser* externo e um conjunto ótico, mudança no comprimento de onda de um biossensor com cristal fotônico [GALLEGOS et al., 2013] através da incidência de uma luz externa e conjunto ótico. Em [NAVRUZ et al., 2013] é utilizado um led externo, um arranjo de fibra ótica, um difusor de luz e um conjunto de lentes para transformar um *smartphone* em um microscópio capaz de analisar células sanguíneas. Em [LIU et al., 2015] é proposto um sensor SPR utilizando fibra ótica através de uma estrutura acoplada a parte posterior do *smartphone*, composta pela fibra ótica, conjunto de lentes, célula de fluxo e filtros óticos. Esta estrutura usa como fonte de luz o led do *flash* e a câmera posterior para captar a imagem monitorando a variação de intensidade de luz através dos elementos sensores. Em [DUTTA; CHOUDHURY; NATH, 2014] é utilizada uma luz externa de banda larga, um conjunto de lentes e uma grade de difração e um *smartphone* para analisar diferentes substâncias através da mudança do espectro da luz captada. Um sensor fabricado em fibra ótica que recebe a luz proveniente do led do *flash* e direciona a luz até uma grade de difração, onde a luz refratada pela grade de difração é captada pela câmera posterior é proposto em [BREMER; ROTH, 2015]. Em [VASHIST et al., 2015] é proposto um leitor colorimétrico com uma placa de microtitulação usando um arranjo de *smartphone* e *tablet*. Em [ZHANG et al., 2015] é apresentado um biossensor que utiliza o princípio de medição de impedância, realizada através de um microcontrolador com a placa Arduino, que transmite o sinal através de *Bluetooth* para o *smartphone* onde o sinal é processado e visualizado. Em [PREECHABURANA et al., 2012] é apresentado um biossensor baseado em SPR que usa a própria tela do dispositivo como fonte de luz.

Os sensores mencionados ainda necessitam de um conjunto ótico para alinhamento e foco do feixe de luz, componentes externos como a própria fonte de luz, partes mecânicas e grades de difração. Os biossensores SPR com interrogação angular com dispositivos portáteis encontrados não identificaram a modificação do ângulo de ressonância, fazendo a medição através do sinal

de intensidade da luz refletida para um ângulo fixo.

Neste trabalho é apresentado um biossensor SPR com um *smartphone* utilizando apenas o *biochip* como elemento externo. É utilizado como fonte de luz tanto a tela do dispositivo como o led do *flash*, sendo demonstrado que é possível excitar o efeito SPR com uma luz de banda larga e decompor o sinal através de *software*. A modelagem matemática, técnicas de processamento e análise do sinal são propostas para permitir a utilização de dispositivos computacionais portáteis como biossensores SPR.

## 1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é o projeto de um instrumento portátil capaz de compor um biossensor baseado em ressonância de plasmons de superfície através de sistemas embarcados.

### 1.1.1 Objetivos específicos

Biossensores convencionais são projetados para operar em ambientes que possuem características constantes ou com pequena variação, como temperatura controlada, alimentação através da rede elétrica, espaço para colocação do instrumento, computadores pessoais ou estações de trabalho para coleta e análise dos dados. Logo, os biossensores convencionais não possuem limitação quanto a consumo de energia, tamanho, capacidade de processamento e variação de temperatura. Normalmente estes biossensores possuem controle de temperatura interna para a fonte de luz, podendo até mesmo existir o controle da temperatura de todo o biossensor.

Um instrumento portátil é alimentado por uma bateria o que requer um consumo adequado para aumentar o tempo de utilização sem necessidade de recarga. Isto limita a possibilidade de realizar um controle de temperatura pois necessita de consumo de energia elevado.

Os instrumentos portáteis apresentam limitações de *hardware* e *software* quando comparados aos instrumentos tradicionais de bancada. Dentre as limitações existentes pode-se citar a necessidade de tamanho e peso reduzidos para facilitar a portabilidade, um consumo de energia minimizado para aumentar o tempo de utilização, capacidade de processamento inferior aos *desktops* ou estações de trabalho. Logo, para ultrapassar as limitações existentes e viabilizar a utilização de dispositivos computacionais portáteis como biossensores, é necessário o desenvolvimento de algumas etapas com o estabelecimento dos seguintes objetivos específicos:

- Estudo e desenvolvimento de técnicas de análise de sinal:
  - A complexidade computacional dos algoritmos utilizados para análise e processamento de dados, influencia bastante no rendimento e operacionalidade do *software* e sistema computacional. Isto se torna mais evidente em sistemas portáteis, que possuem *hardware* mais limitado, além de aumentar o consumo da bateria. Logo, para alcançar o

desempenho satisfatório, o estudo e desenvolvimento de técnicas alternativas de análise do sinal captado, que permitam a expansão das funcionalidades de um biossensor SPR se faz necessário.

- Análise do ruído e variáveis espúrias:
  - Outro fator que afeta fortemente a qualidade de qualquer sensor é a influência de variáveis espúrias. Para biossensores SPR a temperatura é um parâmetro que altera o comportamento de praticamente todo o sensor. Um instrumento portátil é alimentado por uma bateria o que requer um consumo adequado para aumentar o tempo de utilização sem necessidade de recarga. O controle de temperatura se torna inviável para dispositivos portáteis de pequeno porte, pois, o consumo de energia necessário tornaria o tempo de utilização bastante reduzido. Além da temperatura existem outras variáveis como corrente utilizada para a fonte de luz e tempo de integração do sensor de imagem, que influenciam diretamente na relação sinal ruído do biossensor. Dessa forma, o estudo e desenvolvimento de um modelo matemático que seja capaz de incluir o efeito destas variáveis na variável de saída, possibilita uma otimização e possibilidade de compensação para o sistema.
- Desenvolvimento do *software*:
  - O desenvolvimento do *software* utilizado busca tornar o sistema capaz de ser empregado em qualquer tipo de sistema computacional portátil como *smartphone*, *tablets* e etc.
- Desenvolvimento da estrutura mecânica:
  - Para permitir que o sistema seja adequado ao deslocamento e utilização em locais variados, objetiva-se desenvolver a estrutura mecânica mais apropriada para torná-lo flexível e com peso e tamanho reduzidos.

## 1.2 Principais contribuições

A solução proposta permite a redução no custo e tamanho do equipamento em relação aos biossensores tradicionais, tornando possível a utilização em locais remotos com análise em tempo real. Além disto, permite a um usuário comum ter acesso a um poderoso sistema de análise portátil, que pode ser utilizado na prevenção de doenças com a realização de exames ou em aplicações como análise da qualidade de água e combustível. Dentre as contribuições inerentes ao projeto pode-se destacar:

- O desenvolvimento de um biossensor utilizando dispositivos portáteis como *smartphones*, *tablets*, *notebooks*, sem a necessidade de qualquer dispositivo ótico para alinhamento e

foco do feixe, ou fonte de luz externa. A fonte de luz do biossensor é gerada pela tela do dispositivo portátil e a imagem é captada pela câmera presente neste dispositivo. O equipamento é capaz de controlar o comprimento de onda da fonte de luz. Além disto, é demonstrado a possibilidade de utilizar uma imagem branca como fonte de luz para excitar o efeito SPR em biossensores com interrogação angular, encontrando a influência da componente desejada através da passagem de um filtro realizado por *software* no sinal captado pela câmera [SOUZA FILHO; LIMA; NEFF, 2014].

- A expansão das funcionalidades de biossensores baseados em Ressonância de Plasmons de Superfície, através da inclusão de novas técnicas para a análise do sinal SPR obtido. O monitoramento de características da forma da curva é proposto como uma alternativa para a análise do sinal SPR. A largura da curva é utilizada para medir a evolução temporal das variações existentes na camada sensível. São apresentadas novas alternativas para medição como a monitoração do valor da assimetria e a variação do ruído no ângulo de ressonância. A energia do sinal bruto de imagem é outra forma analisada para evolução temporal [SOUZA FILHO; LIMA; NEFF, 2010].
- Os novos parâmetros foram utilizados para auxiliar na discriminação de ligações reversíveis e irreversíveis de proteínas na formação da monocamada do biossensor. Os parâmetros da largura da curva  $\Gamma$  e a simetria/assimetria  $G$  associada são analisados simultaneamente, com objetivo de avaliar a admissão e exposição de soluções de analito selecionadas. Quatro contribuições foram identificadas para a largura e assimetria da curva SPR sendo classificadas em: intrínseca e independente da temperatura, dependente da temperatura, uma contribuição que depende da morfologia do filme metálico através da espessura e rugosidade e uma contribuição relacionada a adsorção [SOUZA FILHO et al., 2010].
- Foi realizado um estudo para determinar a sensibilidade da utilização de cada parâmetro proposto, assim como a sua suscetibilidade a presença de variáveis indesejáveis [SOUZA FILHO; LIMA; NEFF, 2010].
- Elaboração de um modelo matemático para determinar a relação sinal ruído do biossensor, analisando a influência das principais fontes de ruído e variáveis de controle em cada componente do biossensor. Esta análise visa otimizar os pontos de operação e escolher ou desenvolver as melhores técnicas de condicionamento do sinal a serem empregadas. O modelo proposto apresentado analisa detalhadamente cada componente de um biossensor SPR, levando em consideração a influência da corrente de injeção da fonte de luz, influência da temperatura e tempo de integração do fotosensor [SOUZA FILHO; LIMA; NEFF, 2017].

- Foi investigada a alteração do comprimento de onda da fonte de luz e seu efeito em cada componente do biossensor. Foi demonstrado que a variação do comprimento de onda provoca uma alteração mais pronunciada do que o da temperatura, modificando a abertura do feixe de luz, os índices de refração dos materiais que compõem o biossensor e a sensibilidade do fotodetector. Desta forma, foi comprovado que é mais importante controlar a componente fundamental do espectro de luz do *laser* do que sua intensidade. Para isto é proposta a modificação no valor da corrente para compensar o efeito causado pela mudança da temperatura do laser no valor do comprimento de onda fundamental do feixe de luz, o que pode ser realizado desde que o diodo laser ou outra fonte de luz seja caracterizada previamente [SOUZA FILHO; LIMA; NEFF, 2017].

### 1.3 Estrutura do documento

A estrutura deste documento para o exame de qualificação foi dividida em 6 capítulos:

- Capítulo 1 : No primeiro capítulo foi apresentada uma introdução que delimita o tema sobre o qual se enquadra o desenvolvimento deste projeto, além de especificar os objetivos e organização do documento.
- Capítulo 2: No segundo capítulo são apresentados conceitos teóricos sobre os biossensores baseados em Ressonância de Plasmons de Superfície.
- Capítulo 3 : O terceiro capítulo contém a descrição da abordagem proposta para análise do sinal utilizando a morfologia da curva SPR, assim como o estudo da sensibilidade dos parâmetros propostos.
- Capítulo 4: No quarto capítulo é apresentado o estudo realizado sobre as principais fontes de ruído e variáveis que influencia no sinal. O sistema é analisado detalhadamente em cada componente, de forma a criar um modelo que apresente a relação sinal ruído incluindo as variáveis que podem ser manipuladas para otimizar o sistema.
- Capítulo 5: O quinto capítulo descreve a solução proposta utilizando sistemas computacionais portáteis, desde a concepção da estrutura mecânica, elaboração de *software*, *hardware* e obtenção dos resultados experimentais para análise de substância orgânicas e inorgânicas.
- Capítulo 6: As considerações finais são abordadas no sexto e último capítulo.

## Capítulo 2

# Biossensores baseados em Ressonância de Plasmons de Superfície

De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) um biossensor é definido como dispositivo que utiliza reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos normalmente por meio de sinais elétricos, térmicos ou ópticos [IUPAC, 1997].

Os biossensores são capazes de detectar substâncias orgânicas e inorgânicas com alto grau de seletividade, podendo ser utilizados em diversas aplicações como em análises laboratoriais, aplicações médicas, agrícolas e monitoramento de ambiente. Pode-se citar o uso de biossensores na detecção de influenza, tuberculose e colesterol [HAMMOND et al., 2014]

Este capítulo aborda conceitos que serão utilizados no desenvolvimento deste trabalho como o princípio de ressonância de plasmons de superfície (SPR), modelagem matemática e composição de biossensores baseados em SPR.

### 2.1 Ressonância de plasmons de superfície

O fenômeno de plasmons de superfície (PS) é uma oscilação de densidade de cargas longitudinal que se propaga ao longo da interface entre um metal e um dielétrico [CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003]. Uma configuração básica de um biossensor baseado em SPR está ilustrada na Figura 2.1. Quando um feixe de luz se propaga em um meio de índice de refração  $n_2$  e encontra um meio com índice de refração menor  $n_3$ , a luz é totalmente refletida se o ângulo de incidência  $\theta$  for superior ao ângulo crítico [RAETHER, 1988].

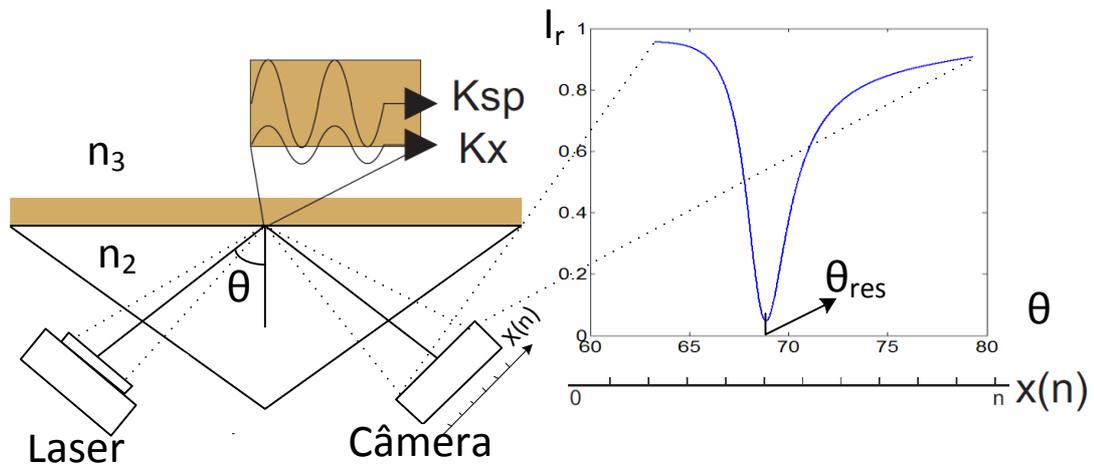


Figura 2.1: Princípio SPR

No ponto de incidência do feixe de luz parte da radiação penetra no meio 3, criando um campo elétrico evanescente com amplitude que cai exponencialmente com a distância de penetração. Se no meio de menor índice de refração for depositado um filme metálico de espessura adequada, o campo elétrico pode excitar os elétrons livres do metal criando uma onda de plasmons de superfície (SPW) que se propaga ao longo da interface entre o metal e o dielétrico. A criação da SPW provoca uma transferência de energia do feixe de luz para a onda, que pode ser verificada como um decaimento na intensidade de luz refletida pelo filme. A SPW pode ser excitada variando-se comprimento de onda (interrogação do comprimento de onda) ou o ângulo de incidência (interrogação angular) do feixe de luz. Na interrogação angular, o ângulo que torna a componente horizontal do vetor de onda do feixe de luz  $k_x$  igual a parte real do vetor de onda da SPW  $Re(k_{sp})$  é denominado de ângulo de ressonância  $\theta_{res}$ , pois mantém a oscilação de cargas criando o fenômeno SPR. O valor deste ângulo depende do índice de refração e da espessura da camada superior ao filme metálico, sendo determinado pelo ponto mínimo da curva SPR ilustrada na Figura 2.1.

Alterações nas características do meio 3 provocam uma mudança no valor de  $\theta_{res}$ . Com uma câmera é possível detectar a intensidade da luz refletida  $I_r$  para cada ângulo de incidência  $\theta_i$ , correspondente ao sinal de cada *pixel*  $x_n$ , formando a curva SPR. A partir deste sinal de imagem determina-se o valor de  $\theta_{res}$  e calcula-se  $n_3$ .

## 2.2 Descrição do biossensor

Os biossensores são constituídos basicamente por um biocatalizador, um transdutor físico químico, uma unidade de aquisição, processamento e controle (UAPC) e uma interface com o usuário.

O biocatalizador é a camada bioquímica preparada para aderir apenas a substância desejada, o que torna o biossensor um elemento bastante seletivo. O biocatalizador possui um elemento biológico que fixa apenas a substância específica. Os elementos biológicos que podem ser utilizados são enzimas, anticorpos, organelas, bactérias, células vivas, substâncias ligantes e outros. Quando a amostra a ser analisada entra em contato com o biocatalizador, apenas a substância desejada é fixada. Dependendo da preparação da camada bioquímica pode-se analisar diferentes substâncias.

O transdutor físico químico transforma a informação da substância em um sinal elétrico. A UAPC condiciona e adquire o sinal proveniente do transdutor, realiza o processamento, armazena a informação e eventualmente controla os dispositivos necessários ao transdutor. A interface com usuário permite que o operador visualize a informação adquirida e possa configurar o biossensor.

Neste trabalho não será desenvolvido o biocatalizador, de forma que o desenvolvimento estará focado para o transdutor, UAPC e interface com o usuário. O princípio do biossensor utilizado será o de ressonância de plasmons de superfície explicado na seção 2.1.

### 2.2.1 Transdutor físico químico

O transdutor físico químico utilizado como base para desenvolvimento deste projeto é composto por um diodo *laser*, um conjunto de lentes colimadoras, um *biochip* e uma câmera CMOS unidimensional de 1024 *pixels* (Hamamatsu S296) [SOUZA FILHO; LIMA; NEFF, 2008; SOUZA FILHO, 2006]. A configuração do transdutor é ilustrada na Figura 2.2.

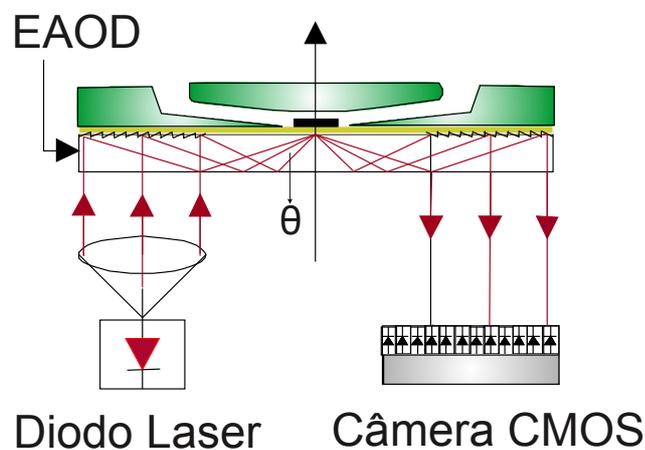


Figura 2.2: Transdutor Físico Químico.

O *biochip* é formado por uma camada de ouro moldada sobre um Elemento de Acoplamento Ótico de Difração (EAOD). Isto permite o acoplamento ótico entre a luz de entrada e saída mantendo uma sensibilidade alta, baixo ruído e boa performance. A utilização do EAOD facilita a troca da superfície sensora, não apresenta desgastes mecânicos e evita a necessidade de manutenção ótica e serviço técnico [C.THISTRUP et al., 2004].

O diodo *laser* gera o feixe de luz que passa pelas lentes colimadoras, onde o foco é ajustado para incidir perpendicularmente no EAOD de entrada. As ranhuras existentes refletem a luz que se propaga pelo EAOD até incidir em ângulos diferentes no ponto central. O ângulo de incidência depende da distância do ponto central até o feixe de luz gerado pelo diodo *laser*. No ponto central está localizada a camada sensível, sobre a qual é formado o biocatalizador. A luz refletida pelo ponto central é direcionada até a câmera CMOS onde é convertida para um sinal elétrico.

### 2.2.2 Modelagem matemática

Considerando uma interface de dois meios semi infinitos formados por um metal com função dielétrica  $\epsilon_m$  e um dielétrico com função dielétrica  $\epsilon_d$ , o vetor de onda de plasmons de superfície  $k_{sp}$  é dado pela equação 2.1 [RAETHER, 1988].

$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (2.1)$$

O vetor de onda da componente da luz incidente  $k_x$  (componente paralela ao plano de interface metal dielétrico) pode ser encontrado pela equação 2.2 [RAETHER, 1988].

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin(\theta) \quad (2.2)$$

onde  $n_1$  é o índice de refração do substrato e  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz incidente. Como mencionado na seção 2.1 a condição de ressonância ocorre quando  $k_x$  é igual a parte real de  $k_{sp}$ . As funções dielétricas complexas do metal e da camada sensível são expressas pelas equações 2.3 e 2.4.

$$\epsilon_m = \epsilon_{mr} + j\epsilon_{mi} \quad (2.3)$$

$$\epsilon_d = \epsilon_{dr} + j\epsilon_{di} \quad (2.4)$$

onde  $\epsilon_{mr}$  e  $\epsilon_{mi}$  são respectivamente a parte real e imaginária da função dielétrica do metal e  $\epsilon_{dr}$  e  $\epsilon_{di}$  as partes real e imaginária da função complexa do meio 3. Considerando que o meio 3 é formado por um dielétrico com parte imaginária da função dielétrica nula  $\epsilon_{di} = 0$  e que  $|\epsilon_{mr}| \gg \epsilon_{mi}$ , igualando-se a equação 2.2 a parte real de 2.1 encontra-se o valor para o índice de

refração efetivo  $n_{eff}$  e ângulo de ressonância  $\theta_{res}$  dados, respectivamente, pelas equação 2.5 e 2.6 [C.THISTRUP et al., 2004; NEFF et al., 2006].

$$n_{eff} = \sqrt{\frac{\epsilon_{mr}(n_1 \text{sen}(\theta_{res}))^2}{\epsilon_{mr} - (n_1 \text{sen}(\theta_{res}))^2}} \quad (2.5)$$

$$\theta_{res} = \arcsin\left(\frac{n_3}{n_1} \sqrt{\frac{\epsilon_{mr}}{\epsilon_{mr} + n_3^2}}\right) \quad (2.6)$$

As equações 2.5, 2.6 foram obtidas considerando-se que o sensor contém apenas três camadas, onde a terceira camada é a região sensível, logo  $n_{eff} = n_3$ . Entretanto, em um biossensor SPR a substância a ser analisada normalmente é diluída em um solvente para permitir que seja deslocada até a região sensora do *biochip*. Logo, além da camada sensível do biocatalizador existe pelo menos mais uma camada com solução que contém a substância a ser analisada.

### Modelo de N camadas

O *biochip* pode ser representado por uma pilha de camadas de materiais diferentes, com índices de refração  $n_i$  e espessura  $d_i$ . A Figura 2.3 ilustra a disposição física de camadas do *biochip* utilizado.

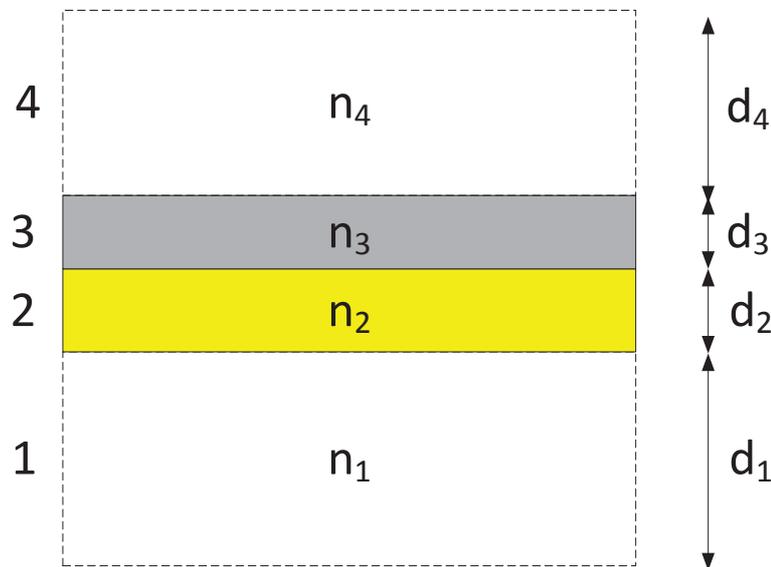


Figura 2.3: Modelo de 4 Camadas para o Biochip

O *biochip* é composto por 4 camadas sendo a primeira um substrato polimérico, a segunda uma camada de ouro, a terceira é a camada sensível que depende da substância a ser analisada e a quarta é o solvente (normalmente água). O coeficiente de reflexão do *biochip* é obtido através

das equações de Fresnel que estão representadas na forma matricial pelas equações 2.7 a 2.10 [NEFF et al., 2006].

$$R = \frac{(m_{11} + m_{12}q_m)q_1 - (m_{21} + m_{22})q_m}{(m_{11} + m_{12}q_m)q_1 + (m_{21} + m_{22})q_m}, \quad (2.7)$$

onde,

$$M_{tot} = \prod_{j=2}^{m-1} M_j = \begin{bmatrix} m_{11} & m_{12} \\ m_{21} & m_{22} \end{bmatrix}, \quad (2.8)$$

$$M_j = \begin{bmatrix} \cos(\beta_j) & -i \sin(\beta_j)/q_j \\ -iq_j \sin(\beta_j) & \cos(\beta_j) \end{bmatrix}, \quad (2.9)$$

$$\beta_j = \frac{2\pi d_j \sqrt{n_j^2 - [n_1 \sin(\theta_1)]^2}}{\lambda}, q_j = \frac{\sqrt{n_j^2 - [n_1 \sin(\theta_1)]^2}}{n_j^2}. \quad (2.10)$$

A intensidade de luz refletida pelo *biochip*  $I_r$  pode ser obtida pelo produto da intensidade de luz incidente  $I_{inc}$  pelo coeficiente de reflexão  $R$ , dado pela equação 2.7, através da equação 2.11.

$$I_r(\theta) = I_{inc}(\theta) \cdot R \quad (2.11)$$

Como dificilmente a fonte de luz apresenta distribuição espacial uniforme em relação à intensidade, é necessário realizar uma normalização em relação a um sinal de referência. Logo, para obter a curva SPR realiza-se a divisão da luz refletida para a substância a ser analisada  $I_{rs}$  pela luz refletida do sinal de referência  $I_{rref}$ , obtendo-se então o sinal de intensidade normalizado  $I_{rn}$  de acordo com a equação 2.12.

$$I_{rn}(\theta) = \frac{I_{rs}(\theta)}{I_{rref}(\theta)} \quad (2.12)$$

A relação entre a posição  $x(n)$  do *pixel*  $n$  da câmera e o ângulo de incidência  $\theta_i$  ilustrada na Figura 2.1 depende da geometria e dimensões do transdutor. Conhecendo-se a distribuição da luz incidente, é possível calcular a curva SPR utilizando-se as equações 2.7 a 2.12.

## 2.3 Obtenção da condição de ressonância

O sinal de imagem captado pelo biossensor é susceptível à influência de ruído, o que torna a curva SPR um sinal ruidoso. Consequentemente, em aplicações reais, a busca direta pelo ponto mínimo da curva é ineficiente para obtenção do ângulo de ressonância.

Existem várias técnicas de obtenção da condição de ressonância através da curva SPR que tentam minimizar a influência do ruído e de variáveis espúrias existentes. Dentre elas pode-se citar: Ajuste Polinomial, Primeiro Momento ou Centróide, primeira derivada [OWEGA; POITRAS, 2007], Linha Base Dinâmica [THIRSTRUP; ZONG, 2005], centróide rápido [GENG; ZHANG; YU, 2012], regressão paramétrica ponderada localmente (LWPR) [JOHNSTON; YEE; BOOKSH, 1997], método de análise ótimo [CHINOWSKY; JUNG; YEE, 1999], função de curva assimétrica [KURIHARA; NAKAMURA; SUZUKI, 2002], parametrização do modelo e projeção linear (MPLP) [TOBISKA; HOMOLA, 2005], algoritmo de similaridade local [OWEGA; POITRAS, 2007], centróide quadrático [HU; ZHAO, 2009], aproximação por uma senóide [PEREIRA et al., 2014].

Nesta seção serão abordadas as técnicas do Ajuste Polinomial e Primeiro Momento, que serão utilizadas para realização de estudos de sensibilidade e análise dos experimentos durante este projeto. Estas técnicas foram escolhidas por se tratar de técnicas clássicas já bastante consolidadas.

### 2.3.1 Ajuste polinomial

O ajuste polinomial utiliza uma aproximação da região próxima ao ângulo de ressonância por um polinômio de grau  $n$ . Através do polinômio aproximado é possível encontrar o ponto mínimo correspondente ao ângulo de ressonância expresso pela equação (2.13).

$$\theta_{res} = \min(a_0 + a_1\theta + a_2\theta^2 + a_3\theta^3 + \dots a_n\theta^n) \quad (2.13)$$

A escolha da região pode ser feita através de um referencial horizontal ou vertical. Quando se utiliza um referencial horizontal, realiza-se inicialmente uma busca direta pela posição do menor valor da curva. A região é então determinada por  $k_1$  pontos a esquerda e  $k_2$  pontos a direita deste valor. A utilização de um referencial vertical é feita determinando-se um valor limite de intensidade  $I$ , a partir do qual são escolhidos os pontos abaixo deste limite para determinar o polinômio. São considerados apenas os pontos pertencentes a região incluída entre os cruzamentos das curvas SPR e a reta do limite  $I$  traçados. Na Figura 2.4 estão ilustradas as regiões de escolha para a técnica de Ajuste Polinomial.

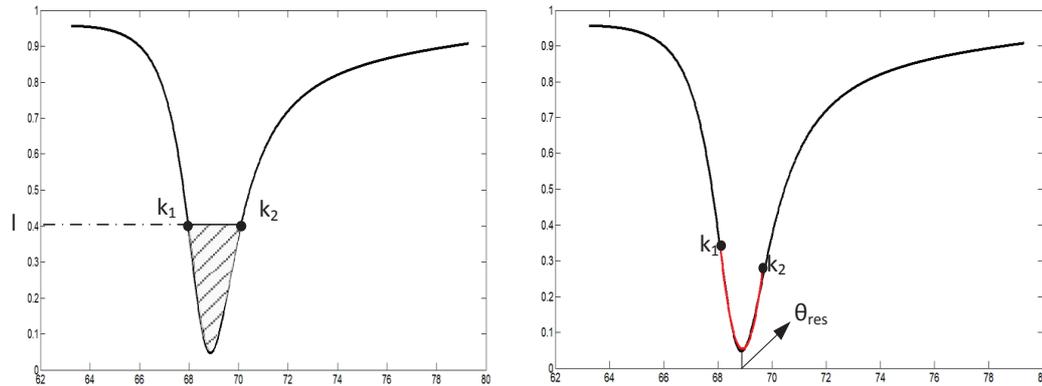


Figura 2.4: Representação da Técnica de Ajuste Polinômial para Obtenção da condição de ressonância

O gráfico a esquerda da Figura 2.4 ilustra, através da região hachurada entre os pontos  $k_1$  e  $k_2$ , os pontos utilizados para o cálculo do ângulo de ressonância pelo Ajuste Polinomial com referencial vertical. A utilização do referencial horizontal está ilustrada no gráfico da direita da Figura 2.4.

O ajuste polinomial minimiza o ruído na determinação do valor mínimo da curva e do ângulo de ressonância, além de permitir uma interpolação entre os pontos do sinal medido e ser menos susceptível às variações de valores de intensidade da fonte de luz.

### 2.3.2 Primeiro momento

O primeiro momento é uma das técnicas mais utilizadas na determinação do ângulo de ressonância através da curva SPR. A técnica consiste em encontrar o centróide dos pontos da curva que estão abaixo de um certo valor de intensidade. Este valor é denominado de linha base e determina a região entre os pontos  $k_1$  e  $k_2$ , ilustrada no gráfico da esquerda da Figura 2.4, similarmente a técnica de Ajuste Polinomial com referencial vertical. O ângulo de ressonância, obtido pela técnica do primeiro momento, é determinado através da equação (2.14).

$$\theta_{res} = \frac{\sum_{k=k_1}^{k=k_2} |I_{rn}(\theta_i) - l| \cdot \theta_i}{\sum_{k=k_1}^{k=k_2} |I_{rn}(\theta_i) - l|} \quad (2.14)$$

onde:

- $I_{rn}(\theta_i)$  é o valor da intensidade de luz para o ângulo de incidência  $\theta_i$  captado pelo *pixel*  $i$
- $l$  é o valor para a linha base

O primeiro momento apresenta um baixo ruído, porém, é mais susceptível a variações verticais na curva SPR. Estas variações podem ser causadas por alterações na intensidade luminosa do *Laser* ou na sensibilidade no sensor de imagem.

## 2.4 Biossensores SPR Convencionais

Biossensores SPR convencionais são equipamentos constituídos de fonte de luz, conjunto ótico, transdutor, circuitos eletrônicos para condicionamento de sinais, fotodetectores, unidades de processamento e interfaces com usuário. O diagrama de blocos ilustrado na Figura 2.5 representa a composição de um biossensor SPR convencional.

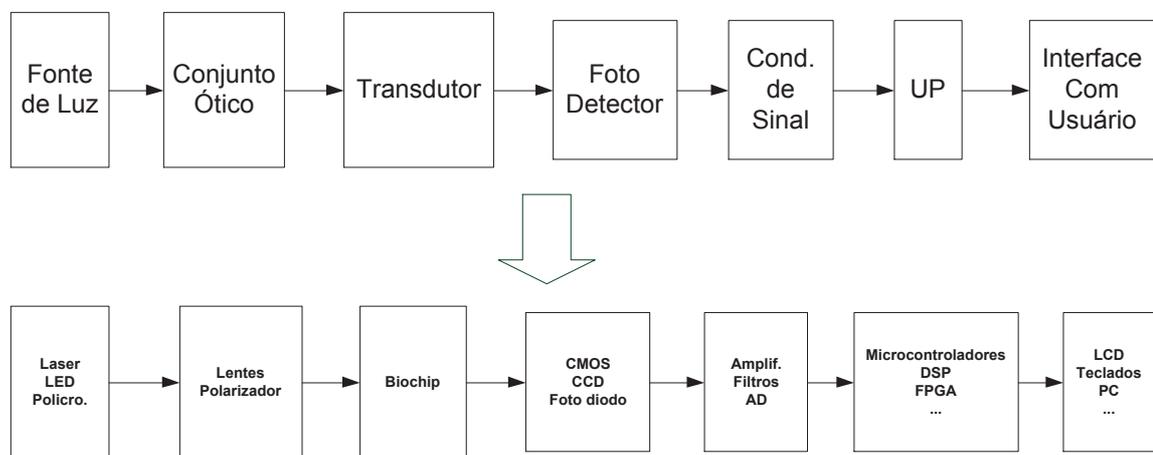


Figura 2.5: Diagrama de Blocos de um Biossensor SPR convencional

A fonte de luz utilizada pode ser uma luz com banda de comprimento de onda estreita como um diodo *laser* ou um LED, ou uma luz policromática. É necessário um controle de corrente e temperatura para a fonte de luz, com objetivo de manter a potência ótica constante e o comprimento de onda desejado.

A luz gerada passa por um conjunto ótico composto de lentes que ajustam o foco e direção do feixe de luz. Pode existir ainda um polarizador para deixar passar apenas a luz com polarização desejada. A luz incide no transdutor, que normalmente é formado por um metal depositado sobre um dielétrico. No transdutor é depositado a camada bioquímica responsável pela fixação e captação da substância a ser analisada. A luz refletida pelo transdutor é captada pelos fotodetectores. Como fotodetector pode-se utilizar câmeras CCD ou CMOS ou até mesmo um único fotodiodo. O sinal captado pelos fotodetectores passa pelo condicionador de sinais que podem conter filtros para minimização de ruído, amplificadores para aumentar a faixa do sinal e torná-los adequados para serem convertidos pelos conversores analógicos digitais (AD) existentes.

Os conversores AD podem fazer parte do próprio circuito de condicionamento ou da unidade de processamento do sistema.

A unidade de processamento (UP) utiliza os sinais adquiridos para calcular os parâmetros da camada sensível, normalmente índice de refração ou espessura, podendo utilizar estes valores para calcular concentração da substância analisada e características cinéticas da reação. Os dispositivos utilizados como unidade de processamento são bem variados podendo ser FPGA, microcontroladores, ASIC, DSP, SOC ou qualquer outro dispositivo capaz de realizar o processamento de dados.

A informação processada é enviada para um dispositivo de interface com o usuário como *displays* LCD, telas sensíveis ao toque, outros computadores e etc. A interface com usuário também é composta por dispositivos que tornam possível o usuário manipular e controlar o sistema, como por exemplo teclados e botões.

Alguns biossensores mais complexos possuem ainda dispositivos capazes de trocar automaticamente as substâncias analisadas e realizar a limpeza do sensor. Logo, instrumentos convencionais e comerciais podem ser bastante complexos e conseqüentemente possuem um custo elevado.

# Capítulo 3

## Morfologia da curva SPR

Como alternativa ao monitoramento da condição de ressonância que ocorre nos biossensores comerciais existentes, é proposta a análise morfológica da curva SPR com objetivo de expandir as funcionalidades de biossensores baseados em ressonância de plasmons de superfície. Esta análise procura identificar alterações no formato da curva em função de variações na camada sensível. As variações na camada são decorrentes de adsorção ou remoção de substâncias, o que altera o valor da espessura da camada, ou de modificações no índice de refração exterior.

Este capítulo descreve os novos parâmetros propostos para analisar o sinal SPR, assim como o estudo realizado para avaliar a sensibilidade destes parâmetros com relação a espessura e índice de refração da camada sensível, além da influência com relação a variação de temperatura.

Além disto é apresentada a análise realizada para avaliar os fatores que são determinantes para o valor da largura da curva SPR. São avaliadas a influência da temperatura, substâncias adsorvidas, espessura e rugosidade da superfície metálica.

### 3.1 Definição dos parâmetros

A análise da morfologia da curva proposta é realizada através do monitoramento dos parâmetros da largura  $\Gamma$  e da assimetria  $G$  da curva SPR, que estão ilustrados na Figura 3.1.

A largura da curva é calculada no valor de intensidade média representado pela reta da Figura 3.1. Este valor é obtido através do valor médio entre o ponto máximo e o ponto mínimo da curva SPR. O valor de  $\Gamma$  é então obtido através da distância entre a borda esquerda e a borda direita da curva. Como mencionado na seção 2.3, para obter o mínimo da curva é necessário utilizar técnicas de obtenção da condição de ressonância.

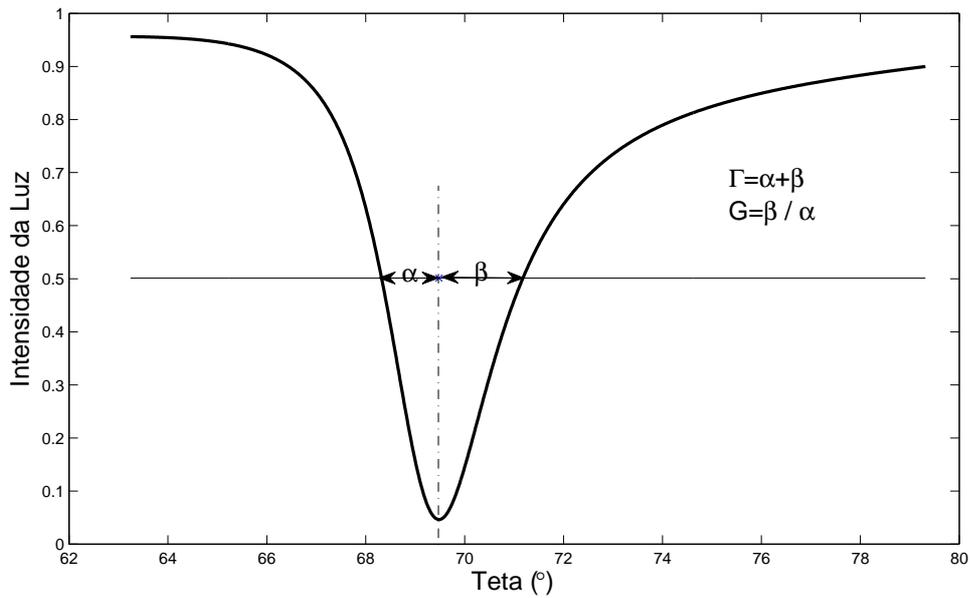


Figura 3.1: Características da Morfologia da Curva SPR

Para encontrar a assimetria  $G$  é preciso inicialmente determinar a abscissa do valor mínimo da curva que corresponde ao ângulo de ressonância  $\theta_{res}$ . Em seguida é determinada a distância entre o mínimo e a borda esquerda da curva SPR  $\alpha$ , assim como a distância entre o mínimo e a borda direita  $\beta$ . Estes valores são obtidos no valor de intensidade média da curva. O valor da assimetria é definido através da razão entre as duas metades da curva em relação ao ponto mínimo, podendo ser calculado através das equações 3.1 e 3.2

$$G_R = \frac{\beta}{\alpha} \quad (3.1)$$

$$G_L = \frac{\alpha}{\beta} \quad (3.2)$$

onde  $G_R$  representa quanto a borda direita é maior do que a esquerda e  $G_L$  o quanto a borda esquerda é maior do que a direita. Existe uma relação direta entre os valores de  $\Gamma$  e  $G$ . A largura da curva pode ser determinada em função dos valores de  $\alpha$  e de  $\beta$  de acordo com a equação 3.3. Utilizando-se as equações 3.1 e 3.3 encontra-se a relação entre a assimetria e a largura da curva através da equação 3.4.

$$\Gamma = \alpha + \beta \quad (3.3)$$

$$\Gamma = \alpha(1 + G_R) \quad (3.4)$$

### 3.1.1 Energia do sinal bruto

Variações na camada sensível provocam um deslocamento no ângulo de ressonância assim como também uma variação no decaimento da curva. Desta forma a área total da curva também é alterada. O aumento da espessura  $d_3$  assim como mudanças no valor do índice de refração da camada  $n_3$ , fazem com que a energia absorvida para criar a onda de plasmons de superfície também seja modificada. Isto permite medir variações da camada sensível através da energia do sinal de luz refletido.

O sinal de luz refletido é captado por um sensor de imagem que possui um número de *pixels* finito  $N$ . Logo a energia total do sinal bruto obtido, denominada aqui por  $E_{sig}$  é definida como sendo o somatório de pontos do sinal de imagem refletido  $I_{rs}(x(n))$  captado pela câmera para a substância analisada. O valor de  $I_{rs}(x(n))$  está relacionado a equação 2.11 substituindo-se a relação de ângulo de incidência para posição do pixel da câmera  $x(n)$ . Logo o valor da energia pode ser calculado através da expressão da equação 3.5.

$$E_{sig} = \sum_{n=k_1}^{n=k_2} I_{rs}(x(n)) \quad (3.5)$$

Os limites para o cálculo da energia da curva deve compreender a região sensível ao efeito SPR, podendo obter valores mínimos de  $k_1 = 1$  até o máximo de  $k_2 = N$  com  $k_2 > k_1$ . A determinação do valor de  $E_{sig}$  não necessita do sinal de referência, como acontece no cálculo do ângulo de ressonância, evitando a etapa de calibração e tornando mais rápido o processamento. Uma soma ponderada de pontos já foi utilizada para gerar um sinal de tensão correlacionado ao índice de refração e concentração do analito [HANSEN; JOHNSTON; WILSON, 2005].

### 3.1.2 Ruído do ângulo de ressonância

Além dos parâmetros da morfologia da curva e da energia, propõe-se o monitoramento do ruído sobre o pixel correspondente ao ângulo de ressonância.

A curva SPR é obtida realizando-se a divisão do sinal de imagem da substância analisada  $I_{rs}$  pelo sinal da referência  $I_{rref}$  sendo representado pela equação 2.12. O sinal de referência  $I_{rref}$  é obtido através da média de sinais de imagem adquiridos com o *biochip* exposto apenas ao ar.

Cada *pixel* do sinal de imagem  $I_m(k)$  é obtido através da média dos *pixels*  $I_{rs}(k)$  dos  $N$  quadros do sinal de imagem  $I_{rs}(j)$  através da equação 3.6.

$$I_m(k) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{j=1}^{j=N} I_{rs}(j, k) \quad (3.6)$$

Utilizando-se a equação 2.12 e os valores de  $I_m(k)$ , obtém-se a curva SPR da média dos  $N$

quadros de imagem captados. Através da curva SPR calcula-se o ângulo de ressonância  $\overline{\theta_{res}}$  e o respectivo valor de intensidade  $\overline{I_{\theta_{res}}}$ . Similarmente são obtidos os valores dos ângulos de ressonância  $\theta_{res}$  e intensidade  $I_{\theta_{res}}(j)$  para cada  $j$  quadro de imagem. O nível de ruído  $\sigma_{\theta_{res}}$  é então calculado através da equação 3.7.

$$\sigma_{\theta_{res}} = \frac{1}{N} \cdot \sqrt{\sum_{j=1}^{j=N} (I_{\theta_{res}}(j) - \overline{I_{\theta_{res}}})^2} \quad (3.7)$$

O valor de  $\sigma_{\theta_{res}}$  é o desvio padrão do valor do pixel, correspondente ao ângulo de ressonância, sobre os  $N$  quadros utilizados na obtenção da curva SPR.

## 3.2 Sensibilidade paramétrica

Para avaliar a utilização de  $\Gamma$ ,  $G$  e  $E_{sig}$  na medição de uma substância com biossensores SPR, foi realizada uma análise da sensibilidade destes parâmetros em função do índice de refração  $n_3$ , da espessura da camada sensível  $d_3$  e da variação em relação a temperatura  $T$ . O sensor utilizado para análise foi o *biochip* descrito em [C.THISTRUP et al., 2004], simulado com o modelo de 4 camadas obtido com as equações de Fresnel na formulação matricial [NEFF et al., 2006] apresentada na seção 2.2.2. O filme de metálico utilizado para simulação foi de ouro com espessura de  $50nm$ . O comprimento de onda utilizado para análise de sensibilidade foi de  $\lambda = 670nm$ .

A sensibilidade paramétrica  $S_{px}$  é definida como a variação do parâmetro avaliado  $p$  em função da variável analisada  $x$ . Os parâmetros analisados são  $\Gamma$ ,  $G$  e  $E_{sig}$ . As variáveis analisadas são  $n_3$ ,  $d_3$  e  $T$ . A sensibilidade pode ser determinada pela equação

$$S_{px} = \frac{\delta p}{\delta x} \quad (3.8)$$

O índice de refração e a espessura da camada sensível são as variáveis que se deseja medir nos biossensores SPR. A partir destes valores pode-se determinar a concentração da substância na amostra e avaliar as interações cinéticas destas substâncias. A temperatura foi escolhida para avaliar a sensibilidade dos parâmetros, pois é um dos principais fatores que alteram a qualidade da medição.

### 3.2.1 Sensibilidade com relação à espessura

A espessura da camada  $d_3$  determina a quantidade de substância fixada sobre o filme de ouro. O conhecimento do seu valor é imprescindível na determinação da concentração da substância

analisada no biossensor. Nos biossensores comerciais geralmente o valor da saída é a variação do índice de refração efetivo, que depende do valor do índice de refração da camada  $n_3$  e da espessura  $d_3$ . De acordo com a substância a ser analisada é possível atribuir o valor para uma das variáveis  $n_3$  ou  $d_3$  e determinar o valor da outra através da medição do índice de refração efetivo. Desta forma, para que o biossensor seja preciso, a variável de saída deve ser o mais sensível possível a variação de  $d_3$  e de  $n_3$ .

A sensibilidade de cada parâmetro  $p$  com relação a espessura pode ser definida através das equações 3.9 à 3.12.

$$S_{\theta_{res}} = \frac{\delta\theta_{res}}{\delta d_3} \quad (3.9)$$

$$S_{\Gamma d_3} = \frac{\delta\Gamma}{\delta d_3} \quad (3.10)$$

$$S_{G d_3} = \frac{\delta G}{\delta d_3} \quad (3.11)$$

$$S_{E_{sig} d_3} = \frac{\delta E_{sig}}{\delta d_3} \quad (3.12)$$

A sensibilidade dos parâmetros em relação a variação da espessura foi analisada para um índice de refração de 1,45, que corresponde ao valor do índice de refração da proteína BSA (Bovine Serum Albumin). O BSA foi escolhido por ser um dos elementos que pode formar a primeira camada do biocatalizador. Os valores da espessura foram analisados no intervalo de  $3nm$  a  $17nm$  com incremento de  $1nm$ . Para cada valor de  $d_3$ , foi obtida a curva SPR simulada através das equações de Fresnel na forma matricial. A partir da curva foram calculados os parâmetros  $\Gamma$ ,  $G$ ,  $E_{sig}$  e  $\theta_{res}$  de acordo com os algoritmos descritos na seção 3.1.

Os algoritmos para determinação da largura da curva e da assimetria utilizam o ponto do ângulo de ressonância como parâmetro. Logo, a técnica utilizada para obtenção de  $\theta_{res}$  influencia diretamente nos valores de  $\Gamma$  e  $G$ . O cálculo da energia do sinal é independente do valor de  $\theta_{res}$ , logo seu valor é o mesmo para qualquer técnica.

Para avaliar a sensibilidade em função de  $d_3$  foram utilizadas três técnicas diferentes para obtenção de  $\theta_{res}$ . Os valores do ângulo de ressonância foram obtidos utilizando o Mínimo da Curva SPR, a técnica de Primeiro Momento e pelo Ajuste Polinomial. Estas técnicas foram escolhidas por serem as mais utilizadas nos biossensores existentes. O comportamento dos parâmetros referentes a morfologia da curva, calculados através da busca direta pelo ponto mínimo, estão ilustrados na Figura 3.2

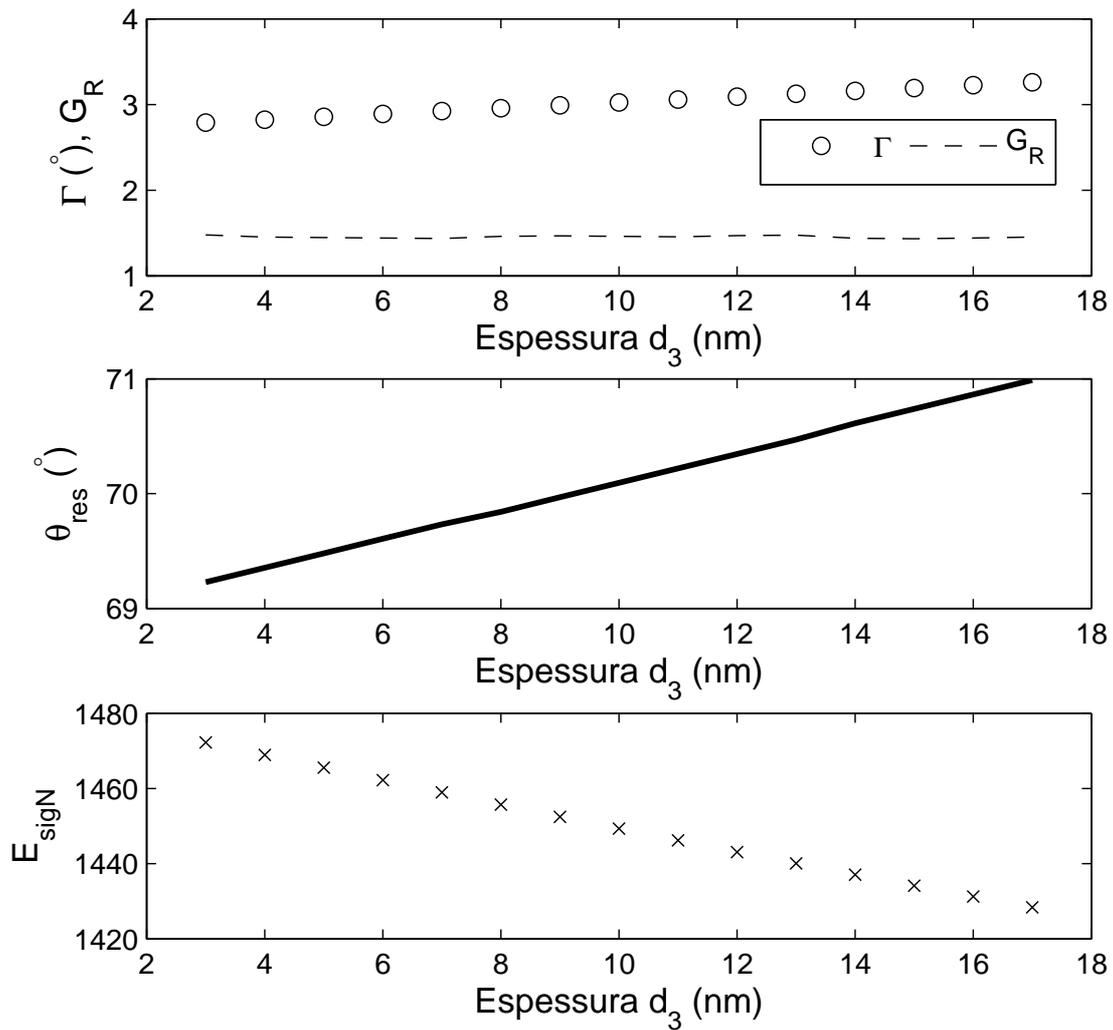


Figura 3.2: Variação dos parâmetros da morfologia da curva em relação a espessura da camada sensível

A largura da curva e o ângulo de ressonância apresentam uma característica de comportamento linear em relação a espessura, com uma taxa de variação positiva. A assimetria  $G_R$  e a energia do sinal  $E_{sig}$  assumem um comportamento com taxa de variação negativa em relação a espessura.

Os valores das sensibilidades encontrados para os parâmetros foram  $S_{\theta_{d_3}} = 0,1255^\circ/nm$ ,  $S_{\Gamma_{d_3}} = 0,0336^\circ/nm$ ,  $S_{G_{d_3}} = -0,0015/nm$ . Esses valores podem indicar que o ângulo de ressonância é o parâmetro mais sensível em relação a espessura, porém, os valores estão em diferentes ordens de grandezas. Desta forma, foi necessário avaliar a sensibilidade em relação a variação proporcional de cada parâmetro. Logo, a sensibilidade paramétrica, denominada a partir de agora como sensibilidade relativa, passa a ser calculada de acordo com a equação 3.13.

$$S_x^p = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \left\{ \frac{\frac{\Delta p}{p}}{\frac{\Delta x}{x}} \right\} = \frac{x}{p} \frac{\delta p}{\delta x} \quad (3.13)$$

onde,  $p$  são os parâmetros a serem avaliados e  $x$  os valores da temperatura ( $T$ ), do índice de refração ( $n_3$ ) e espessura da camada sensível ( $d_3$ ). A sensibilidade com relação a espessura passa a ser calculada de acordo com a equação 3.14.

$$S_{d_3}^p = \lim_{\Delta d_3 \rightarrow 0} \left\{ \frac{\frac{\Delta p}{p}}{\frac{\Delta d_3}{d_3}} \right\} = \frac{d_3}{p} \frac{\delta p}{\delta d_3} \quad (3.14)$$

Os resultados obtidos para as sensibilidades dos parâmetros  $\theta_{res}$ ,  $\Gamma$ ,  $G_R$  e  $E_{sig}$  estão ilustrados na Figura 3.3.

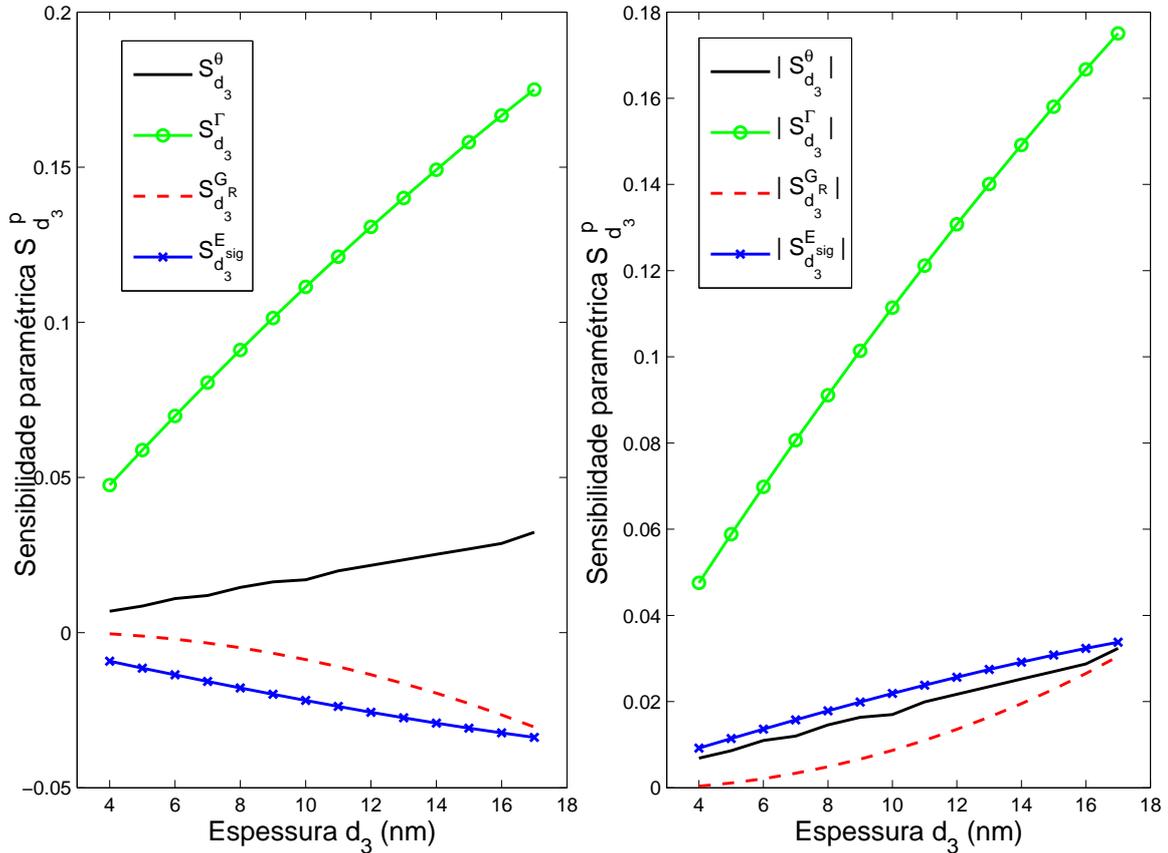


Figura 3.3: Sensibilidade paramétrica em relação a espessura da camada sensível

Pode-se verificar, no gráfico da Figura 3.3, que para a faixa de espessura analisada a largura da curva apresenta uma maior sensibilidade relativa  $S_{d_3}^\Gamma$ . Os parâmetros da assimetria e da energia do sinal apresentam sensibilidades negativas ( $S_{d_3}^{G_R} < 0$  e  $S_{d_3}^{E_{sig}} < 0$ ), o que indica que seus valores diminuem com aumento da espessura. O gráfico da direita da Figura 3.3 representa

o comportamento dos módulos das sensibilidades, o que facilita a comparação para indicar qual parâmetro é mais sensível. Pode-se observar que o parâmetro  $\Gamma$  é o mais sensível em relação a variação da espessura, seguido de  $E_{sig}, \theta_{res}$  e por último  $G_R$ .

Os coeficientes de correlação de  $\Gamma$  e  $\theta_{res}$  em relação a espessura apresentaram valores unitários, enquanto que para a assimetria  $G_R$  o valor foi de  $-0,9725$  e para  $E_{sig}$  foi de  $-0,9997$ . Isto demonstra que todos os parâmetros podem ser utilizados com precisão para medição de  $d_3$ .

### Utilização do ajuste polinomial

Utilizando-se o ponto mínimo e o valor do ângulo de ressonância, determinado a partir do ajuste polinomial, realizou-se o cálculo da largura e da assimetria com  $n_3 = 1,45$  e  $3nm < d_3 < 17nm$ . Os parâmetros calculados apresentaram o comportamento ilustrado na Figura 3.4.

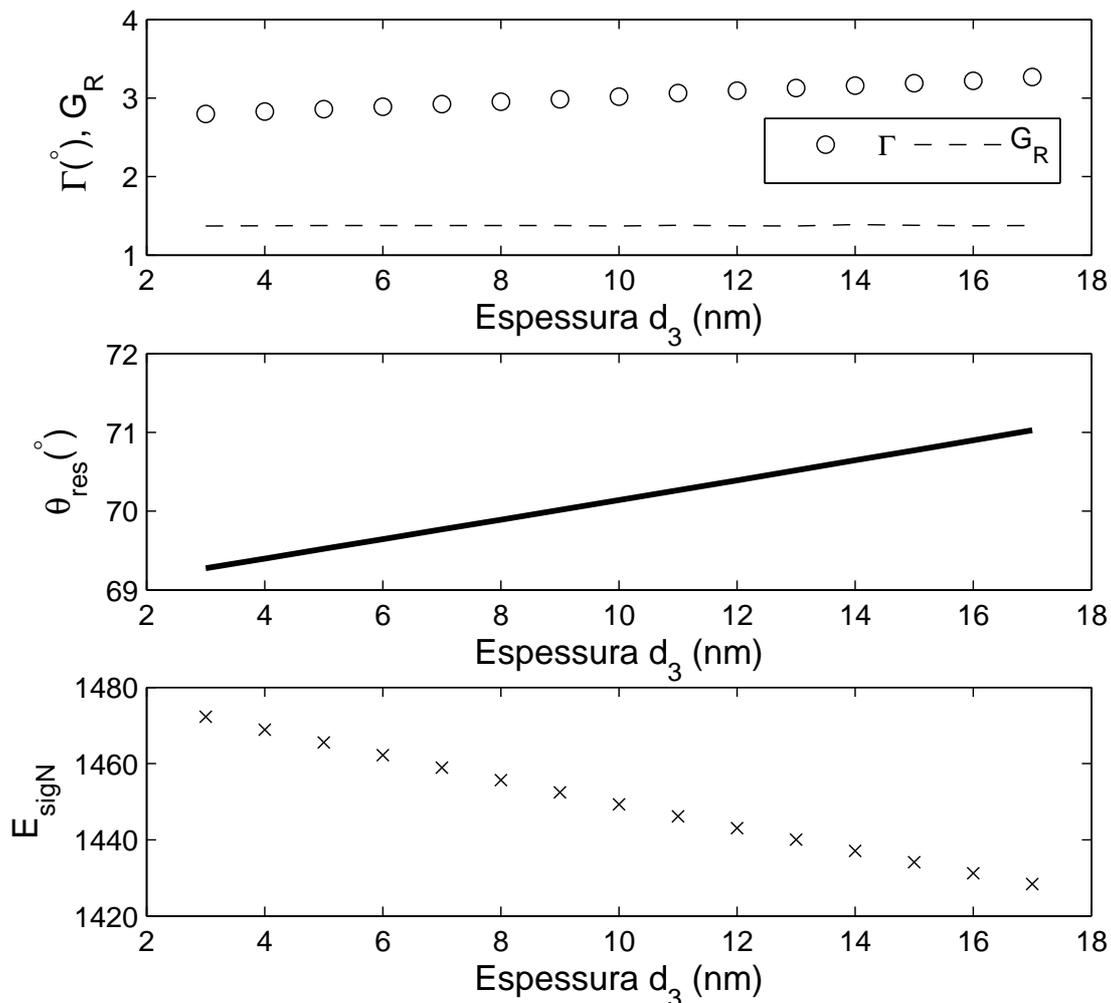


Figura 3.4: Variação dos parâmetros da morfologia da curva em relação a espessura da camada sensível utilizando-se o ajuste polinomial

A utilização do polinômio gera os mesmos valores e comportamentos encontrados com o mínimo da curva. A igualdade nos valores é devido a curva utilizada ser resultante do modelo de Fresnel sem o acréscimo de nenhum ruído. Em sinais reais obtidos experimentalmente a presença do ruído na curva SPR seria minimizada com a utilização do Ajuste Polinomial, pois a aproximação da região em torno da condição de ressonância por um polinômio já filtra o ruído existente.

### Utilização do Primeiro momento

Utilizando-se o Primeiro Momento para encontrar o valor do ângulo de ressonância, foram calculados os valores de  $\Gamma$ ,  $G$  e  $E_{sig}$  em função de  $d_3$ . Os valores obtidos estão ilustrados na Figura 3.5.

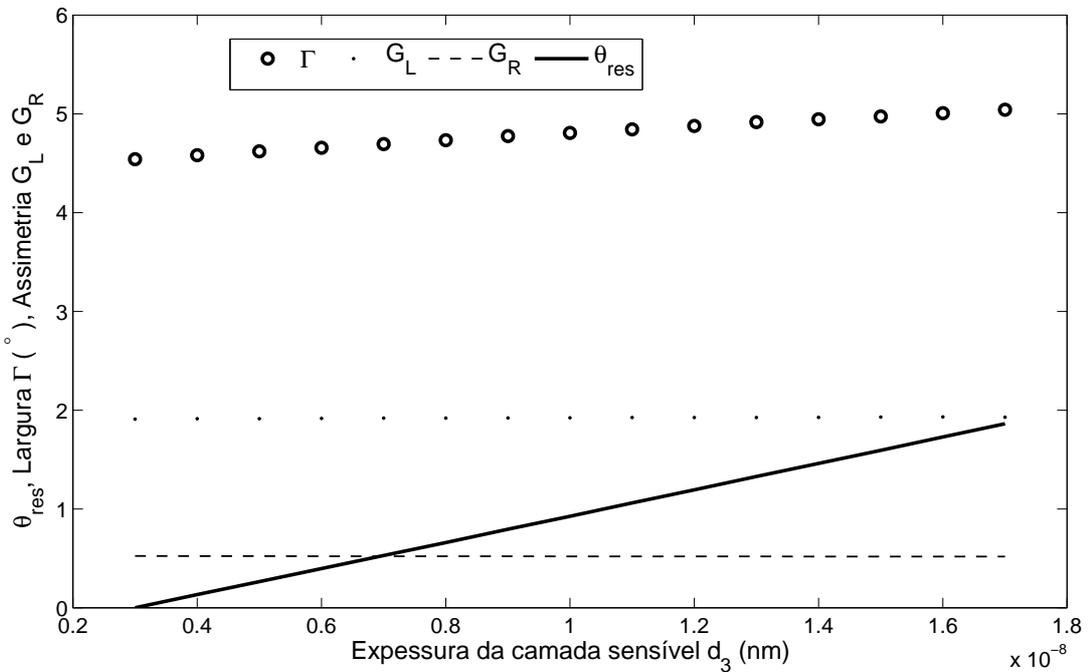


Figura 3.5: Variação dos Parâmetros da morfologia da curva em relação a espessura da camada sensível utilizando-se o Primeiro Momento

Comparando-se a Figura 3.5 com as Figuras 3.4 e 3.2, pode-se verificar que a utilização do primeiro momento afeta consideravelmente os valores da largura e da assimetria da curva. Este resultado pode ser melhor compreendido através de uma análise da Figura 3.6.

Para distinguir entre as técnicas utilizadas, o ângulo de ressonância encontrado através do mínimo da curva foi denominado de  $\theta_{resM}$ . Com este valor determina-se a intensidade média  $ref$  e calcula-se a largura e assimetria com os valores de  $\alpha$  e  $\beta$ .

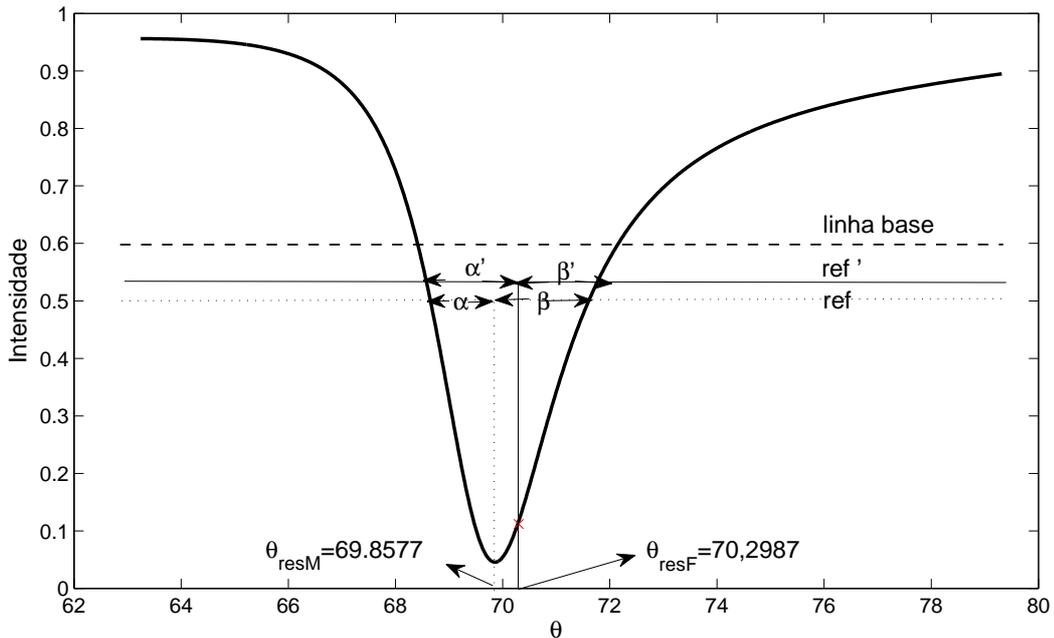


Figura 3.6: Influência da Utilização do Primeiro Momento no cálculo de  $\Gamma$  e  $G$

Ao utilizar-se o primeiro momento com o valor de 0,6 para a linha base, encontra-se o valor para o ângulo de ressonância  $\theta_{resF} = 70,2987$ . Isto representa um erro de  $0,44^\circ$  em relação ao valor verdadeiro para o ângulo de ressonância  $\theta_{resM}$ . O valor de  $\theta_{resF}$  está deslocado a direita em relação ao ponto de mínimo, pois a região da curva abaixo da linha base apresenta uma área maior na região que fica a direita do ponto mínimo. Conseqüentemente, o centróide calculado é maior do que o ângulo onde ocorre o mínimo. Um deslocamento a esquerda seria possível se o valor de  $\alpha$  fosse maior do que  $\beta$ .

A utilização de  $\theta_{resF}$  como parâmetro para o cálculo de  $\Gamma$  e  $G$  leva a um valor de intensidade de referência diferente  $ref'$ . Desta forma, a largura calculada se torna maior do que deveria. O valor da assimetria também é alterado, pois a distância do ângulo de ressonância em relação as bordas apresentam novos valores  $\beta'$  e  $\alpha'$ .

Outro fator que pode alterar a determinação dos valores da assimetria e da largura é a escolha da linha base. Para avaliar a influência da linha base, os valores da largura e da assimetria foram calculados para valores da linha base variando entre 0,95 e 0,25. Pode-se verificar, na Figura 3.7, que o valor da linha base altera consideravelmente o valor da largura calculada. A medida que se aumenta o valor da linha base o valor de  $\Gamma$  também cresce. Para valores elevados da linha base a dinâmica da variação da largura em relação a espessura é alterada, passando a ter uma taxa de variação negativa. Este efeito pode ser observado nos valores de 0,95 e 0,9 de linha base.

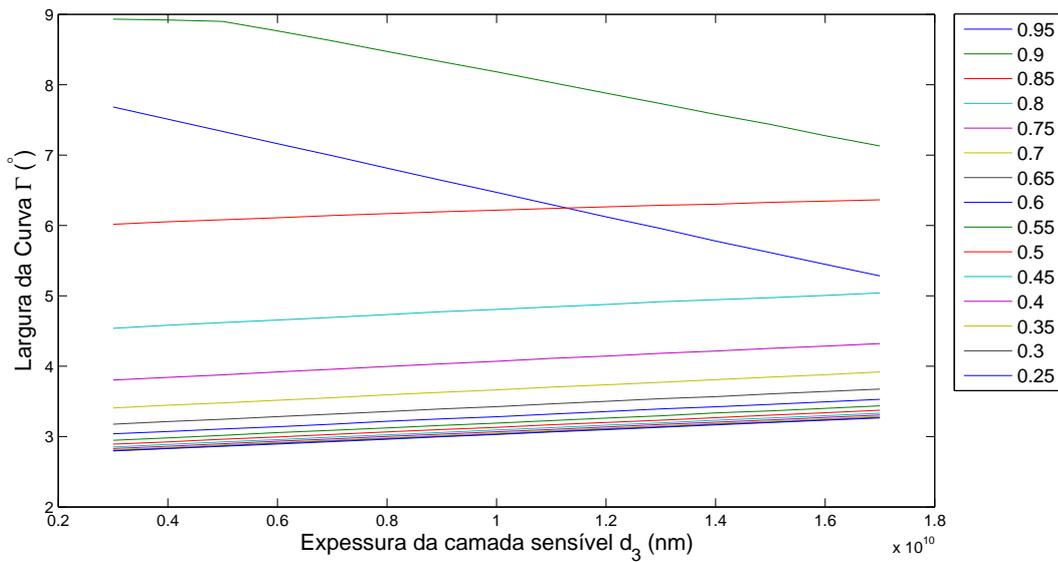


Figura 3.7: Influência do valor da linha base na determinação de  $\Gamma$

A assimetria também é fortemente alterada em função do valor da linha base escolhida, como pode-se observar na Figura 3.8. O valor da assimetria  $G_R$  calculado sofre um decréscimo com o aumento no valor da linha base. Para valores elevados da linha base, pode-se verificar uma alteração na dinâmica da assimetria calculada.

A influência da linha base sobre o cálculo de  $\Gamma$  e  $G_R$  é justificável pelo fato de aumentar a diferença entre o centróide e o ponto mínimo da curva. Esta diferença, no entanto, só é perceptível para curvas assimétricas.

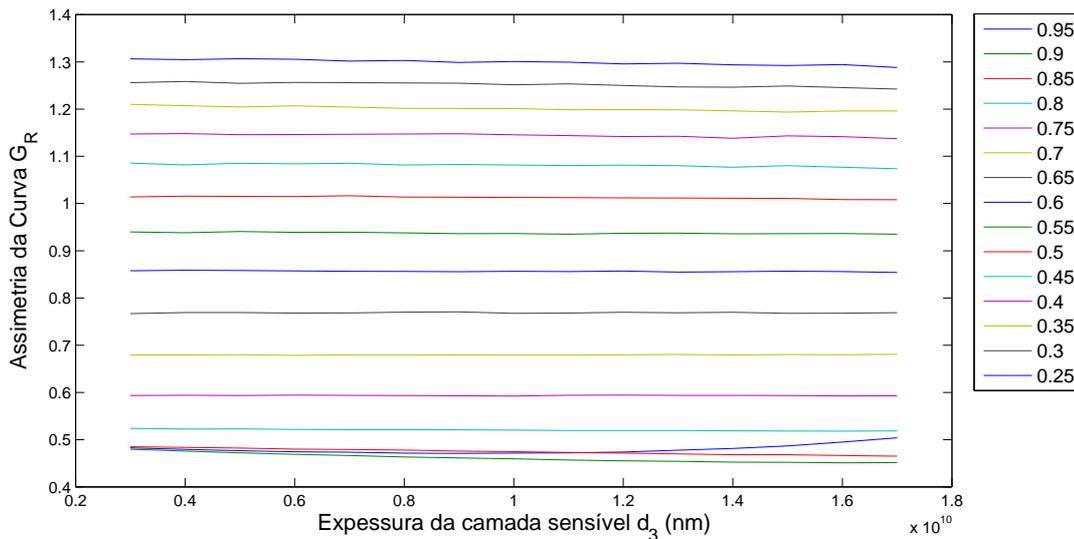


Figura 3.8: Influência do valor da linha base na determinação de  $G_R$

Diante das circunstâncias apresentadas, o primeiro momento não demonstra ser uma boa maneira para determinar o mínimo no cálculo da largura e da assimetria da curva.

### 3.2.2 Sensibilidade com relação ao índice de refração

A sensibilidade com relação ao índice de refração da camada sensível indica o quanto a variável de saída é alterada quando ocorre uma variação no valor de  $n_3$ , o que determina a qualidade desta variável na medição do índice de refração. Para cada parâmetro a sensibilidade com relação a  $n_3$  é definida pelas equações 3.15 à 3.18.

$$S_{\theta_{res}} = \frac{\delta\theta_{res}}{\delta n_3} \quad (3.15)$$

$$S_{\Gamma_{n_3}} = \frac{\delta\Gamma}{\delta n_3} \quad (3.16)$$

$$S_{G_{n_3}} = \frac{\delta G}{\delta n_3} \quad (3.17)$$

$$S_{E_{sig_{n_3}}} = \frac{\delta E_{sig}}{\delta n_3} \quad (3.18)$$

Para avaliar a sensibilidade dos parâmetros em relação a variação do índice de refração, o valor da espessura da camada sensível  $d_3$  foi mantido constante em  $10nm$ . Para cada índice de refração  $n_3$ , variando dentro da faixa de  $1,33RIU$  a  $1,7RIU$  com um incremento de  $1 \times 10^{-3}RIU$ , obteve-se uma curva SPR através das equações de Fresnel. Utilizando-se a curva obtida foram calculados os valores de  $\theta_{res}$ ,  $\Gamma$ ,  $G$  e  $E_{sig}$ .

Similarmente ao realizado para análise da variação da espessura, foi definida a sensibilidade relativa de acordo com a equação 3.19.

$$S_{n_3}^p = \lim_{\Delta n_3 \rightarrow 0} \left\{ \frac{\frac{\Delta p}{p}}{\frac{\Delta n_3}{n_3}} \right\} = \frac{n_3}{p} \frac{\delta p}{\delta n_3} \quad (3.19)$$

Utilizando a equação 3.19 foram calculadas as sensibilidades relativas dos parâmetros em função do índice de refração  $n_3$ . Os comportamentos obtidos estão ilustrados na Figura 3.9.

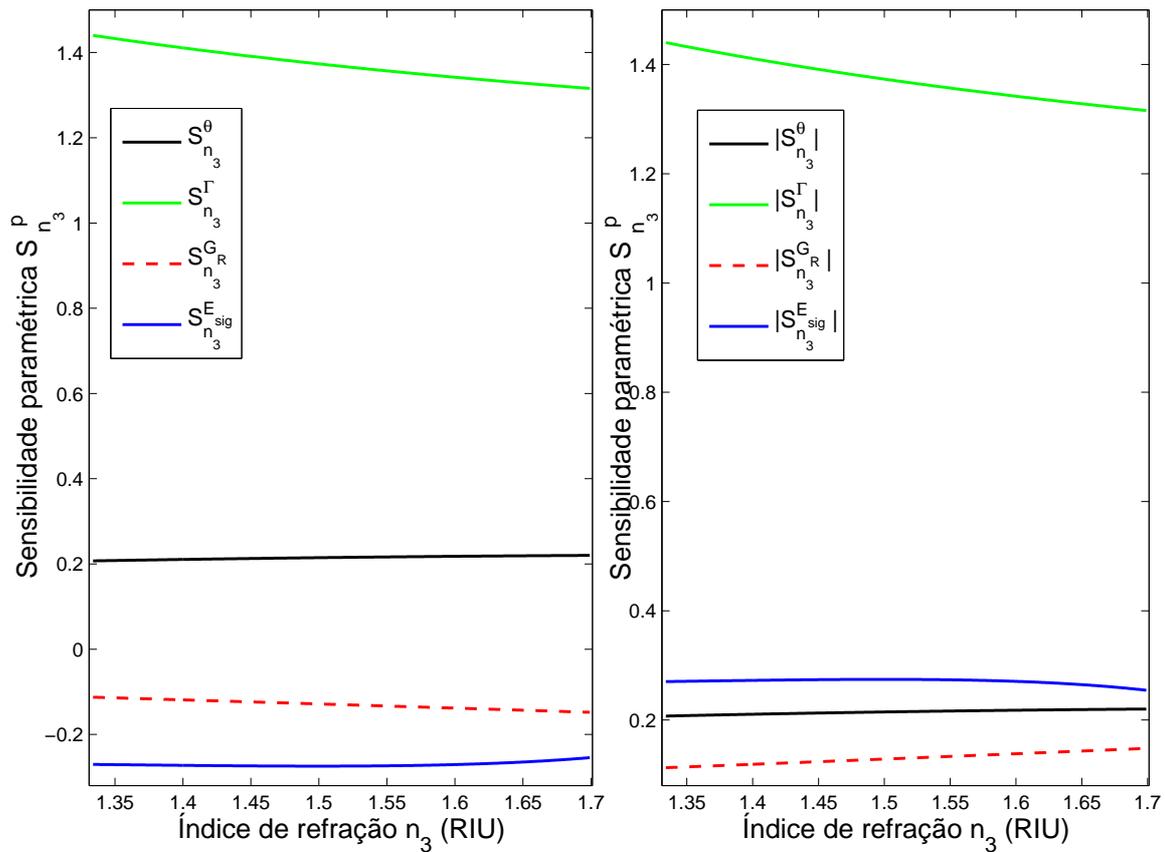


Figura 3.9: Sensibilidade paramétrica em relação ao índice de refração da camada sensível

A assimetria e energia do sinal apresentaram sensibilidades negativas com relação ao índice de refração ( $S_{n_3}^{GR} < 0$  e  $S_{n_3}^{E_{sig}} < 0$ ), indicando que com o aumento do índice de refração existe um decréscimo nos valores de  $G_R$  e  $E_{sig}$ . Analisando os valores dos módulos das sensibilidades, ilustrados no gráfico da direita da Figura 3.9, observa-se que a largura  $\Gamma$  foi o parâmetro mais sensível a variação do índice de refração, apresentando maior sensibilidade relativa  $S_{n_3}^{\Gamma}$ . A energia do sinal  $E_{sig}$  foi o segundo parâmetro mais sensível seguido por  $\theta_{res}$  e por último  $G_R$ .

Os coeficientes de correlação entre os parâmetros  $\theta_{res}$  e  $\Gamma$  em relação ao índice de refração foram unitários. Para a assimetria  $G_R$  o valor foi de  $-0,9333$  e para  $E_{sig}$  de  $-0,999$ . Estes valores indicam que todos os parâmetros podem ser utilizados para detectar variações no índice de refração da camada sensível.

### 3.2.3 Sensibilidade com relação à temperatura

A temperatura é um fator que afeta fortemente o desempenho de um biossensor, podendo ser o limitante para a precisão do equipamento. O seu valor influencia no nível de potência ótica do diodo *laser*, no ruído térmico e na sensibilidade do foto detector, nos componentes óticos

existentes, no índice de refração dos materiais e até mesmo na fixação de substâncias sobre a camada sensível. O efeito da dilatação do *biochip* também pode provocar um deslocamento na curva SPR e conseqüentemente no ângulo de ressonância calculado.

Existem estudos que demonstram a influência da temperatura sobre a resposta do biossensor SPR. A sensibilidade de um biossensor SPR com interrogação angular em relação a temperatura pode chegar a  $1,4 \times 10^{-4} RIU/^\circ C$ . Pode-se encontrar na literatura técnicas para minimizar ou compensar o efeito da temperatura. A mais comum é a utilização da medição do sinal de um canal de referência em paralelo com o canal sensor. Como a temperatura afeta os dois canais, realiza-se a diferença entre a resposta do canal sensor e o do canal de referência para retirar o efeito da temperatura [NAIMUSHIN et al., 2003b]. Outra possibilidade é a utilização da medição do sinal em valores inferiores ao ângulo crítico [CHINOWSKY et al., 1999].

A temperatura não afeta apenas a condição de ressonância, altera também as características da forma da curva SPR. Logo, para avaliar a eficácia de cada parâmetro proposto é necessário mensurar o quanto o valor deste parâmetro é deteriorado em relação a variação de temperatura. Desta forma define-se a sensibilidade com relação a temperatura através das equações 3.20 à 3.23.

$$S_{\theta T} = \frac{\delta\theta_{res}}{\delta T} \quad (3.20)$$

$$S_{\Gamma T} = \frac{\delta\Gamma}{\delta T} \quad (3.21)$$

$$S_{GT} = \frac{\delta G}{\delta T} \quad (3.22)$$

$$S_{E_{sig}T} = \frac{\delta E_{sig}}{\delta T} \quad (3.23)$$

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a forma da curva SPR foi considerada a influência sobre o valor índice de refração do metal  $n_2$ , do substrato  $n_1$  e da água  $n_3$ . Os efeitos sobre a fonte de luz, o foto detector e sobre os componentes óticos não foram incluídos nesta análise.

Os valores dos índices de refração foram calculados através de polinômios interpolados da resposta de cada material em função da temperatura [MOREIRA et al., 2008]. O ouro apresenta uma função dielétrica complexa, de forma que foi utilizado um polinômio para a parte real  $\epsilon_{mr}$  e outro para a parte imaginária  $\epsilon_{mi}$  de acordo com as equações 3.24 e 3.25.

$$\varepsilon_{mr} = a_4T^4 + a_3T^3 + a_2T^2 + a_1T^1 + a_0 \quad (3.24)$$

$$\varepsilon_{mi} = b_4T^4 + b_3T^3 + b_2T^2 + b_1T^1 + b_0 \quad (3.25)$$

onde,

- $a_4 = 1,9895 \times 10^{-14}$ ,  $a_3 = -6,4089 \times 10^{-11}$ ,  $a_2 = 4,2999 \times 10^{-7}$ ,  $a_1 = 7,4367 \times 10^{-4}$ ,  $a_0 = -15,3332$
- $b_4 = 1.3989 \times 10^{-12}$ ,  $b_3 = -2,3246 \times 10^{-9}$ ,  $b_2 = 1,3486 \times 10^{-6}$ ,  $b_1 = 0,0022$ ,  $b_0 = 0,2287$

O índice de refração do substrato foi calculado através do polinômio da equação 3.26. Os valores dos coeficientes são:  $c_4 = 2,1091 \times 10^{-22}$ ,  $c_3 = -5,8455 \times 10^{-12}$ ,  $c_2 = 1,1017 \times 10^{-8}$ ,  $c_1 = -3,4756 \times 10^{-6}$ ,  $c_0 = 1,5142$

$$n_1 = c_4T^4 + c_3T^3 + c_2T^2 + c_1T^1 + c_0 \quad (3.26)$$

A substância utilizada foi a água com índice de refração calculado através do polinômio descrito pela equação 3.27. Os valores dos coeficientes são:  $d_4 = -4,1330 \times 10^{-11}$ ,  $d_3 = 5,8331 \times 10^{-8}$ ,  $d_2 = -3,1701 \times 10^{-5}$ ,  $d_1 = 0,0076$ ,  $d_0 = 0,6560$

$$n_3 = d_4T^4 + d_3T^3 + d_2T^2 + d_1T^1 + d_0 \quad (3.27)$$

A faixa de variação da temperatura utilizada para análise foi de 273,16K à 376,16K, com um incremento de 1K. Para cada valor de temperatura foram calculados os respectivos índices de refração através das equações 3.24 à 3.27. Estes valores foram utilizados nas equações de Fresnel da seção 2.2.2 para obter a curva SPR correspondente ao valor de temperatura.

Através da curva SPR encontrada, utilizou-se a técnica do ajuste polinomial com polinômio de segunda ordem para encontrar os valores do ângulo de ressonância  $\theta_{res}$ . Além de  $\theta_{res}$  foi analisada a variação da largura da curva  $\Gamma$ , da assimetria  $G_R$  e da energia  $E_{sig}$ . O comportamento do ângulo de ressonância em função da temperatura está ilustrado na Figura 3.10.

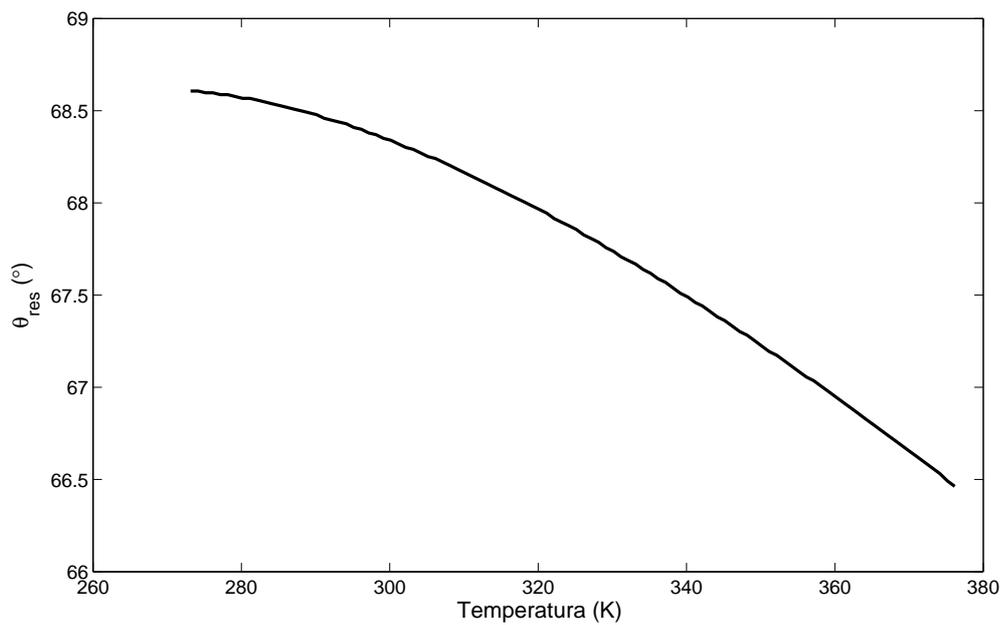


Figura 3.10: Influência da temperatura no ângulo de ressonância

Pode-se verificar que existe uma diminuição no valor do ângulo de ressonância com o acréscimo da temperatura. A largura da curva apresenta uma dinâmica em relação a temperatura ilustrada pela Figura 3.11. A medida que a temperatura cresce o valor de  $\Gamma$  aumenta, descrevendo uma curva que pode ser aproximada por um polinômio de terceira ordem. A taxa de variação  $\delta\Gamma/\delta T$  é não linear, com valores mais elevados em temperaturas baixas. Em temperaturas acima de  $22^\circ C$  a largura apresenta taxa de variação menor do que  $2 \times 10^{-3} / ^\circ C$ .

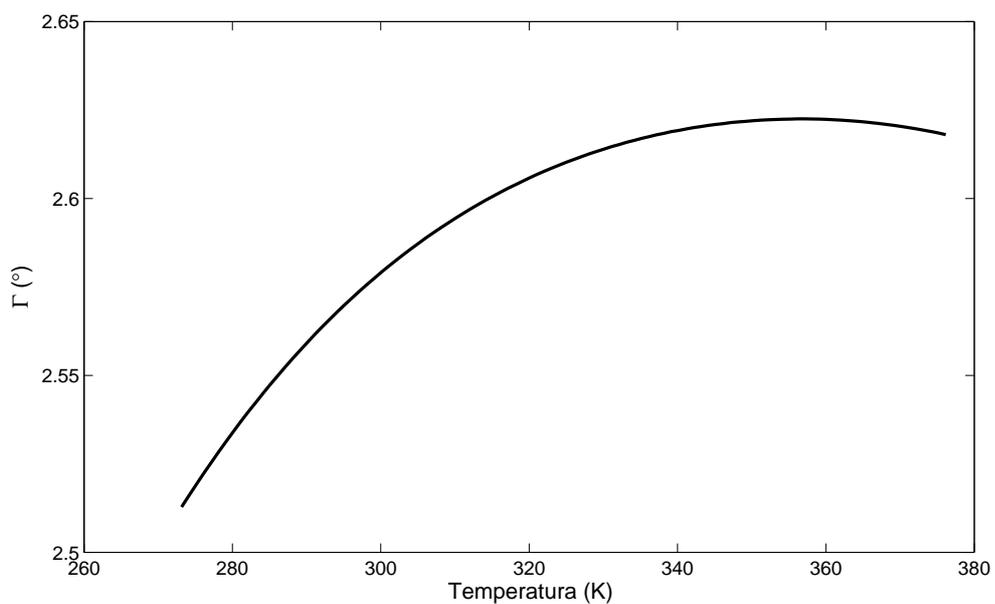


Figura 3.11: Influência da temperatura no valor da largura da curva  $\Gamma$

O aumento da largura pode ser justificado pelo fato de que elevando-se a temperatura aumenta-se a energia interna das moléculas do *biochip*. Como os elétrons livres possuem mais energia a amplitude da oscilação de plasmons é maior. Desta maneira, é necessário um valor mais elevado do vetor de onda da luz incidente para que a condição de ressonância seja alcançada. Isto faz com que seja necessário uma maior absorção de energia e conseqüentemente uma elevação no valor da largura.

A assimetria da curva também apresentou variação com a temperatura, descrevendo o comportamento ilustrado na Figura 3.12. A taxa de variação é constante e positiva, com valor de  $\delta G_R/\delta T = 9,8443 \times 10^{-4}/^{\circ}C$ , fazendo com que a curva fique mais assimétrica de acordo com o aumento da temperatura.

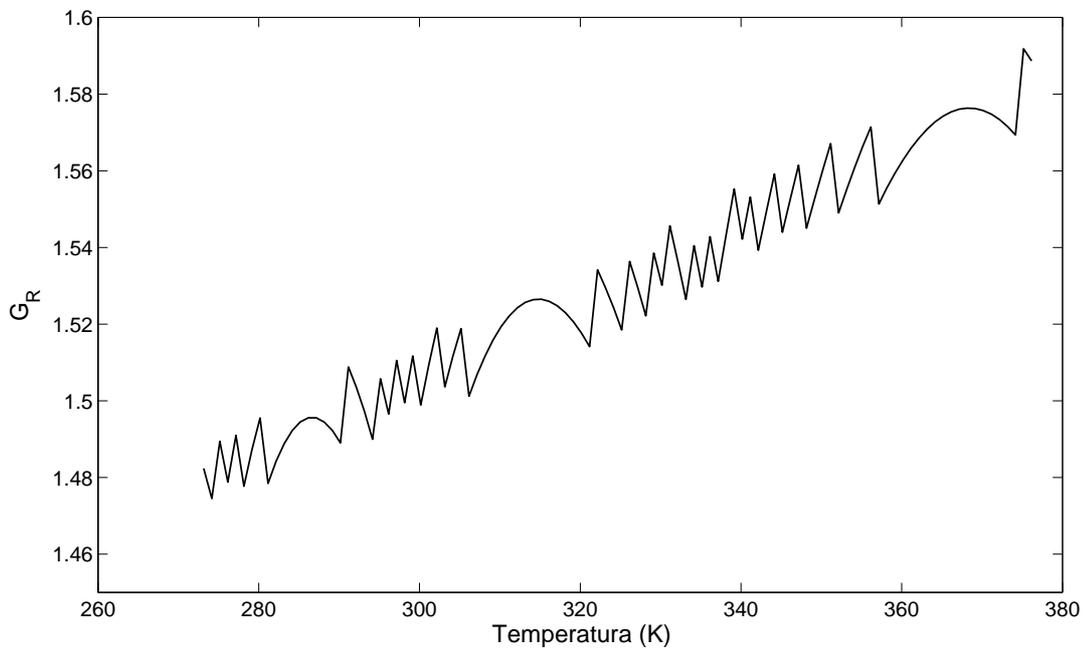
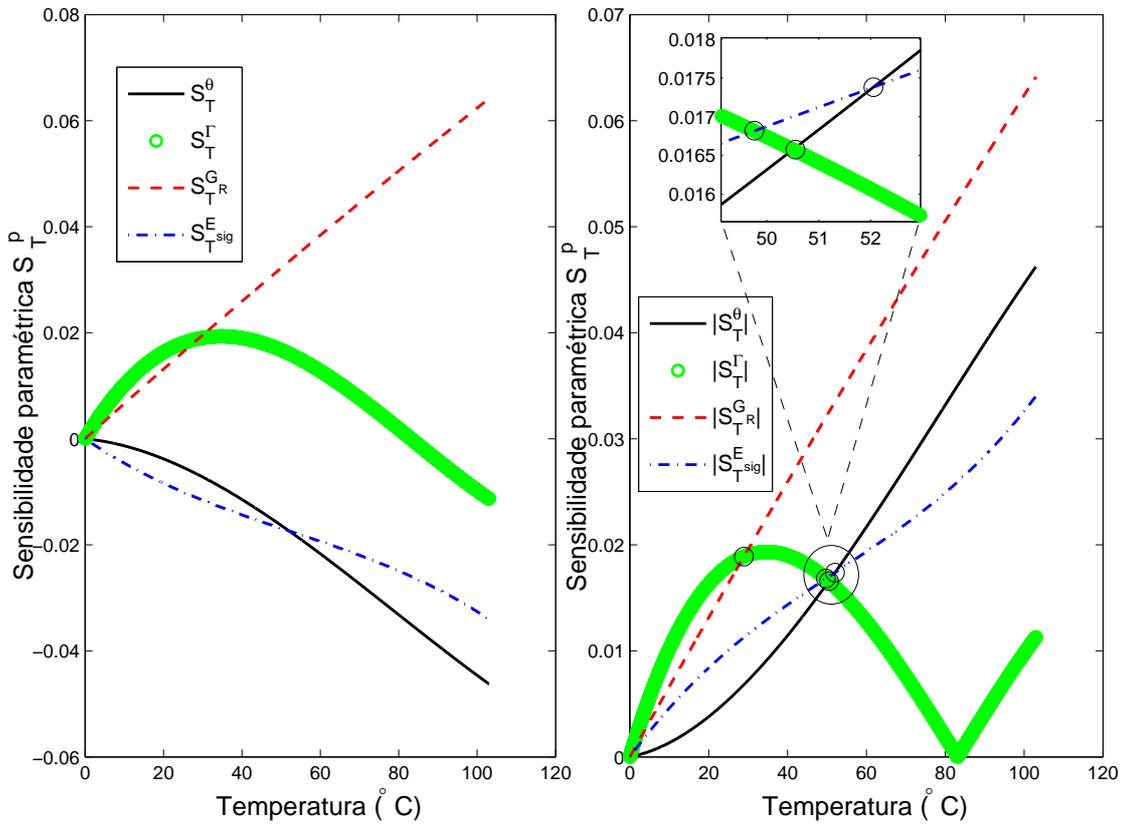


Figura 3.12: Influência da temperatura no valor da assimetria da curva  $G_R$

Para comparar a influência da temperatura nos parâmetros analisados, utilizou-se a sensibilidade relativa calculada através da equação 3.28.

$$S_T^p = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \left\{ \frac{\frac{\Delta p}{p}}{\frac{\Delta T}{T}} \right\} = \frac{T}{p} \frac{\delta p}{\delta T} \quad (3.28)$$

Os comportamentos das sensibilidades relativas de cada parâmetro em função da temperatura estão ilustrados na Figura 3.13.


 Figura 3.13: Variação relativa dos parâmetros  $\theta_{res}$ ,  $\Gamma$ ,  $G_R$  em função da temperatura

Pode-se verificar, na Figura 3.13, que a definição de qual parâmetro é mais sensível depende da temperatura analisada. Os valores de  $\theta_{res}$  e de  $E_{sig}$  apresentam taxas de variação negativa com relação a temperatura. Analisando-se os módulos das sensibilidades determina-se os pontos de interseção entre as curvas. Em temperaturas abaixo de  $28,94^\circ\text{C}$  a largura é o parâmetro mais sensível à variação de temperatura, seguido da assimetria, energia do sinal e por último o ângulo de ressonância ( $|S_T^\Gamma| > |S_T^{G_R}| > |S_T^{E_{sig}}| > |S_T^\theta|$  para  $0^\circ\text{C} < T < 28,94^\circ\text{C}$ ). Para  $28,94^\circ\text{C} < T < 49,76^\circ\text{C}$  a assimetria passa a ser o parâmetro mais sensível com  $|S_T^{G_R}| > |S_T^\Gamma| > |S_T^{E_{sig}}| > |S_T^\theta|$ . A ampliação inserida no gráfico da direita da Figura 3.13 é da região correspondente aos módulos das sensibilidades para  $49^\circ\text{C} < T < 53^\circ\text{C}$ . Essa ampliação foi inserida para visualizar-se a mudança na ordem das sensibilidades com relação a temperatura. Desta forma, pode-se verificar que para  $49,76^\circ\text{C} < T < 50,55^\circ\text{C}$  a energia passa a ser mais sensível do que a largura obtendo-se na ordem  $|S_T^{G_R}| > |S_T^{E_{sig}}| > |S_T^\Gamma| > |S_T^\theta|$ . Para  $50,55^\circ\text{C} < T < 52,05^\circ\text{C}$  a largura se torna menos sensível do que o ângulo de ressonância com  $|S_T^{G_R}| > |S_T^{E_{sig}}| > |S_T^\theta| > |S_T^\Gamma|$ . Para  $T > 52,05^\circ\text{C}$  o ângulo de ressonância passa a ser mais sensível do que a energia do sinal com  $|S_T^{G_R}| > |S_T^\theta| > |S_T^{E_{sig}}| > |S_T^\Gamma|$ .

### 3.3 Caracterização da forma da curva SPR

#### 3.3.1 Determinação da largura da curva

A morfologia do decaimento assimétrico da curva SPR, representada pelos parâmetros  $\Gamma$  e  $G$ , pode ser aproximada por uma função de Lorentz e calculada através das equações de Fresnel para várias camadas. Ambos os parâmetros variam em função da temperatura, da espessura do filme de ouro e do sistema de adsorção selecionado. Isto sugere que a largura total  $\Gamma_{tot}$  e a assimetria  $G_{tot}$  podem ser representadas em função de quatro contribuições independentes de acordo com a equação 3.31. O valor de  $\Gamma_{tot}$  está dentro da faixa  $2,7^\circ < \Gamma_{tot} < 4,8^\circ$ .

$$\Gamma_{tot} = (\Gamma_{Intr} + \Delta\Gamma_T) + \Delta\Gamma_{morf} + \Delta\Gamma_{ads} \quad (3.29)$$

- $\Gamma_{Intr}$  representa a parte intrínseca e independente da temperatura, obtida  $T = 0K$
- $\Delta\Gamma_T$  é a fração dependente da temperatura
- $\Delta\Gamma_{morf}$  corresponde a variação obtida com a morfologia do filme de ouro através da espessura e da rugosidade.
- $\Delta\Gamma_{ads}$  é a contribuição da variação na presença da camada adsorvida ou da solução do analito adjacente.

O valor intrínseco da largura não é exatamente conhecido em  $T = 0K$ . Entretanto  $\Gamma_{Intr}$  pode ser estimado por simulação utilizando o modelo de 3 camadas com as equações de Fresnel. Os resultados obtidos para temperaturas baixas estão ilustrados na Figura 3.14.

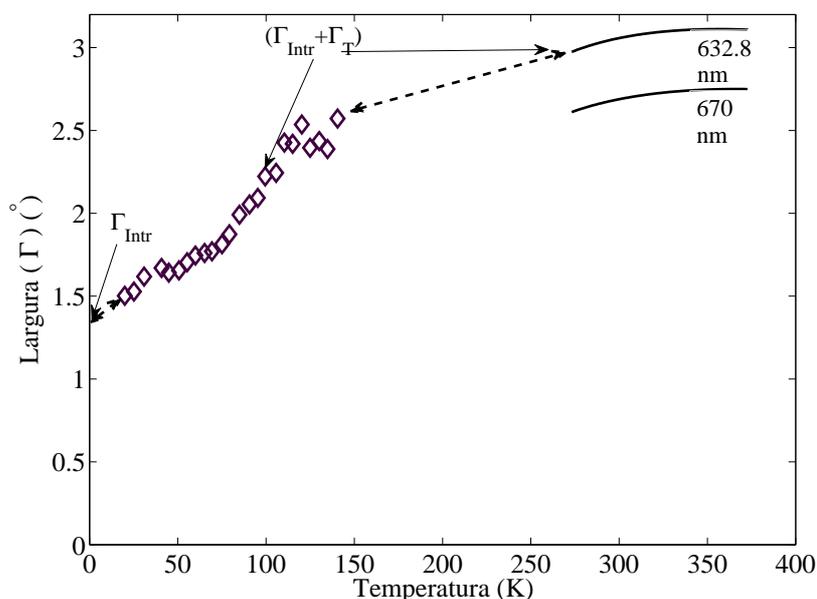


Figura 3.14: Largura  $\Gamma$  em Função da temperatura e determinação da largura intrínseca  $\Gamma_{Intr}$

Na simulação foram utilizados dados termo-óticos dos materiais que compõe o arranjo ótico do sensor, incluindo o valor para água congelada [BROWN et al., 1996]. Na faixa de temperatura de  $20K < T < 140K$ , o valor de  $\Delta\Gamma_T$  diminui até a largura total atingir  $1.4^\circ$  quando  $T = 20K$ . A partir deste ponto utiliza-se uma extrapolação da curva para obter o valor da largura em  $T = 0$ , consequentemente determina-se o valor de  $\Gamma_{Intr}$ . Para o comprimento de onda de  $\lambda = 632nm$  encontra-se  $\Gamma_{Intr} \approx 1,3^\circ$  e para  $\lambda = 670nm$  encontra-se  $\Gamma_{Intr} \approx 1,2^\circ$ .

Para uma temperatura entre  $270K < T < 370K$ , o valor da largura intrínseca combinado com a parte dependente da temperatura ( $\Gamma_{Intr} + \Delta\Gamma_T$ ) aumenta para  $2,75^\circ$  na temperatura de  $370K$  e com comprimento de onda de  $670nm$ . O valor da largura é ligeiramente maior em  $\lambda = 632nm$ . Além disto, a largura angular ( $\Gamma_{Intr} + \Delta\Gamma_T$ ) corresponde, no domínio do comprimento de onda ou energia, a  $90nm$  e  $0,21eV$  respectivamente. Este fato foi similarmente investigado para conjuntos de nano hastes de ouro [QIU et al., 2008]. A seta pontilhada que liga as duas curvas na Figura 3.14 extrapola o comportamento de ambas, porém, indica uma lacuna entre os dois experimentos realizados.

### 3.3.2 Contribuição da morfologia e rugosidade da superfície

A largura da curva foi analisada anteriormente em função da variação da espessura do filme de ouro [NEFF et al., 2006], através de uma simulação utilizando as equações de Fresnel. O comportamento obtido, ilustrado na Figura 3.15, demonstra um aumento de ( $\Gamma_{Intr} + \Delta\Gamma_T$ ) com a diminuição da espessura do filme  $d_2$ .

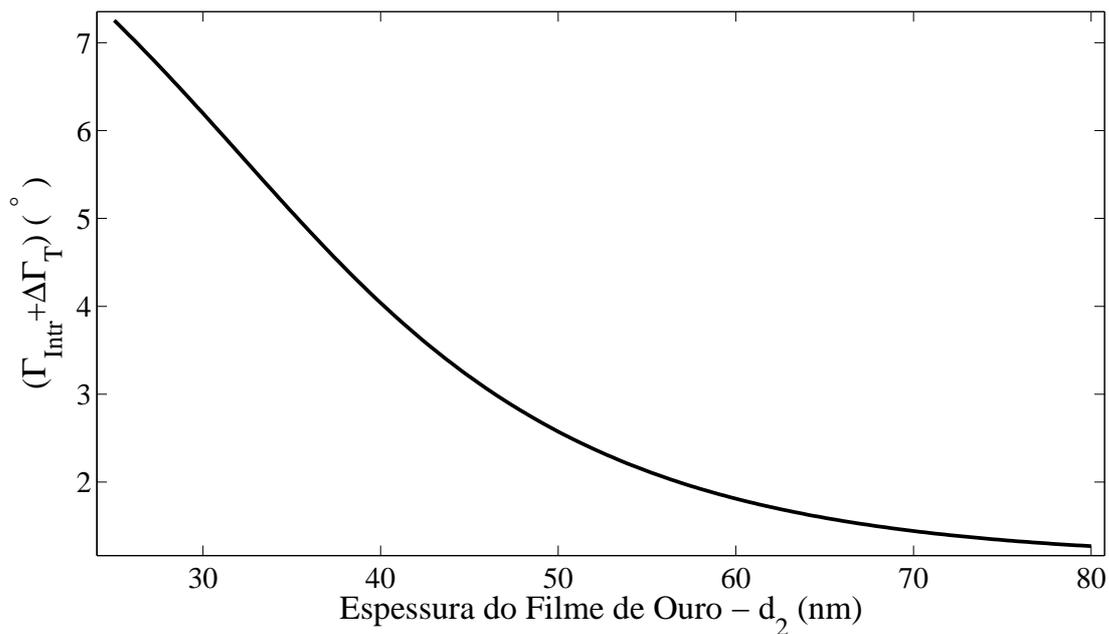


Figura 3.15: Variação da Largura  $\Gamma$  em função da espessura do ouro  $d_2$

Com estes valores pode-se encontrar o módulo da razão entre a largura e a espessura  $S_d$  utilizando a equação 3.30.

$$S_d = \left| \frac{\Delta(\Gamma_{Intr} + \Delta\Gamma_T)}{\Delta d_2} \right| \quad (3.30)$$

O comportamento de  $S_d$ , ilustrado na Figura, é similar ao da largura apresentando uma diminuição do seu valor com o aumento da espessura. Pode-se verificar que para um filme de ouro com espessura de  $50nm$  o valor de  $S_d$  é de  $0,11^\circ/nm$ .

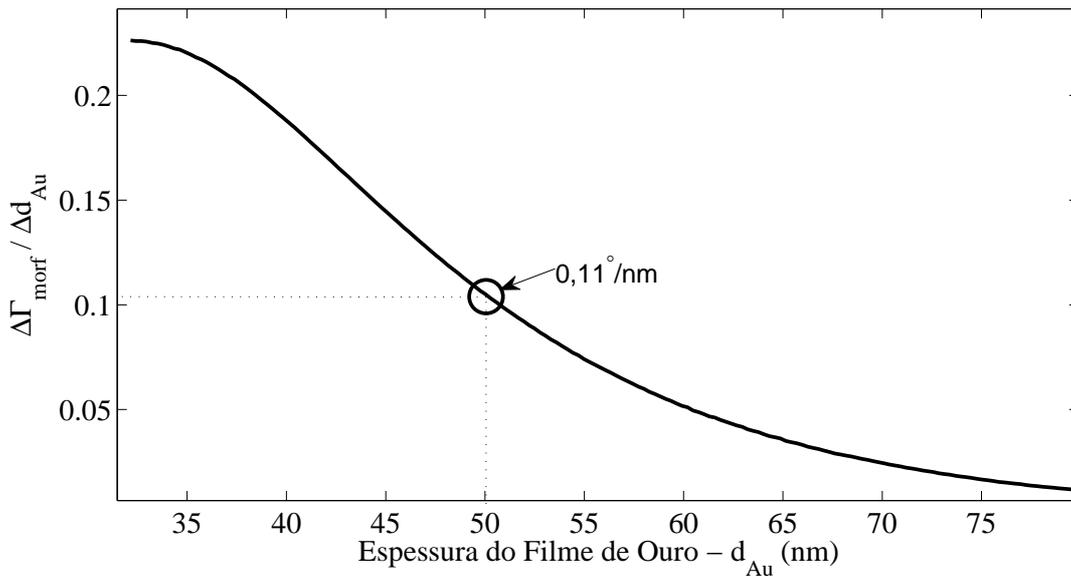


Figura 3.16: Módulo da Razão entre Largura e Espessura  $S_d$

A análise da influência da rugosidade em biosensores SPR é dependente do efeito do espalhamento difuso e especular [FONTANA; PANTELL, 1988]. Neste trabalho, foi realizada uma aproximação para estimar a contribuição da rugosidade da superfície do filme através da equação 3.31.

$$\Delta\Gamma_{morf} = S_d \cdot \rho_{rms} \quad (3.31)$$

onde,

- $\rho_{rms}$  define o valor rms da modulação da espessura do filme ou o parâmetro da rugosidade da superfície

O valor típico de  $\rho_{rms}$  está dentro da faixa de  $3nm$  à  $5nm$  para a maioria dos *biochips* SPR virgens, que nunca foram utilizados e não entraram em contato com substâncias que alterassem a camada de filme metálico. O valor de  $\rho_{rms}$  é determinado experimentalmente através de um perfil de alta resolução da superfície, para os polímeros dos substratos sob consideração, ou

por um microscópio de transmissão eletrônica usando um corte de uma seção transversal. O resultado da imagem do microscópio está ilustrada na Figura 3.17

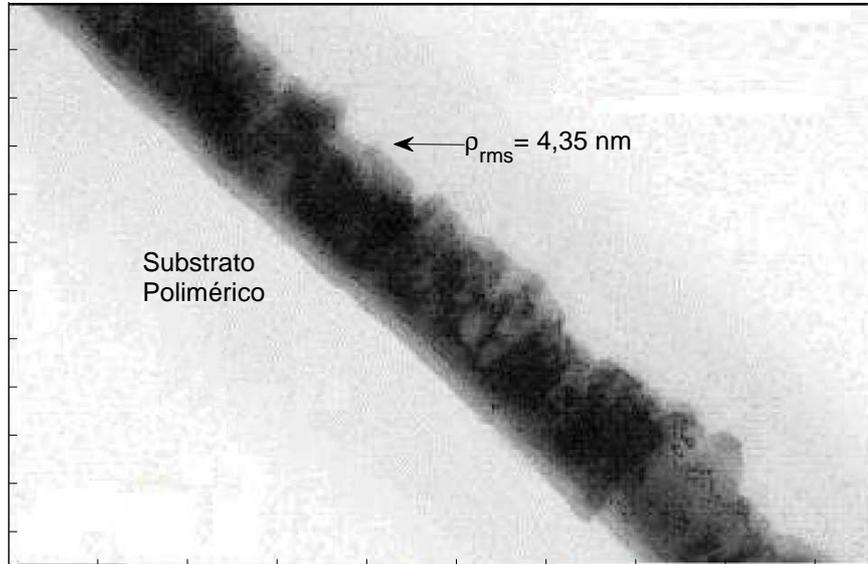


Figura 3.17: Imagem do *biochip* obtida pelo microscópio eletrônico

Pode observar na Figura 3.17 que o valor de  $\rho_{rms}$  para o *biochip* utilizado é de  $\approx 4,35$  nm. Substituindo o valor de  $S_d$  e de  $\rho_{rms}$  na equação 3.31 encontra-se a contribuição da morfologia do filme utilizado para a largura de  $\Delta\Gamma_{morph} = 0,48^\circ$ . Considerando o valor de  $\Delta\Gamma_{morph}$ , além dos valores da largura intrínseca e da variação com a temperatura, a largura total passa a ser  $\Gamma_{tot} = (\Gamma_{Intr} + \Delta\Gamma_T + \Gamma_{morph}) \approx 3,23$ .

Aplicando-se repetidamente uma solução química para a limpar a superfície, o valor da largura aumenta em até  $1,7^\circ$ . Eventualmente estas variações em  $\Gamma_{tot}$  são resultantes da presença de uma fina camada fixada na superfície de ouro ou de variações no analito adjacente, que apresenta índice de refração cujo valor é diferente do índice de refração da água ( $n_{\acute{a}gua} = 1,332$ ).

A modificação causada pela adsorção  $\Gamma_{ads}$  é de até  $\pm 0,6^\circ$ , observadas através de vários ciclos de admissão e remoção e/ou formação da camada respectivamente. Considerações semelhantes podem ser feitas para  $G$ . As diferentes contribuições para  $\Gamma_{tot}$  estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Contribuições individuais para a largura da curva

Largura Total	Intrínseca	Térmica	Morfologia e Rugosidade	Sistema Adsorvido
$\Gamma_{Tot}$	$\Gamma_{Intr}$	$\Delta\Gamma_T$	$\Gamma_{morph}$	$\Gamma_{ads}$
$2,7^\circ - 4,7^\circ$	$\approx 1,2^\circ$	$0^\circ - 1,5^\circ$	$0^\circ - 1,7^\circ$	$0^\circ - \pm 0,6^\circ$

## 3.4 Resultados experimentais

O biossensor utilizado para realização dos experimentos foi desenvolvido anteriormente [SOUZA FILHO, 2006] e utiliza o princípio da interrogação angular. O sinal de referência utilizado foi obtido sem a presença de substância líquida no sensor, ou seja, o ar sendo considerado a substância de referência. A curva SPR é calculada dividindo-se o sinal de imagem pelo sinal de referência armazenado. Cada amostra do sinal foi obtida através da média de 12 quadros do sinal de imagem adquirido. A média é realizada tanto na aquisição do sinal de referência quanto na análise da substância.

O ângulo de ressonância  $\theta_{res}$  é obtido através da técnica do Ajuste Polinomial descrita na seção 3.2.1. Os valores de  $\theta_{Res}$  e de sua intensidade são utilizados na determinação de  $\Gamma$  e  $G$  através do algoritmo definido na seção 3.1. Os valores da energia  $E_{sig}$  e do ruído são calculados de acordo com os procedimentos descritos nas seções 3.1.1 e 3.1.2. O índice de refração efetivo  $n_{eff}$  é calculado utilizando-se a equação 2.5. O valor da variação do índice de refração efetivo  $\Delta n_{eff}$  é calculado em função da mudança obtida em relação ao índice de refração da água ( $n_{gua} = 1,33$ ).

Para validar os conceitos abordados foram realizadas duas séries de experimentos. A primeira tem como objetivo avaliar a viabilidade da utilização dos novos parâmetros propostos. A segunda investiga os efeitos individuais sobre o valor da largura da curva.

### 3.4.1 Adsorção de BSA

Para analisar a qualidade da medição dos parâmetros referentes a morfologia da curva SPR, foi realizado um experimento de adsorção de BSA na formação da monocamada do biossensor. A evolução temporal dos parâmetros analisados compõe o sensorgrama, que para este experimento é composto de 5 etapas:

- inicialmente coloca-se água degaseificada e deionizada para ser analisada pelo equipamento;
- em seguida é colocada uma solução de BSA a 1% em água e espera-se atingir um regime permanente no valor do índice de refração;
- na terceira etapa coloca-se água novamente para remover as ligações fracas de BSA sobre o chip de ouro. Estas ligações são denominadas de ligações reversíveis por serem facilmente removíveis;
- na quarta etapa é colocada uma solução de limpeza com 10% de Hipoclorito e água, para remover a monocamada de BSA. O Hipoclorito é necessário para remover as ligações fortes, denominadas irreversíveis, de BSA com o ouro;

- na última etapa coloca-se novamente água para retirar o hipoclorito e voltar a condição inicial do experimento.

O procedimento de adsorção, ilustrado na Figura 3.18, foi repetido por 5 vezes consecutivas para analisar a reprodutibilidade e evolução das medições. A técnica utilizada para a obtenção do ângulo de ressonância foi o Primeiro Momento.

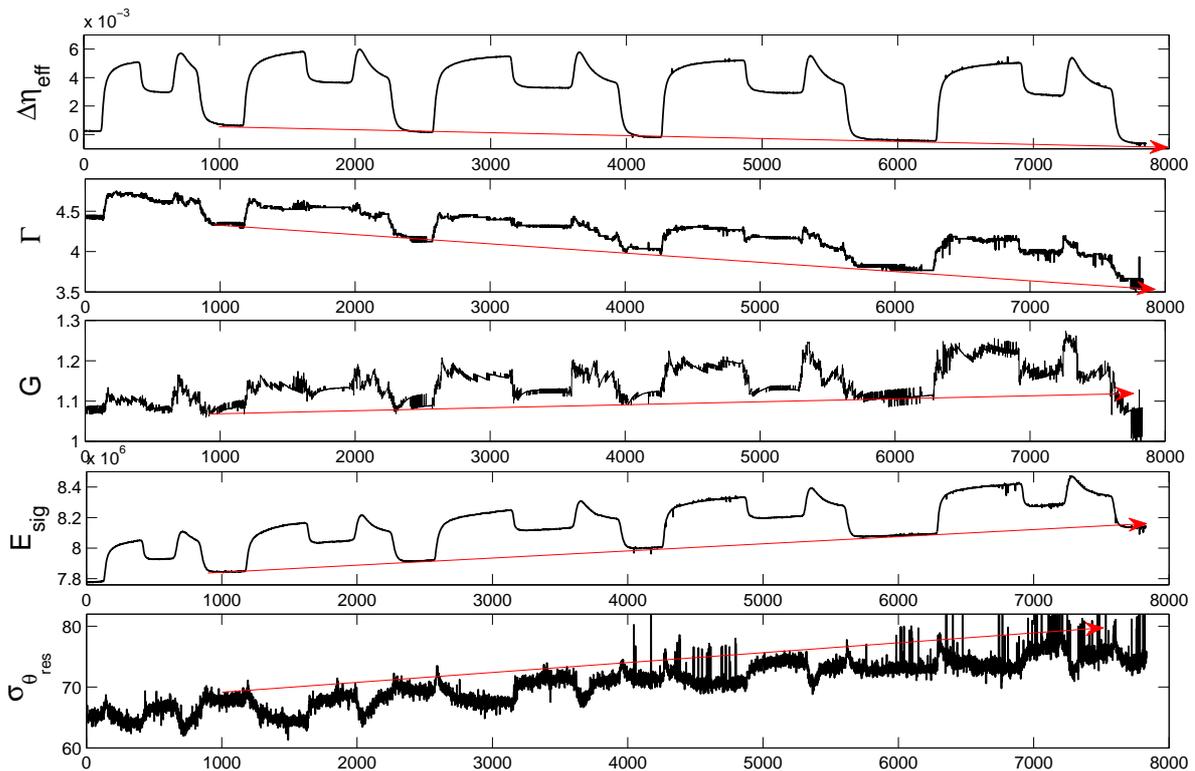


Figura 3.18: Análise do Ciclo de Adsorção de BSA Utilizando o Primeiro Momento

Como verificado na seção 3.2.1, os valores obtidos para  $\Gamma$  e  $G$ , com a utilização do primeiro momento, são fortemente influenciados pelo valor da linha base e da simetria da curva.

Para analisar o comportamento real da morfologia da curva, o ciclo de adsorção de BSA, ilustrado na Figura 3.18, foi recalculado através da utilização do Ajuste Polinomial na determinação dos parâmetros. A curva SPR foi suavizada utilizando-se a técnica da média móvel em cascata por 3 repetições. Através do sinal suavizado foi calculado o ângulo de ressonância  $\theta_{res}$ , a largura  $\Gamma$  e a assimetria  $G_R$ . O comportamento dos parâmetros para o ciclo de adsorção de BSA está ilustrado na Figura 3.19.

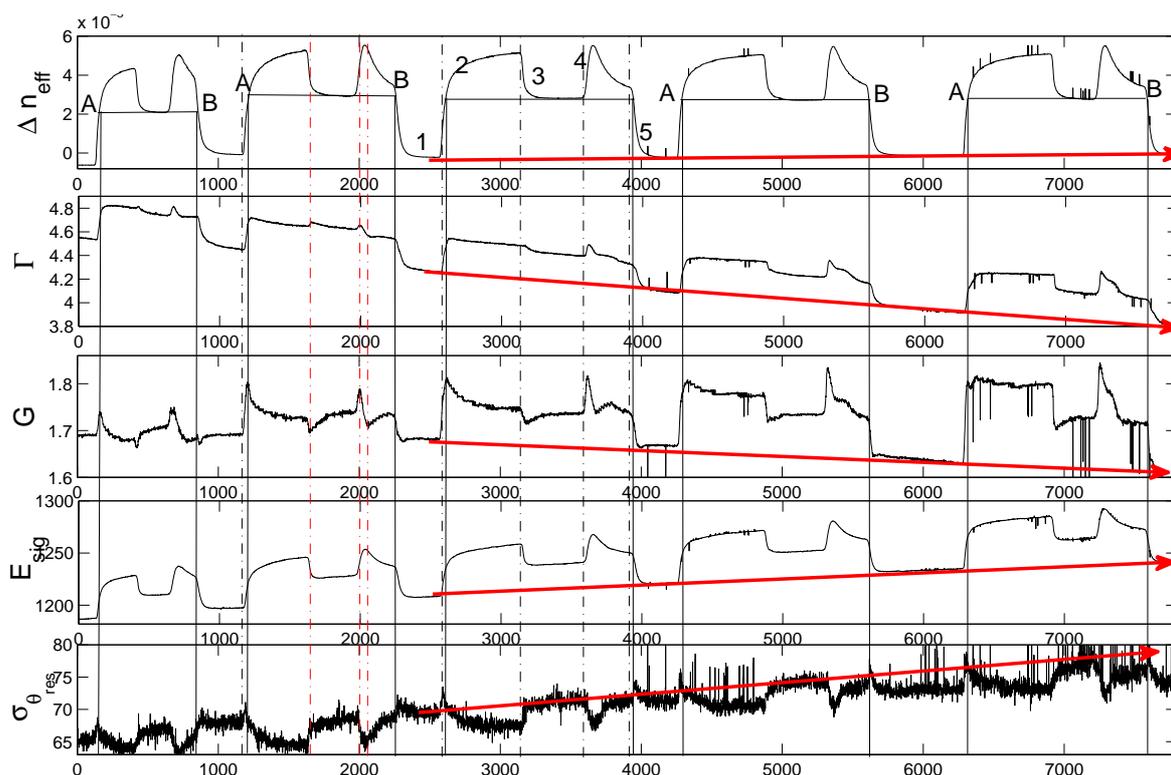


Figura 3.19: Ciclo de Adsorção de BSA Utilizando o Ajuste Polinomial

Verifica-se uma diferença entre os valores da assimetria e da largura para as duas formas de obtenção do ângulo de ressonância. Com o ajuste polinomial o valor de  $G$  é bem mais elevado enquanto que o valor de  $\Gamma$  é ligeiramente superior ao do calculado com o primeiro momento. Outra diferença encontrada é com relação a mudança no valor inicial de cada ciclo. Com a técnica do primeiro momento o valor inicial de  $\Delta n_{eff}$  e de  $\Gamma$  diminui com o decorrer do experimento, enquanto que o valor de  $G$  aumenta. Para o ajuste polinomial o valor  $\Delta n_{eff}$  aumenta ligeiramente, enquanto que  $\Gamma$  e  $G$  diminuem e o de  $E_{sig}$  apresenta um incremento mais acentuado do que  $\Delta n_{eff}$ . Esta variação do valor inicial de cada ciclo dos parâmetros analisados com ajuste polinomial é atribuída à mudança de temperatura de todo o sistema, modificada em função da diminuição na temperatura ambiente ao longo do experimento. Este resultado está de acordo com o comportamento ilustrado na Figura 3.13.

### Discriminação de Ligações Reversíveis e Irreversíveis

Para avaliar as ligações reversíveis e irreversíveis, foi traçada uma reta no ponto que o índice de refração efetivo  $n_{eff}$  atinge um valor estacionário ao final da terceira etapa de cada ciclo. Este ponto indica que as ligações reversíveis foram removidas, pois circulou apenas água durante a terceira etapa. A água é capaz de remover apenas as moléculas de BSA fracamente fixadas. A evolução da variação do índice de refração efetivo, em relação ao índice de refração da água de 1,33, está ilustrada no primeiro gráfico da Figura 3.19.

O aumento do índice de refração efetivo  $n_{eff}$ , durante a segunda etapa do ciclo, indica que as moléculas de BSA estão sendo fixadas na camada de ouro. O ponto A de cruzamento com a reta traçada indica o momento em que é formada a monocamada com as ligações irreversíveis. A partir deste momento o índice de refração continua aumentando, indicando um acréscimo na espessura da camada formada. Porém, as ligações formadas são fracas e facilmente removíveis. As ligações irreversíveis só são removidas após a realização da etapa de limpeza. O instante de remoção da monocamada pode ser verificado no ponto de cruzamento B, quando o valor do índice de refração volta a ser menor do que ao final da terceira etapa.

### **Análise da largura da curva**

A largura da curva obteve um comportamento semelhante ao do índice de refração. Quando a espessura da camada absorvida cresce pode-se verificar que existe um aumento no valor de  $\Gamma$ . Isto indica que o aumento da camada fixada sobre o ouro provoca a adsorção de mais energia da fonte de luz incidente.

Pode-se observar, no gráfico da Figura 3.19, que o valor de  $\Gamma$  atinge o regime permanente mais rapidamente. Este resultado está de acordo com os valores simulados na seção 3.2.1, onde a largura apresentou a maior taxa de variação relativa.

Até o instante da formação da monocamada, marcado pelo ponto A na curva, o valor da largura cresce rapidamente. A partir deste momento verifica-se apenas pequenas variações sobre o valor de  $\Gamma$ , que correspondem à formação das ligações reversíveis que compõem uma camada adicional de BSA. Verifica-se que pouco após o instante em que a água é inserida, representado pela primeira reta pontilhada em vermelho na Figura 3.19, existe a presença de um pico no valor da largura. Este pico também é verificado na mudança para a solução de HPC. Quando as ligações irreversíveis são removidas o valor de  $\Gamma$  decresce rapidamente indicando a diminuição da espessura da camada.

### **Análise da assimetria**

No gráfico da Figura 3.18, a assimetria foi calculada utilizando-se o ângulo de ressonância obtido através do Primeiro Momento. Por esta razão o valor de  $G_R$  acompanha a variação do índice de refração efetivo.

A evolução da assimetria, utilizando-se o ajuste polinomial, está ilustrada no terceiro gráfico da Figura 3.19. O valor de  $G$  apresenta um comportamento de variação negativa em relação às modificações da camada o que está de acordo com os resultados simulados na seção 3.2.1.

Quando a espessura da camada cresce o valor de  $G_R$  diminui, enquanto que a diminuição da espessura provoca um aumento no valor de  $G_R$ . Este comportamento está de acordo com os resultados simulados.

Durante o instante de formação da monocamada pode-se verificar um pico no valor de  $G_R$ . O mesmo fenômeno foi encontrado para o valor da largura. Esta variação abrupta nos valores de  $G_R$  e  $\Gamma$  é atribuída à consolidação da formação da camada. O valor do pico em  $G_R$  pode ser utilizado para detectar previamente o instante da formação da monocamada com as ligações irreversíveis de BSA.

Pode-se verificar a presença de decaimentos no valor de  $G_R$  no gráfico ilustrado na Figura 3.19. Estes decaimentos coincidem com os instantes de remoção de substâncias.

### **Análise da energia**

A energia do sinal obtida apresentou um comportamento ilustrado no quarto gráfico da Figura 3.19. O comportamento obtido é similar ao do índice de refração. A medida que o BSA começa a ser absorvido o valor de  $E_{sig}$  aumenta até o instante que atinge o valor de regime permanente. Quando a camada é retirada o valor da energia diminui.

O valor de  $E_{sig}$  apresentou uma dinâmica invertida com relação aos valores simulados. Apesar deste resultado ser contraditório pode-se verificar que a energia do sinal varia conforme a modificação da camada.

### **Análise do ruído do ângulo de ressonância**

Além dos parâmetros da morfologia da curva foi analisado o ruído sobre o pixel correspondente ao ângulo de ressonância. Cada amostra do sinal da curva SPR foi obtida através da média de 12 quadros do sinal de imagem. A partir desta média foi calculado o valor do ângulo de ressonância  $\theta_{res}$ . O ruído é então calculado pelo desvio padrão do valor do pixel, correspondente ao ângulo de ressonância, para os doze quadros utilizados na obtenção da curva SPR. O comportamento do ruído é ilustrado no quinto gráfico da Figura 3.18.

O ruído apresenta um comportamento inverso ao índice de refração efetivo  $n_{ef}$ . Quando o BSA começa a ser fixado existe um aumento de  $n_{ef}$  enquanto que verifica-se uma diminuição no valor do ruído. No momento que a espessura da camada diminui observa-se um aumento no valor do desvio padrão do ruído.

O comportamento do ruído pode ser atribuído ao fato de que o aumento da espessura da camada sensível provoca o aumento da energia absorvida. Isto faz com que as diferenças causadas por perturbações contribuam menos no efeito SPR, conseqüentemente o ruído obtido é menor. Para espessuras menores a energia necessária para alcançar a condição de ressonância é menor, logo qualquer variação no sinal pode provocar uma alteração significativa na curva SPR.

Outra maneira de se analisar o ruído é através da forma da curva SPR. O valor da largura da curva cresce de acordo com o aumento da espessura da camada fixada. Logo, para pequenas espessuras a largura da curva é pequena o que leva a um decaimento rápido na intensidade da curva. Uma deslocamento horizontal no sinal causaria uma diferença maior na intensidade do

pixel de ressonância do que para larguras maiores. Isto porque comparando-se o sinal do mesmo pixel, para curvas mais suaves a diferença de intensidade é menor.

Outro fato interessante é a observação de um pico do valor do ruído no instante de formação e remoção da monocamada. Este fenômeno pode ser melhor visualizado no gráfico da Figura 3.20, que corresponde a três ciclos do experimento ilustrado na Figura 3.18.

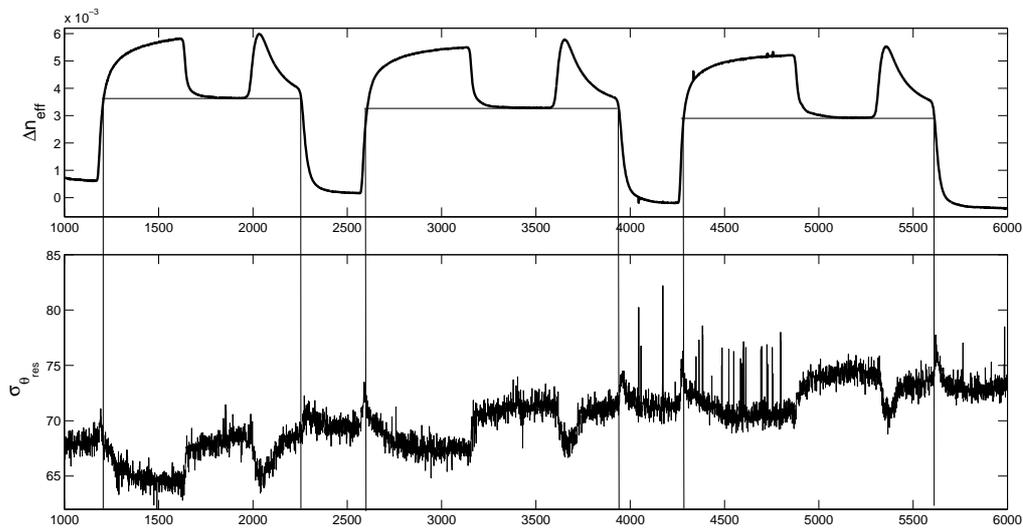


Figura 3.20: Análise do Ruído no Ciclo de Adsorção de BSA

Antes da formação completa da monocamada existe um aumento no nível do ruído mesmo com o aumento da espessura da camada e de  $n_{eff}$ . Após a formação o ruído passa a diminuir enquanto que o valor de  $n_{eff}$  aumenta.

### Reprodutibilidade do ciclo

Uma análise sobre os gráficos da Figura 3.19 revela que o comportamento dos parâmetros é semelhante para todos os ciclos do experimento. Porém, os valores ao final de cada ciclo estão diferentes em relação ao anterior. O índice de refração apresenta uma mudança muito pequena, verificando-se uma variação mais evidente em relação aos valores de  $\Gamma$ ,  $G_R$  e do ruído. Isto não deveria estar acontecendo, uma vez que ao final de cada ciclo a única substância presente no *biochip* é a água.

O valor de  $n_{eff}$  aumenta ligeiramente ao longo do experimento, enquanto que  $E_{sig}$  e o Ruído apresentam um elevação mais acentuada. Os valores da assimetria e da largura apresentam uma diminuição ao final de cada ciclo.

Para verificar se houve mudança em relação à resposta do *biochip*, o equipamento permaneceu ligado durante 2:16 h. Após este período foi obtida uma nova referência. O sensorgrama foi então repetido apresentando o resultado exposto na Figura 3.21.

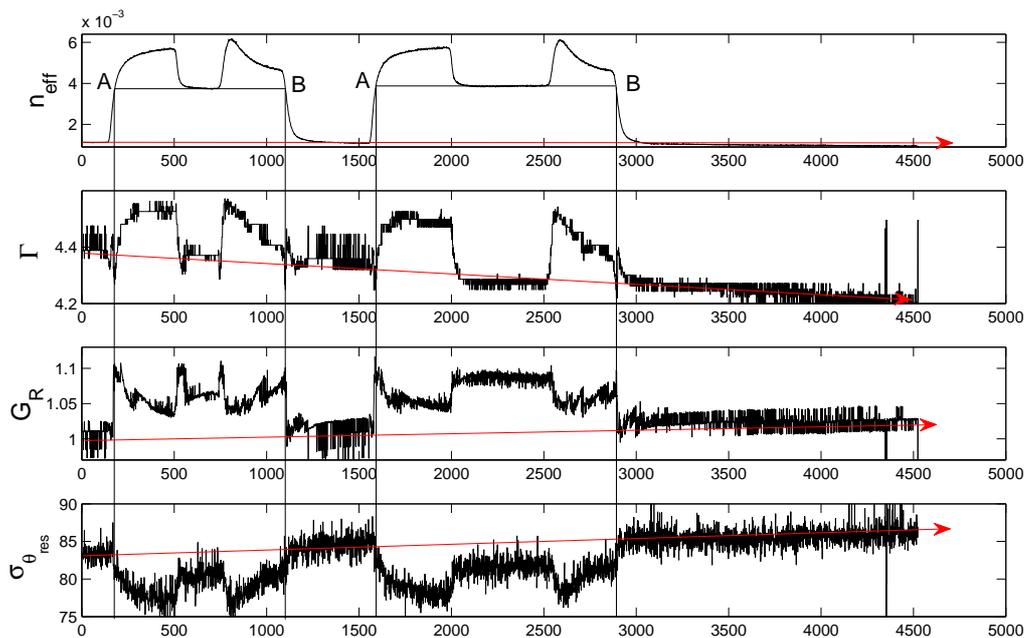


Figura 3.21: Ciclo de Adsorção de BSA 2

Com relação ao comportamento dos parâmetros, pode-se verificar que os valores da Figura 3.21 apresentaram a mesma dinâmica ilustrada na Figura 3.18. Um comportamento peculiar foi encontrado com relação ao valor da assimetria. No instante da formação da camada, indicado pelo ponto A, existe um pico no valor de  $G_R$ . Este pico também pode ser encontrado no instante da remoção da camada B. Para o primeiro ciclo, pode-se verificar claramente que também existe um pico no momento da troca de substâncias. No intervalo após a formação da monocamada e antes da remoção, compreendido entre os pontos A e B, existe uma inversão no comportamento de  $G_R$ . Enquanto o valor de  $n_{eff}$  aumenta o valor de  $G_R$  diminui. Este comportamento não está de acordo com os resultados simulados e verificados no experimento ilustrado na Figura 3.18.

Após a obtenção da nova referência, os valores iniciais dos parâmetros retornam aos valores iniciais do primeiro experimento ilustrado na Figura 3.18. Ao final do primeiro ciclo existe uma diferença muito pequena em relação aos parâmetros, porém ao final do segundo ciclo a diferença é perceptível principalmente na largura e assimetria. Isto demonstra novamente, que a medida que o experimento é realizado existe uma mudança na curva SPR. Esta mudança afeta principalmente a forma da curva, apresentando apenas uma pequena variação no ângulo de ressonância.

A mudança nos parâmetros medidos implica em uma resposta diferente do *biochip* para a mesma substância. Este efeito é atribuído à mudança de temperatura no decorrer do experimento. Analisando a Figura 3.19 verifica-se que o valor de  $\theta_{res}$  no início de cada ciclo aumenta com o decorrer do experimento. Entretanto, os valores de  $\Gamma$  e  $G$  diminuem para cada início de ciclo. Este resultado está de acordo com a variação dos parâmetros para uma diminuição da

temperatura, como pode-se observar na Figura 3.13.

### 3.4.2 Determinação das características individuais de $\Gamma$

Para demonstrar as características representadas, foram realizados experimentos adsorção e fixação, ilustrando o comportamento de  $\Delta\Gamma_{ads}$ . Ao contrário de  $(\Gamma_{Intr} + \Delta\Gamma_T)$ , que é estimada a partir de uma escolha apropriada dos parâmetros termo-óticos dos materiais,  $\Delta\Gamma_{ads}$  varia sensivelmente com as condições experimentais do sistema de adsorção selecionado.

Para os experimentos realizados, foram utilizados como soluto: uma solução de 0,3 M NaClO (Hipo-Clorito HPC) com pH de 13,3; uma solução de álcool etanol diluído em água (EAS) e uma solução de soro de proteína bovina (BSA).

O componente inorgânico HPC é um oxidante de efeito exotérmico elevado e um agente eficiente para limpeza da superfície metálica de ouro. O HPC é aplicado em superfícies bioquímicas para recuperar *biochips* utilizados, sendo adequado para remoção de resíduos orgânicos e de proteínas. Quando diluído em solução aquosa o HPC é dissociado em íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{OH}^{--}$  respectivamente.

Todos os solutos utilizados apresentam algum grau de interação química com a superfície de ouro, o que altera a condição da superfície junto com a co-adsorção de anions na superfície metálica do ouro. O BSA é uma proteína de 66 kD que atua como bloqueante bioquímico que frequentemente é utilizado como referência nos *biochips*.

Os *biochips* da VIR [C.THISTRUP et al., 2004], que operam no modo de interrogação angular, foram utilizados para a realização dos experimentos. A espessura nominal do filme de ouro, determinada através de uma micro-balança de quartzo, é de 50 nm. Sobre o *biochip* é fixada uma célula de fluxo com volume de  $7\mu\text{l}$ , pela qual são injetados as soluções de analitos através de um bomba peristáltica. A taxa de fluxo utilizada foi de  $140\mu\text{l}/\text{min}$ .

Os valores observados inicialmente de  $\Gamma_{tot}$ , para *biochips* novos na presença apenas de água, são entre  $3,2^\circ$  e  $3,5^\circ$ . A diferença em relação a  $(\Gamma_{Intr} + \Delta\Gamma_T)$ , na ausência de adsorção da camada sensível, é atribuída ao efeito da rugosidade da superfície  $\Gamma_{morf}$ . Este efeito eleva o valor de  $\Gamma_{tot}$  de  $\approx 0,5^\circ$  até  $0,8^\circ$ . Estes valores estão condizentes com o valor de  $\Gamma_{morf} \approx 3,23$ , determinado na seção 3.3.2. O valor da assimetria  $G_{tot}$  para chips novos é de  $\approx 1,6$ .

#### Soluções de analito

O primeiro experimento realizado para avaliar o efeito da largura foi através da passagem dos solutos HPC e EAS. Os resultados obtidos, sobre condições de superfície hidrofílica, estão ilustrados na Figura 3.22.

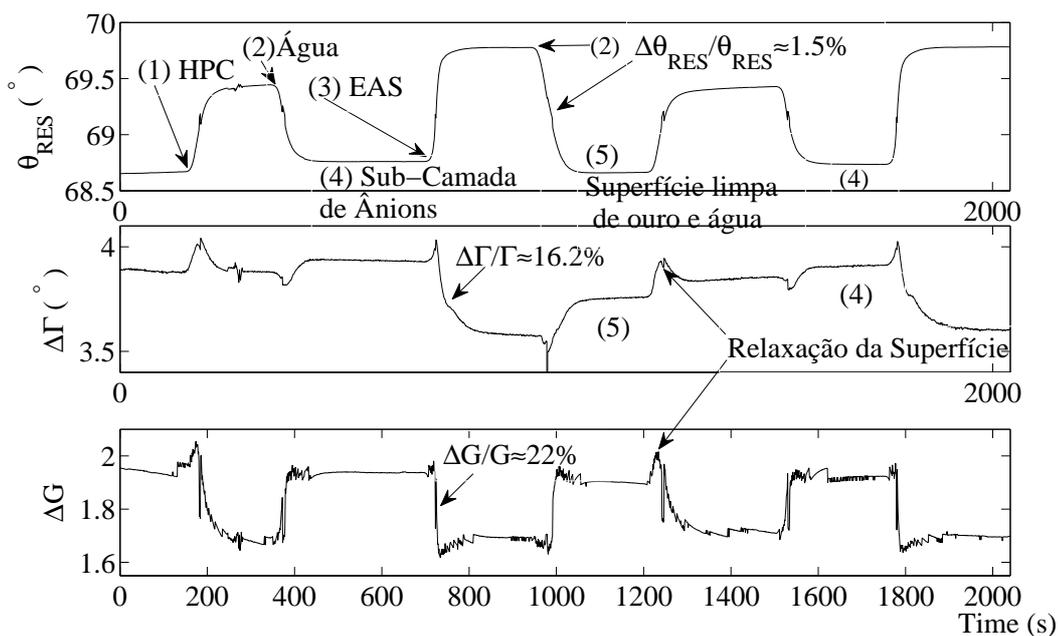


Figura 3.22: Sensorgrama de HPC e EAS

Pode-se observar na Figura 3.22 que houve um aumento aproximadamente exponencial de  $\theta_{res}$  quando inseridas as soluções de HPC e EAS. Uma característica interessante, observada no primeiro ciclo de admissão de HPC, foi uma pequena diferença existente entre o valor inicial de  $\theta_{res}$  e o valor após a passagem da água. Isto é atribuído à presença de uma subcamada de ânions  $\text{ClO}^-/\text{Cl}^-$  na superfície do filme de ouro. A formação da subcamada de ânions, com cobertura de superfície de  $\Phi \approx 0,5$  and  $0,62$  de íons de cloreto e brometo em superfícies orientadas de Au (100), já havia sido observada anteriormente [CUESTA; KOLB, 2000].

Na etapa 3 do experimento realizado, observa-se que a admissão da solução etanol-água gera um incremento de  $\theta_{res}$  ligeiramente superior ao proporcionado pela passagem de HPC. Após a passagem de água o valor de  $\theta_{res}$  retorna ao valor inicial do experimento. Isto indica que a camada de  $\text{ClO}^-/\text{Cl}^-$  adsorvida foi completamente removida, tornando a superfície de ouro limpa no ponto 5 ilustrado na Figura 3.22.

Ao contrário das variações suaves em  $\theta_{res}$ , observadas constantemente para todos os solutos, foram identificadas características acentuadas em  $\Gamma$  e  $G$ . Verifica-se a presença de picos e declives acentuados nas fases iniciais e finais dos ciclos de admissão dos analitos. Todas as características observadas são completamente reproduzidas nas condições de superfície hidrofílica, como pode ser observado com a repetição dos ciclos ilustrada na Figura 3.22.

Um fato ainda mais interessante é o decaimento acentuado identificado em  $\Delta\Gamma_{ads}$ , quando a superfície de ouro foi exposta a solução de etanol-água. Este fato não é verificado na passagem de HPC pela superfície. Da mesma maneira, para todas as soluções, foram encontradas mudanças abruptas no valor de  $G$ .

### Adsorção da monocamada de proteína

Os efeitos sobre a forma da curva SPR, resultantes da imobilização/adsorção de proteína no filme de ouro e da remoção desta camada com a inserção de HPC, foram investigados através do experimento de imobilização de BSA ilustrado na Figura 3.23. Um conjunto de três ciclos consecutivos foram realizados indicando a reprodutibilidade do comportamento.

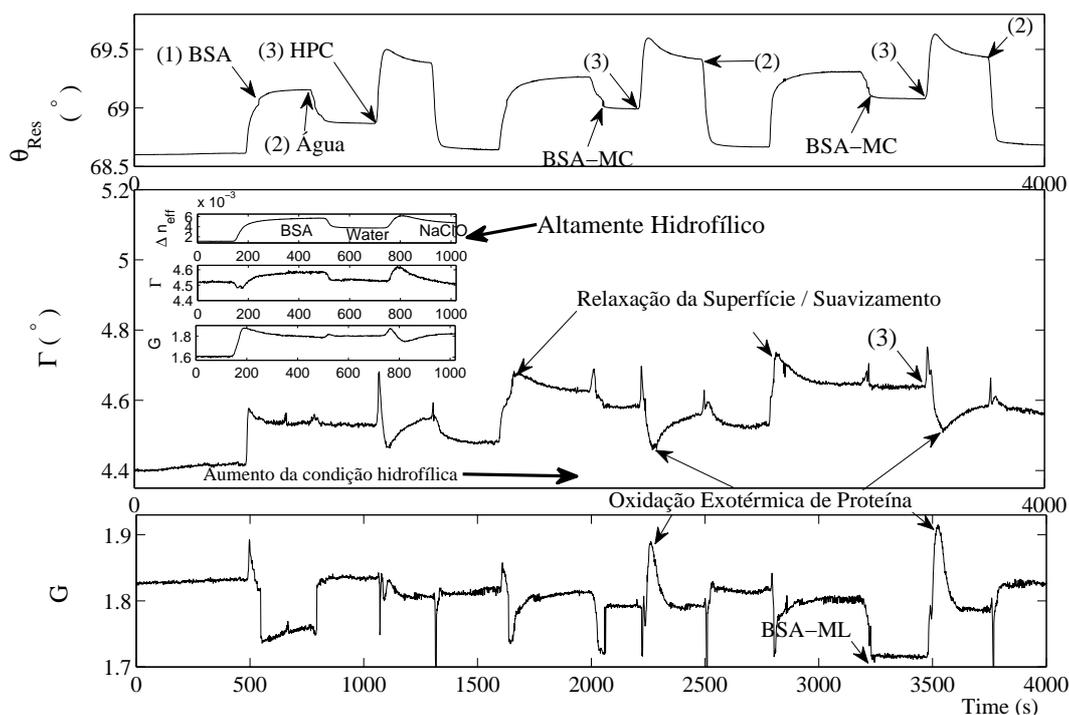


Figura 3.23: Análise do Ciclo de Adsorção de BSA

Para comparação, o gráfico inserido na Figura 3.23 ilustra as características de adsorção de uma superfície que está inicialmente em um estado hidrofóbico. Os dados obtidos para um chip novo estão de acordo com resultados previamente obtidos para a imobilização da Albumina de Soro Humano (HSA) no filme de prata (Ag) [PERNER et al., 1998].

Comparando com os resultados ilustrados na Figura 3.22, o ângulo de ressonância  $\theta_{res}$  aumenta exponencialmente com pequenas variações em todos os três ciclos. Entretanto, verifica-se no comportamento de  $\Gamma$  e  $G$  o aparecimento de estruturas cada vez mais nítidas a medida que a superfície de ouro se torna mais hidrofílica. Pode-se observar o surgimento de picos no valor de  $\Gamma$  e  $G$  no momento da formação da monocamada de BSA. A remoção da camada é realizada com a passagem da solução de HPC o que provoca o surgimento de declives abruptos no valor de  $\Gamma$  e de  $G$ .

A interação da proteína com o oxidante HPC gera o aparecimento de um pico acentuado no valor de  $G$  que pode ser visualizado na Figura 3.23. Este pico é atribuído ao aumento de temperatura na interface da proteína com o ouro, devido à reação de oxidação exotérmica entre a camada de proteína e a solução de HPC.

As variações relativas observadas em  $\Gamma$  e  $G$  são inesperadas e claramente excedem as encontradas para  $\theta_{res}$ . A No experimento ilustrado na Figura 3.22 o valor encontrado para o ângulo de ressonância foi  $\Delta\theta_{res}/\theta_{res} \approx 1.5\%$ , enquanto que a forma da curva foi alterada em  $\Delta\Gamma_{ads}/\Gamma \approx 16.2\%$  e  $\Delta G_{ads}/G \approx 22.2\%$ . Estes valores diferem dos resultados simulados através das equações de Fresnel que apresentam variações relativas menores com valores  $\Delta\Gamma/\Gamma \approx 4.8\%$  e  $\Delta G/G \approx -1.5\%$ . Além disso, uma notável diferença aparece entre o comportamento estático de  $\theta_{res}$  e as propriedades altamente dinâmicas de  $\Gamma$  and  $G$ . Ao contrário do caso hidrofóbico, isto aponta para uma influência muito forte das condições de superfície e outros mecanismos de efeito na massa do soluto. Pode-se listar alguns fatores que devem estar envolvidos para determinar  $\Delta\Gamma_{ads}$  e  $\Delta G_{ads}$ :

1. **Efeitos do Analito:** fica evidente na Figura 3.22 que a solução de etanol-água provoca um decaimento drástico em  $\Delta\Gamma_{ads}$  comparado com o gerado pela admissão de HPC ou mesmo da água, revelando variações positivas. Este efeito pode se originar da natureza específica do soluto, que no etanol apresenta uma característica polar, resultando em anisotropia molecular próximo aos alinhamentos de superfície. Outro fator que influencia são variações locais nas propriedades dielétricas do soluto.
2. **Relaxação da Superfície:** a formação de picos acentuados e decaimentos lentos identificam a presença do processo de relaxação. Mudanças reversíveis da função dielétrica da superfície de ouro na presença de uma camada adicional e/ou do analito podem influenciar o aparecimento destas características.
3. **Rugosidade da Superfície:** consecutivas exposições da superfície de ouro à soluções de limpeza podem provocar rugosidade na superfície.
4. **Efeitos Térmicos:** reações de oxidação exotérmica na superfície geram efeitos calorimétricos. Estes efeitos estão associados aos picos acentuados nos valor de  $G_{ads}$ , ilustrados na Figura 3.23c, que ocorrem após a admissão da solução de HPC.

### 3.5 Conclusões

Este capítulo apresentou a definição dos novos parâmetros propostos para análise do sinal de biossensores SPR. A análise morfológica da curva SPR foi definida através do monitoramento da largura  $\Gamma$  e da Assimetria  $G$  da curva.

O ruído e a energia do sinal bruto foram sugeridos como alternativa mais simples para análise do sinal, pois podem ser obtidos diretamente do sinal bruto. Isto evita a obtenção do sinal de referência e a divisão do sinal da substância pela referência para obtenção da curva SPR, o que diminui a complexidade computacional.

Para avaliar os parâmetros propostos foi realizado um estudo da sensibilidade em relação a variação da espessura e do índice de refração da camada sensível, além da variação com relação a temperatura. A largura e a energia do sinal demonstraram ser mais sensíveis à variação da espessura e do índice de refração da camada sensível do que o ângulo de ressonância.

A sensibilidade paramétrica foi avaliada com relação a técnica utilizada para obtenção do ângulo de ressonância. Nesta análise verificou-se que os valores e o comportamento de  $\Gamma$  e  $G$  podem ser fortemente alterados em função da técnica utilizada. Utilizando-se o primeiro momento verifica-se que os valores calculados dependem fortemente da assimetria da curva e do valor da linha base utilizado.

Com relação à temperatura verifica-se que a sensibilidade depende da faixa de temperatura analisada. Para temperaturas abaixo de  $28,94^\circ C$  a largura é o parâmetro mais sensível à temperatura seguido de  $G$ ,  $E_{sig}$  e  $\theta_{res}$  respectivamente. Para temperaturas abaixo de  $50,55^\circ C$  o ângulo de ressonância é o parâmetro menos sensível à variação de temperatura.

Além disto foram identificadas e descritas as contribuições individuais de cada fator na determinação do valor da largura da curva. As influências da temperatura, da rugosidade, e da adsorção de substâncias foram analisadas através de simulações e de dados experimentais. Desta forma determinou-se as faixas de valores para cada contribuição individual.

A influência com relação a temperatura foi obtida através de simulações realizadas a partir das equações de Fresnel e de dados termo-óticos dos materiais que compõe o *biochip*. Verificou-se que a largura da curva aumenta com o aumento da temperatura, determinado pela elevação de  $\Gamma_T$ . Através da extrapolação da curva obtida para a temperatura obteve-se o valor intrínseco e independente da temperatura para a largura da curva  $\Gamma_{Intr}$ .

Foi identificada a influência da rugosidade da superfície no valor da largura  $\Gamma_{morf}$  expressa pela equação 3.31. O valor de  $\Gamma_{morf}$  é inversamente proporcional a espessura do filme de ouro e diretamente proporcional ao parâmetro de rugosidade  $\rho_{rms}$ . Para o *biochip* utilizado a influência da rugosidade é de  $0,48^\circ$ .

A adsorção de substâncias na superfície de ouro causam uma alteração no valor da largura da curva determinada pelo valor de  $\Gamma_{ads}$ . A influência da adsorção é verificada após a realização de ciclos consecutivos de limpeza.

# Capítulo 4

## Análise do sinal e ruído em biossensores SPR

As principais características de performance de biossensores SPR são a sensibilidade, resolução, linearidade, acurácia, reprodutibilidade e faixa dinâmica [PILIARIK; HOMOLA, 2009].

A resolução do sensor define a menor mudança do índice de refração que provoca uma variação detectável na saída. A resolução de um biossensor SPR é tipicamente expressa em função do desvio padrão da saída  $\sigma_{so}$  através da equação 4.1 [PILIARIK; HOMOLA, 2009].

$$\sigma_{RI} = \frac{\sigma_{so}}{S} \quad (4.1)$$

sendo S a sensibilidade do sensor a mudança do índice de refração.

A resolução do sensor é influenciada pelo número de *pixel* do fotodetector, apresentando um comportamento que depende do algoritmo de detecção do ângulo de ressonância utilizado e que pode variar de acordo com a posição do decaimento da curva SPR [JOHANSEN et al., 2000].

Apesar de um número maior de *pixels* possibilitar uma maior resolução do sinal de imagem, existem estudos que demonstram que um detector com um número pequeno de *pixels* de baixo ruído pode superar um detector de vários *pixels* e mais ruidoso [GNENNINGER; PILIARIK; HOMOLA, 2002].

Outro fator que influencia fortemente a resolução é a técnica de detecção utilizada, que pode conter partes móveis ou elementos fixos [JOHANSEN et al., 2000].

A acurácia da medição não pode ser melhor do que a resolução. A precisão da medição é dependente da variação estatística, ou seja do ruído presente no sinal [JOHANSEN et al., 2000].

Existem muitas fontes de variação na medição de saída de um biossensor SPR, incluindo mudanças reais no índice de refração causadas por variações de temperatura, *drifts* provocados por instabilidade mecânica ou térmica e ruído causado pela fonte de luz, pelo fotodetector e componentes eletrônicos [GNENNINGER; PILIARIK; HOMOLA, 2002].

O tipo de ruído predominante depende da configuração utilizada e pode ser minimizado de acordo com as técnicas de processamento e análise empregadas.

## 4.1 Modelo sugerido

Para analisar o comportamento do sinal e do ruído em um biossensor SPR, sugere-se a análise de cada componente do biossensor que pode ser representado através do diagrama de blocos da Figura 4.1.

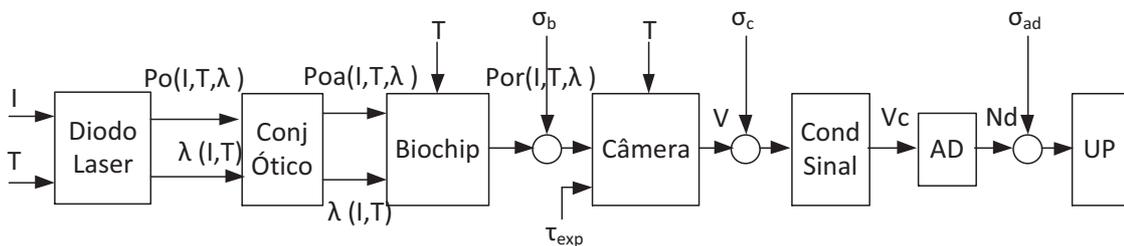


Figura 4.1: Diagrama de Blocos de um Biossensor SPR para Análise do Sinal e Ruído

Nos biossensores com interrogação angular, a fonte de luz utilizada geralmente é um diodo *laser* ou um LED. A potência ótica ( $P_o$ ) da saída da fonte de luz depende do nível de corrente utilizado para alimentá-la. Além disso, a intensidade de luz gerada por um diodo *laser* é fortemente dependente da temperatura. O espectro de comprimentos de onda gerado pelo diodo *laser* também é afetado pelos valores da corrente de injeção e temperatura.

A luz gerada é direcionada até o *biochip* através de um conjunto ótico formado por lentes com possibilidade de utilização de um polarizador. No conjunto ótico o feixe de luz é colimado e focado de acordo com as especificações do *biochip*. Durante o trajeto até atingir o *biochip* a luz pode sofrer influência da variação do meio ou alterações causadas por interferência da parte ótica.

Após atingir o *biochip* a luz é refletida e captada por uma câmera ou fotodetector. A luz incidente ( $P_{oa}$ ) não é totalmente refletida pois existe a absorção causada pela ressonância de plasmons e as perdas existentes por refração e no próprio *biochip*. Logo a potência ótica refletida ( $P_{or}$ ) é diferente de  $P_{oa}$ . A luz refletida é influenciada pela temperatura que pode causar variações estruturais no *biochip* alterando a posição dos feixes refletidos. A temperatura altera o índice de refração do metal e do dielétrico modificando a condição de ressonância e toda a função de transferência do transdutor [MOREIRA et al., 2008]. A luz refletida sofre a influência de ruído causado principalmente por oscilações de temperatura denominado de  $\sigma_b$ .

A luz captada pela câmera é convertida em um sinal de tensão proporcional a intensidade de luz incidente em cada *pixel*. A eficiência da câmera é influenciada pela temperatura que diminui

ou aumenta a quantidade de fótons absorvida por cada fotodetector. Isto altera o nível de tensão na saída da câmera que pode ser modificado também em função do tempo de integração ou exposição utilizado na aquisição da imagem ( $\tau_{exp}$ ). O ruído causado pela câmera ou fotodetector é denominado de  $\sigma_c$ .

O sinal elétrico gerado pela câmera passa por um condicionador de sinal onde pode ser amplificado e filtrado e em seguida é convertido em um sinal digital. A conversão para digital gera um ruído denominado de  $\sigma_{ad}$ . O sinal digital de cada *pixel* ( $Nd$ ) é um número que é armazenado e processado por uma unidade de processamento (UP).

### 4.1.1 Influência da temperatura

A temperatura determina o nível do ruído térmico gerado nos circuitos eletrônicos, principalmente no fotodetector utilizado e no diodo *laser*. Variações da temperatura podem afetar o ruído correlacionado no foto detector [CHINOWSKY et al., 2007]. Além disto, o índice de refração da solução analisada e da camada sensível também é afetado pela temperatura.

A temperatura influencia na fixação e interação de moléculas, além de interferir na determinação das constantes de associação e dissociação [NAIMUSHIN et al., 2003a].

Para tentar minimizar o efeito da temperatura alguns biossensores utilizam mais de um canal para analisar a substância. A medição sobre canais de referência permite a compensação do efeito da temperatura. Outra maneira de reduzir a influência da temperatura é incluir o seu valor no cálculo do índice de refração.

O controle preciso da temperatura é extremamente importante, pois ela afeta vários parâmetros que influenciam diretamente na qualidade da medição. Desta forma é imprescindível o projeto de um controlador preciso para manter o comportamento do sistema independente do local onde está sendo utilizado.

Usualmente se controla apenas a temperatura do diodo laser, porém, como a temperatura influencia os demais componentes do sensor SPR é preciso controlar a temperatura de todo o equipamento. O controle de temperatura é feito através de módulos termoeletrônicos que são capazes de resfriar ou aquecer o sistema desejado.

Em um equipamento portátil um controle de temperatura preciso irá consumir um energia considerável diminuindo a autonomia do equipamento. Desta forma, a determinação da influência da temperatura e a compensação do efeito causado possibilita a melhoria na qualidade do sinal medido, redução do custo e maior autonomia para equipamentos portáteis.

### 4.1.2 Influência da fonte de luz

A fonte de luz é afetada por variações na corrente e pela temperatura do diodo *laser*, alterando a intensidade da luz emitida e conseqüentemente, a taxa com que os fótons atingem cada *pixel*

da câmera. Isto influencia no ruído *shot* presente no fotodetector. Uma taxa mais elevada permite a medição em intervalos de tempo menores, diminuindo o valor do tempo de integração e conseqüentemente do ruído associado com a corrente escura. Porém, uma corrente mais elevada no diodo *laser* aumenta a potência dissipada gerando o efeito de autoaquecimento e provocando um maior consumo de energia. Se o nível de corrente for elevado, a simples troca do *biochip* pode causar a saturação da câmera. Isto devido à diferença de eficiência entre estes *biochips*. Em biossensores portáteis o consumo de energia é crítico, o que torna necessária a ponderação entre relação sinal ruído e autonomia do sistema.

As variações de corrente no diodo *laser* afetam fortemente a medição de um biossensor, causando um deslocamento vertical na curva SPR. O método da linha base dinâmica tenta compensar estes deslocamentos, ajustando dinamicamente o valor da linha base de maneira a manter constante a razão entre a área antes e depois da linha base [THIRSTRUP; ZONG, 2005]. Existem outras técnicas que tentam minimizar o efeito da variação de corrente, dentre elas pode-se citar o método da correspondência de similaridade local [OWEGA; POITRAS, 2007], que analisa a similaridade entre os padrões para os sinais de intensidade de luz adquirido para o líquido e para o ar.

A luz gerada pelo diodo *laser* é direcionada através de um conjunto de lentes até o *biochip*. Estas lentes podem gerar uma distorção na largura angular e espectral da luz. As flutuações espaciais e temporais da fonte de luz podem ser reduzidas através de um retardador variável de cristal líquido [CHINOWSKY et al., 2007].

### Modelo do diodo *laser*

O comportamento do diodo *laser* em relação à corrente da região ativa  $I_a$  e variação da temperatura pode ser modelado através das equações de taxa para os portadores de carga  $N$  4.2 e para os fótons gerados 4.3 [BYRNE; KEATING, 1989].

$$\frac{dN}{dt} = \frac{I_a}{qV_{act}} - \sum_{i=-Nm}^{i=Nm} \frac{g_{0i}(T)}{1 + \sum_{i=-Nm}^{i=Nm} \epsilon S_i} (N - N_{tr}(T)) S_i - \frac{N}{\tau_n} \quad (4.2)$$

$$\frac{dS_i}{dt} = \frac{g_{0i}(T)}{1 + \sum_{i=-Nm}^{i=Nm} \epsilon S_i} \Gamma (N - N_{tr}(T)) S_i - \frac{S_i}{\tau_p} + \beta \Gamma \frac{N}{\tau_n} \quad (4.3)$$

onde  $V_{act}$  é o volume ativo da cavidade do *laser*,  $g_{0i}$  é o ganho para cada modo,  $\epsilon$  é o fator de compressão do ganho,  $N_{tr}$  é a densidade de portadores para atingir a transparência,  $\tau_n$  é o tempo de vida para recombinações espontâneas,  $\tau_p$  é o tempo de vida dos fótons,  $\beta$  é a fração de emissão espontânea acoplada no modo *laser* e  $\Gamma$  é o fator de confinamento ótico. A variação com a temperatura é obtida através da modificação dos parâmetros  $g_0$  e  $N_{tr}$  de acordo com as

equações 4.4 e 4.5.

$$g_0(T) = g_{c0} e^{\left(\frac{-T}{T_{oa}}\right)} \quad (4.4)$$

$$N_{tr}(T) = N_{ctr} e^{\left(\frac{-T}{T_{oa}}\right)} \quad (4.5)$$

O ganho para cada modo longitudinal é obtido pela expressão da equação 4.6.

$$g_{0i} = g_0(T) \left(1 - 4 \frac{(\lambda_i - \lambda_0(T))^2}{\Delta\lambda}\right) \quad (4.6)$$

onde  $\lambda_i$  é o comprimento de onda para cada modo,  $\Delta\lambda$  é a largura linear do ganho e  $\lambda_0$  é o comprimento de onda do ganho máximo. O valor de  $\lambda_0$  varia em função da temperatura de acordo com a equação 4.7.

$$\lambda_0(T) = \lambda_{ocw}(T_{cw}) + k(T_D - T_{cw}) \quad (4.7)$$

onde  $\lambda_{ocw}$  é o comprimento de onda de referência com máximo ganho obtido para uma temperatura de referência  $T_{cw}$ ,  $k$  é a mudança linear de  $\lambda_0$  em função da temperatura e  $T_D$  é a temperatura do diodo sob condições dc. O valor de  $T_D$  é determinado através da equação 4.8

$$T_D = T_{sim} + R_{term} V_D I_D \quad (4.8)$$

onde  $T_{sim}$  é a temperatura de operação e simulação,  $R_{term}$  é a resistência térmica entre a fonte de calor e o diodo,  $V_D$  e  $I_D$  são a tensão e corrente no diodo. O valor da tensão no diodo pode ser calculado pela equação do diodo Shockley de acordo com a equação 4.9

$$V_D = I_D R_s + \ln\left(\frac{N}{N_e(T)} + 1\right) \frac{nkT_D}{q} \quad (4.9)$$

onde  $R_s$  é a resistência em série do diodo,  $N$  é a densidade de portadores,  $N_e$  é a densidade de elétrons de equilíbrio. Substituindo-se a equação 4.9 em 4.8 obtém-se o valor para temperatura do diodo em função da corrente expresso na equação

$$T_D = \frac{T_{sim} + R_{term} I_D^2 R_s}{1 - \frac{R_{term} I_D nk}{q} \ln\left(\frac{N}{N_e(T)} + 1\right)} \quad (4.10)$$

Pode-se aproximar a equação 4.10 pela expressão da equação 4.11.

$$T_D = T_{sim} + R_{term} I_D^2 R_s \quad (4.11)$$

A corrente de fuga  $I_L$  é determinada pela equação

$$I_L = I_D C_{leak} \left( e^{\frac{T_D}{T_{ol}}} - 1 \right) \quad (4.12)$$

A corrente que passa pela região ativa  $I_a$  pode ser calculada pela diferença entre a corrente de injeção  $I$  e a corrente de fuga  $I_L$ , de acordo com a equação

$$I_a = I - I_L \quad (4.13)$$

A potência do diodo *laser* pode ser calculada em função do número de fótons produzidos através da equação 4.14 [MENA; KANG; DETEMPLE, 1997].

$$P = S \frac{n_c V_{act} h c}{\lambda \tau_p} \quad (4.14)$$

Utilizando as equações 4.2 a 4.14 foi obtido, através do Matlab, o comportamento da potência ótica do diodo *laser* em função da corrente de injeção  $I$  para temperaturas de  $25^\circ C$ ,  $40^\circ C$  e  $60^\circ C$ . Os valores dos parâmetros utilizados para simulação estão contidos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Parâmetros Utilizados para simulação do diodo *laser* com as equações de taxa

Parâmetro	Valor
$V_{act}$	$0,8427 \times 10^{-16} m^3$
$g_c$	$8,0 \times 10^{-11} m^3 s^{-1}$
$N_{ctr}$	$0,59 \times 10^{23} m^{-3}$
$\tau_n$	$3 \times 10^{-9} s$
$\tau_p$	$0,7 \times 10^{-12} s$
$\beta$	$1 \times 10^{-4}$
$\Gamma$	0,4
$\epsilon$	$2,0 \times 10^{-23} m^3$
$Nm$	9
$\lambda_{ocw}$	$1,3 \times 10^{-6} m$
$k$	$0,083 \times 10^{-9} mK^{-1}$
$\Delta\lambda$	$8 \times 10^{-9} m$
$n$	2
$R_s$	5,6ohms
$T_{ol}$	30K
$C_{leak}$	$2,27 \times 10^{-6}$
$T_{oa}$	100K
$R_{term}$	100ohms
$n_c$	0.449
$c$	$2,99792 \times 10^8$
$h$	$6,626068 \times 10^{-34}$
$q$	$1,60217733 \times 10^{-19}$

O comportamento obtido para potência do diodo *laser* está ilustrado na Figura 4.2.

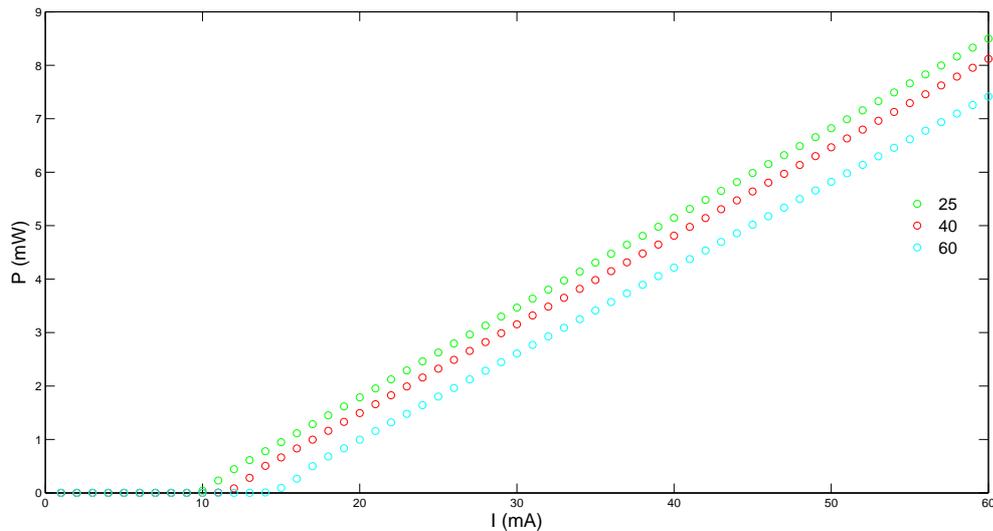


Figura 4.2: Potência do *Laser* em função da corrente de injeção  $I$  para as temperaturas de  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$  e  $60^{\circ}\text{C}$

Pode-se observar que a potência ótica aumenta em função da corrente de injeção, enquanto que para o acréscimo de temperatura existe uma diminuição no valor da potência.

Para correntes de injeção acima da corrente de limiar  $I_{lim}$ , pode-se definir a potência de saída do *laser* de acordo com a equação 4.15 [FERREIRA, 2003].

$$P = \eta \frac{h\nu}{q} (I - I_{lim}) \quad (4.15)$$

onde  $\eta$  é a eficiência quântica externa do *laser*,  $\nu$  é a frequência de radiação,  $h$  é a constante de Planck e  $q$  é a carga do elétron. A corrente de limiar apresenta uma dependência em função da temperatura que pode ser aproximada pela equação 4.16 [MARQUES; SILVA, ; FERREIRA, 2003; BYRNE; KEATING, 1989].

$$I_{lim} = I_0 e^{\left(\frac{T}{T_0}\right)} \quad (4.16)$$

sendo  $T_0$  dependente da estrutura do *laser* e  $I_0$  uma constante.

Considerando o valor de  $I_0 = 21,4\text{mA}$ ,  $T_0 = 156,8497^{\circ}\text{C}$  e  $\eta = 0,5$ , retirados do manual do diodo *laser* S6705MG, foram obtidos os comportamentos para a potência ótica, corrente de limiar e comprimento de onda. O valor de  $P$  e  $I_{lim}$  foram calculados através das equações 4.15 e 4.16. A variação do comprimento de onda foi estimada através do gráfico presente no manual por uma equação de reta, obtida pelos valores dos pontos do gráfico em  $25^{\circ}\text{C}$  com  $\lambda = 670\text{nm}$  e em  $55^{\circ}\text{C}$  com  $\lambda = 675\text{nm}$ . Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4.3.

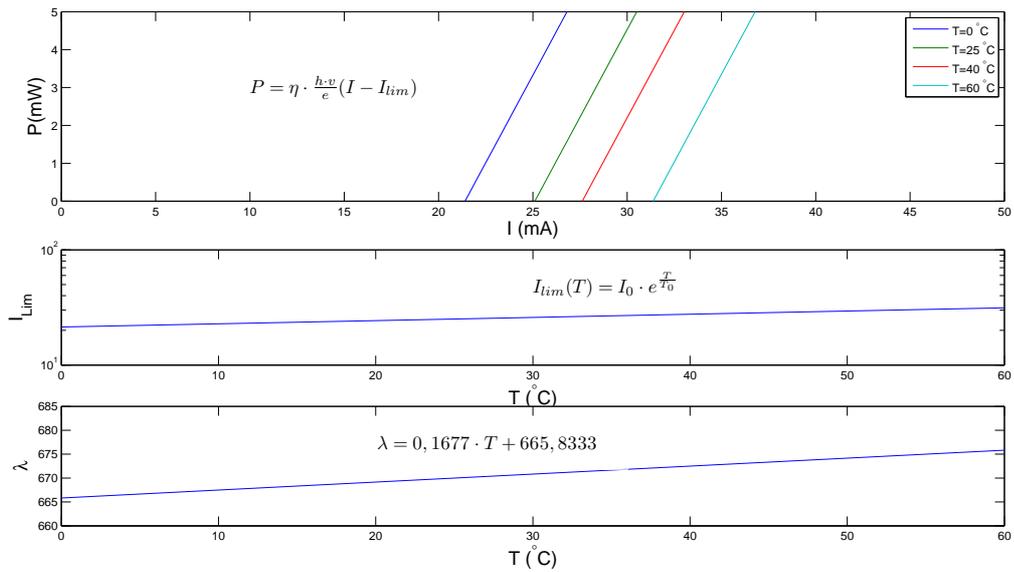


Figura 4.3: Potência do *Laser* em função da corrente de injeção  $I$  para as temperaturas de  $25^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$  e  $60^\circ\text{C}$ . Variação da corrente de limiar  $I_{lim}$  em função da temperatura. Variação do comprimento de onda em função da temperatura.

Com relação a distribuição espacial, o feixe do *laser* apresenta uma densidade de fluxo radial  $I_{rad}$  de comportamento Gaussiano, que pode ser descrito pela equação 4.17 [FERREIRA, 2003].

$$I_{rad} = I_0 e^{-\frac{2r^2}{w^2}} \tag{4.17}$$

onde  $I_0$  é o valor máximo da densidade de fluxo,  $w$  é o raio do feixe e  $r$  é a variável radial. Normalizando o feixe do *laser* em função do valor máximo e considerando-se o raio do feixe de  $10,249\mu\text{m}$ , obtém-se o comportamento ilustrado na Figura 4.4.

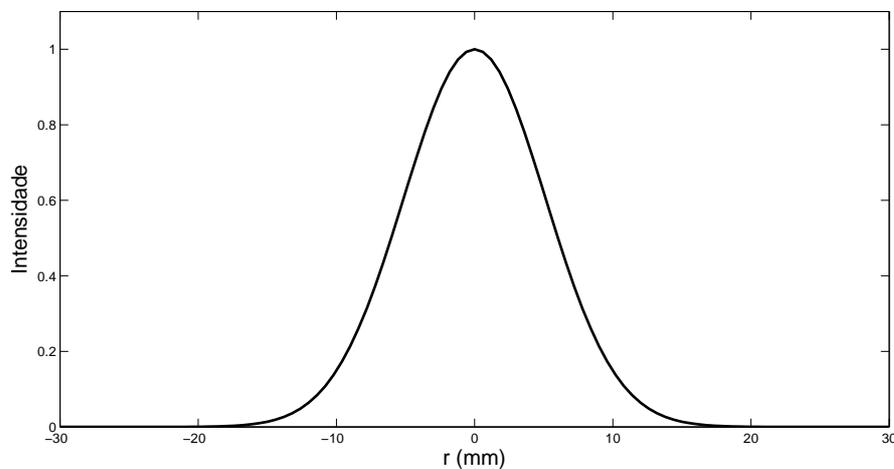


Figura 4.4: Densidade de fluxo radial do feixe de *Laser*

### 4.1.3 Influência do conjunto ótico

O feixe de luz do biossensor precisa ser ajustado para que tenha abertura e foco de acordo com a entrada de luz do *biochip* utilizado. Para expandir um feixe de luz é necessário um arranjo com duas lentes como o ilustrado na Figura 4.5.

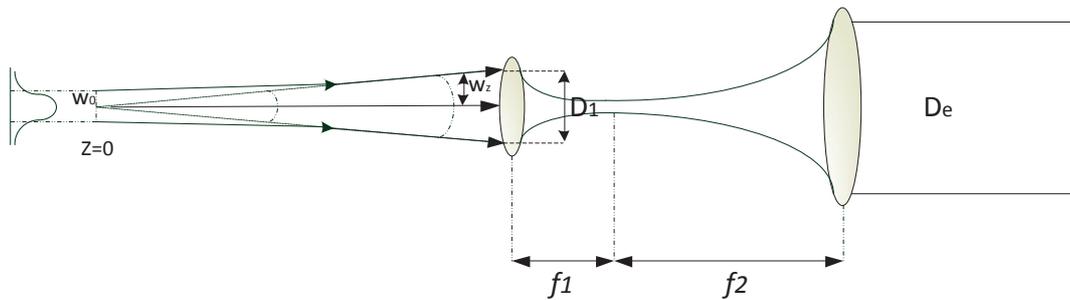


Figura 4.5: Estrutura do Conjunto Ótico para expansão e colimação do feixe de luz

A primeira lente (distância focal  $f_1$ ) foca o feixe inicial que é novamente colimado pela segunda lente, que possui distância focal  $f_2$ . O feixe de luz, com diâmetro inicial  $D_1$ , pode ser expandido para o valor de diâmetro desejado  $D_e$  se a distância focal  $f_2$  for maior que  $f_1$ . A relação de diâmetros pode ser calculada de acordo com a equação 4.18 [FERREIRA, 2003].

$$\frac{D_e}{D_1} = \frac{f_2}{f_1} \quad (4.18)$$

A distância focal das lentes utilizadas depende do índice de refração do material utilizado e das dimensões dos raios de curvatura das superfícies das lentes  $R_1$  e  $R_2$ . O valor da distância focal de uma lente delgada pode ser expresso pela equação 4.19 [FERREIRA, 2003].

$$f = \left[ (n-1) \left( \frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \right]^{-1} \quad (4.19)$$

O índice de refração do material da lente, normalmente vidro, depende do comprimento de onda e sofre variação em função da temperatura. Pode-se determinar a variação do índice de refração absoluto do vidro em função da temperatura pela equação 4.20 [SCHOTT, 2008].

$$\frac{n_{abs}(\lambda, T)}{dT} = \frac{n^2(\lambda, T_0) - 1}{2 \cdot n(\lambda, T_0)} \cdot \left( D_0 + 2D_1\Delta T + 3D_2\Delta T^2 + \frac{E_0 + 2E_1\Delta T}{\lambda^2 - \lambda_{TK}^2} \right), \quad Sellmeir \quad (4.20)$$

onde,

- $T_0$  é a temperatura de referência,
- $T$  é a temperatura em  $^{\circ}C$
- $\Delta T$  é a diferença entre temperatura ambiente e a temperatura de referência
- $\lambda$  é o comprimento de onda em  $\mu m$
- $D_0, D_1, D_2, E_0, E_1$  e  $\lambda_{TK}$  são constantes que dependem do tipo de vidro

Se as lentes forem fabricadas com o mesmo material, elas apresentam o mesmo índice de refração. Logo, utilizando-se o valor de  $f$  obtido na equação 4.19, o valor de  $\eta$  é cancelado na equação 4.18. Desta forma, a relação entre diâmetros do feixe se torna dependente apenas das medidas dos raios das lentes.

Para os biossensores seria ideal que o feixe de luz fosse sempre paralelo, não apresentando variação no seu raio de abertura. Mesmo utilizando-se um *laser* como fonte de luz, o raio do feixe sofre variação a medida que se afasta da cavidade do *laser*. O raio do feixe do *laser*  $w$  pode ser calculado em função da distância  $z$  em relação à cintura do feixe de acordo com a equação 4.21 [FERREIRA, 2003].

$$w(z) = w_0 \left[ 1 + \left( \frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4.21)$$

O diâmetro do feixe de *laser* na cintura  $D_0$  depende do comprimento da cavidade do *laser*  $L$  e do comprimento de onda  $\lambda$ . O valor de  $D_0$  pode ser determinado pela equação 4.22 [FERREIRA, 2003].

$$D_0 = \left( \frac{2\lambda L}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.22)$$

Considerando-se um diodo *laser* com  $L = 250\mu m$  e  $\lambda = 670nm$  a  $T = 20^{\circ}C$ , o valor do diâmetro do feixe na cintura é  $D_0 = 10,326\mu m$ . Admitindo-se que as lentes são feitas do mesmo material a relação entre as distâncias focais das lentes passa a ser uma constante, logo, o diâmetro expandido desejado  $D_e$  pode ser calculado por  $D_e = K \times D_1$ . Se a primeira lente está posicionada logo após o diodo *laser* o valor de  $D_1$  passa a ser igual ao de  $D_0$ . Para o *biochip* da VIR a entrada de luz tem uma largura de  $6mm$ , logo, encontra-se uma relação entre diâmetros do feixe de  $K = 581,0370$ . Utilizando-se os valores mencionados, foi analisado a variação do feixe de *laser* na saída do conjunto óptico causado pela variação de temperatura. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4.6.

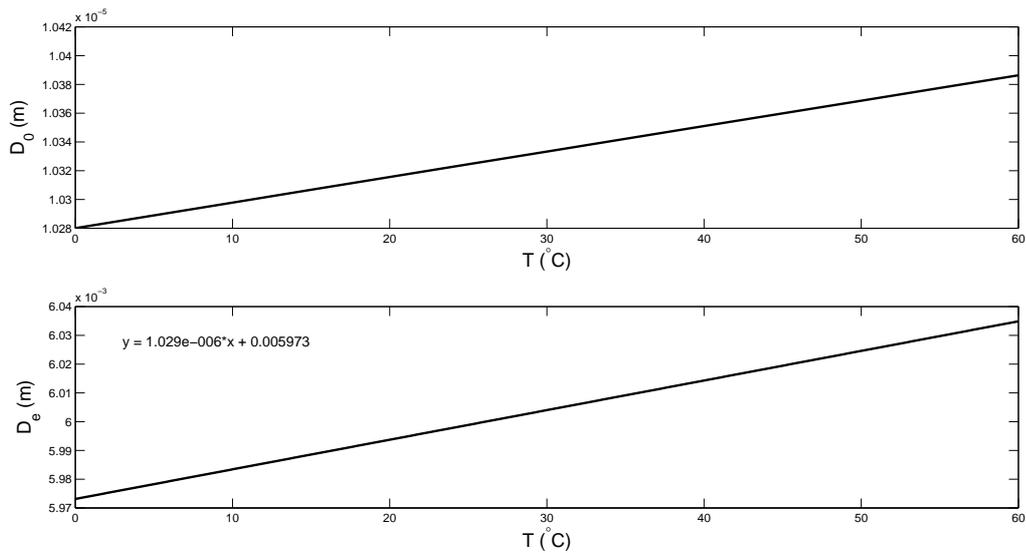


Figura 4.6: Variação da Largura do Feixe do *Laser* em Função da Temperatura

Para efeito de simulação utilizou-se uma variação do comprimento de onda em função da temperatura de acordo com a expressão  $\lambda(T) = 0,23T + 664$  ( $\lambda$  em  $nm$ ). Esta variação é a mesma do diodo *laser* HL6724MG [HL6724MG..., 2008]. A variação do comprimento de onda provoca uma variação no raio do feixe de *laser* como pode ser comprovado pela equação 4.22. Esta variação é então amplificada pelo conjunto ótico em função da relação entre as distâncias focais. Pode-se observar na Figura 4.6 que existe uma amplificação da largura do feixe com o aumento da temperatura. A variação obtida foi de  $1,029\mu m/^\circ C$ , o que é significativa quando comparado ao tamanho do *pixel* que é na ordem de unidades de micrômetros. A câmera utilizada no biossensor utilizado para os experimentos tem um *pixel* de  $7,8\mu m$ .

Pode-se concluir que uma variação positiva da temperatura provoca um aumento no raio do feixe de luz, que é amplificado pelo conjunto ótico. Este aumento no raio do feixe pode gerar uma dilatação da imagem captada com relação ao eixo x. Isto pode levar um deslocamento da posição de ressonância e conseqüentemente alteração no valor da variável de saída calculada pelo biossensor.

#### 4.1.4 Influência do *biochip*

A intensidade de luz refletida pelo *biochip*  $I_r$  depende da intensidade de luz incidente  $I_{inc}$  e do coeficiente de reflexão  $R$ . Considerando que o feixe de luz incidente é alterado em função da temperatura e corrente de injeção, sofrendo variações no seu espectro e comprimento de onda principal, a equação 2.11 pode ser reescrita e calculada pela equação 4.23.

$$I_r(\theta, \lambda, T) = I_{inc}(\theta, \lambda, T) \cdot R(\theta, \lambda, T) \quad (4.23)$$

A luz incidente apresenta intensidade diferente de acordo com a temperatura  $T$ , podendo variar com o comprimento de onda  $\lambda$ . Além disto pode apresentar uma distribuição espacial não uniforme, o que gera valores diferentes para cada ângulo de incidência no *biochip*. De acordo com a equação 2.7, o coeficiente de reflexão depende dos valores dos índices de refração das camadas  $n_i$  e do ângulo de incidência  $\theta$ . Os valores de  $n_i$  são dependentes da temperatura e do comprimento de onda da luz incidente, logo, o valor de  $R$  é em função dos valores de  $\theta$ ,  $T$  e  $\lambda$ .

Os materiais que compõem o transdutor utilizado, descrito na seção 2.2.2, são respectivamente um substrato polimérico Topas, uma camada de metal de ouro e a substância dissolvida em uma solução aquosa. As seções seguintes descrevem a influência do valor de  $T$  e de  $\lambda$  na determinação do índice de refração destes materiais.

### Índice de refração do ouro

Para representar a variação da função dielétrica do ouro ( $\epsilon_o$ ) foi utilizado o modelo de Drude [MOREIRA et al., 2008; OZDEMIR; TURHAN-SAYAN, 2003; SHARMA; GUPTA, 2006]. O valor de  $\epsilon_o$  pode ser determinado de acordo com a equação 4.24.

$$\epsilon_o(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\omega_c)} \quad (4.24)$$

onde  $\omega$  é a frequência angular da onda eletromagnética,  $\omega_p$  é a frequência de plasma e  $\omega_c$  é a frequência de colisão dos elétrons do metal. O valor de  $\omega_p$  é dependente da temperatura e pode ser determinado através da equação 4.25.

$$\omega_p(T) = \omega_{p0}(1 + 3\gamma_e(T - T_0))^{-1/2} \quad (4.25)$$

onde  $\omega_{p0}$  é a frequência de plasma na temperatura de referência  $T_0$ ,  $\gamma_e$  é o coeficiente de expansão linear térmica. A frequência de colisão é influenciada por duas contribuições individuais: o espalhamento fónon-elétron e pelo espalhamento elétron-elétron. O valor de  $\omega_c$  pode ser determinado pela equação 4.26.

$$\omega_c = \omega_{cp} + \omega_{ce} \quad (4.26)$$

O valor de  $\omega_{cp}$  é determinado através do modelo de Holstein de acordo com a equação 4.27.

$$\omega_{cp}(T) = \omega_0 \left[ \frac{2}{5} + 4 \left( \frac{T}{T_D} \right)^5 \int_0^{T_D/T} \frac{z^4 dz}{e^z - 1} \right] \quad (4.27)$$

onde  $T_D$  é a temperatura de Deybe. A frequência de espalhamento elétron-elétron pode ser determinada pelo modelo de Lawrence através da equação 4.28.

$$\omega_{ce}(T) = \frac{\pi^3 \Gamma^* \Delta}{12 h E_F} \left[ (k_B T)^2 + \left( \frac{h \omega}{2\pi} \right)^2 \right] \quad (4.28)$$

onde  $\Gamma^*$  é média sobre a superfície de Fermi da probabilidade de espalhamento (a nomenclatura  $\Gamma^*$  foi atribuída neste trabalho para distinguir do valor da largura da curva  $\Gamma$ ),  $\Delta$  é o espalhamento fracionado,  $E_F$  é o valor da energia de Fermi,  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $h$  é a constante de Planck. Os valores utilizados para simulação estão descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Parâmetros Utilizados no Cálculo do Índice de Refração do Ouro

Parâmetro	Descrição	Valor
$\omega_{p0}$	frequência de plasma na temperatura de referência	$1,1297 \cdot 10^{16} \text{ rad/s}$
$\gamma_e$	coeficiente de expansão linear térmico	$1,42 \cdot 10^{-5} \text{ K}^{-1}$
$T_0$	temperatura de referência	300K
$\omega_0$		$8,459482432208117 \cdot 10^{13} \text{ rad/s}$
$T_D$	temperatura de Deybe	185K
$\Gamma^*$	média sobre a superfície de Fermi da probabilidade de espalhamento	0,55
$\Delta$	espalhamento fracionado	0,77
$k_B$	constante de Boltzmann	$1,38062 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$
$h$	constante de Planck	$1,05458 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$
$E_F$	energia de Fermi	5,51eV

O comportamento da função dielétrica do ouro em função da temperatura foi analisado utilizando-se as equações 4.24 a 4.28, para  $273,16\text{K} < T < 373,16\text{K}$  e  $\lambda = 670\text{nm}$ . Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4.7.

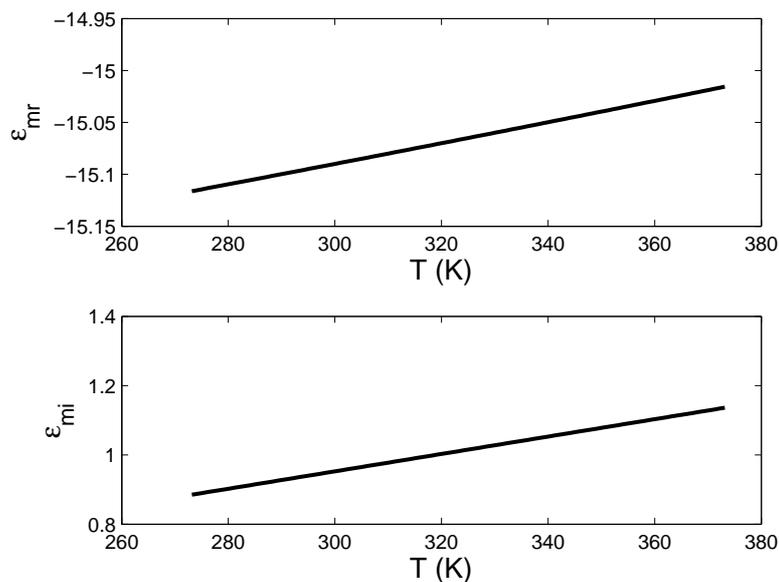


Figura 4.7: Partes real  $\epsilon_{mr}$  e imaginária  $\epsilon_{mi}$  da função dielétrica do ouro em função da temperatura

As sensibilidades com relação a  $T$  para a parte real e imaginária da função dielétrica do ouro foram  $d\varepsilon_{mr}/dT = 0,0010/K$ ,  $d\varepsilon_{mi}/dT = 0,0025/K$ . A análise com relação a  $\lambda$  foi realizada com uma temperatura fixa de  $293,15K$  variando-se o valor de  $\lambda$  na faixa de  $365nm$  a  $1014nm$  em intervalos de  $1nm$ . O comportamento obtido está ilustrado na Figura 4.8.

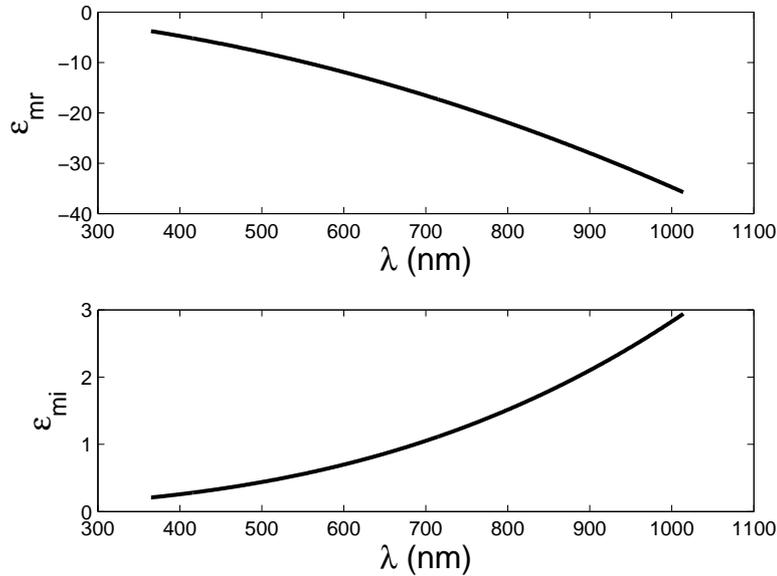


Figura 4.8: Partes real  $\varepsilon_{mr}$  e imaginária  $\varepsilon_{mi}$  da função dielétrica do ouro em função do comprimento de onda

As sensibilidades com relação a  $\lambda$  para a parte real e imaginária da função dielétrica do ouro foram  $d\varepsilon_{mr}/d\lambda = -0,0262/nm$  e  $d\varepsilon_{mi}/d\lambda = 0,0082/nm$ . Isto demonstra uma influência mais acentuada de  $\lambda$  do que de  $T$  para o valor de  $\varepsilon_{mr}$  e  $\varepsilon_{mi}$ .

### Índice de refração da água

O modelo utilizado para representar o valor do índice de refração da água em função da temperatura e comprimento de onda, foi o modelo adotado pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos (NIST) [WAGNER; PRUSS, 2002; HARVEY; GALLAGHER; SENGERS, 1998]. De acordo com este modelo, o valor do índice de refração da água pode ser determinado pela equação 4.29.

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} (1/\bar{\rho}) = \alpha_0 + \alpha_1 \cdot \bar{\rho} + \alpha_2 \cdot \bar{T} + \alpha_3 \cdot \overline{\lambda^2} \cdot \bar{T} + \frac{\alpha_4}{\lambda^2} + \frac{\alpha_5}{\lambda^2 - \lambda_{UV}^2} + \frac{\alpha_6}{\lambda^2 - \lambda_{IR}^2} + \alpha_7 \cdot \bar{\rho}^2 \quad (4.29)$$

Os valores dos coeficientes  $\alpha_0$  até  $\alpha_7$  e das constantes  $\overline{\lambda_{UV}}$  e  $\overline{\lambda_{IR}}$  estão contidos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Parâmetros Utilizados no Cálculo do Índice de Refração da Água

Parâmetro	Valor
$\alpha_0$	0,244257733
$\alpha_1$	$9,74634476 \cdot 10^{-3}$
$\alpha_2$	$-3,73234996 \cdot 10^{-3}$
$\alpha_3$	$2,68678472 \cdot 10^{-4}$
$\alpha_4$	$1,58920570 \cdot 10^{-3}$
$\alpha_5$	$2,45934259 \cdot 10^{-3}$
$\alpha_6$	0,900704920
$\alpha_7$	$-1,66626219 \cdot 10^{-2}$
$\overline{\lambda_{UV}}$	0,2292020
$\overline{\lambda_{IR}}$	5,432937

Os valores da temperatura ( $T$ ), densidade ( $\rho$ ) e comprimento de onda ( $\lambda$ ) são normalizados em função de seu valores de referência  $T^* = 273,15K$ ,  $\rho^* = 1000kg \cdot m^{-3}$  e  $\lambda^* = 0,589\mu m$ . Na equação 4.29 os valores usados para estas grandezas são adimensionais, determinados pelas equações 4.30 a 4.32.

$$\overline{T} = \frac{T}{T^*} \quad (4.30)$$

$$\overline{\rho} = \frac{\rho}{\rho^*} \quad (4.31)$$

$$\overline{\lambda} = \frac{\lambda}{\lambda^*} \quad (4.32)$$

De acordo com a Associação Internacional das Propriedades da Água e Vapor a equação 4.29 é válida nas seguintes condições:

- Temperatura  $-12^\circ C \leq T \leq 500^\circ C$
- Densidade  $0kg \cdot m^{-3} \leq \rho \leq 1060kg \cdot m^{-3}$
- Comprimento de Onda  $0,2\mu m \leq \lambda \leq 1,1\mu m$

O comportamento do índice de refração da água em função da temperatura foi analisado utilizando-se a equação 4.29 para um comprimento de onda de  $670nm$ , dentro de uma faixa de temperatura entre  $273.16K$  e  $372.66K$ . Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4.9.

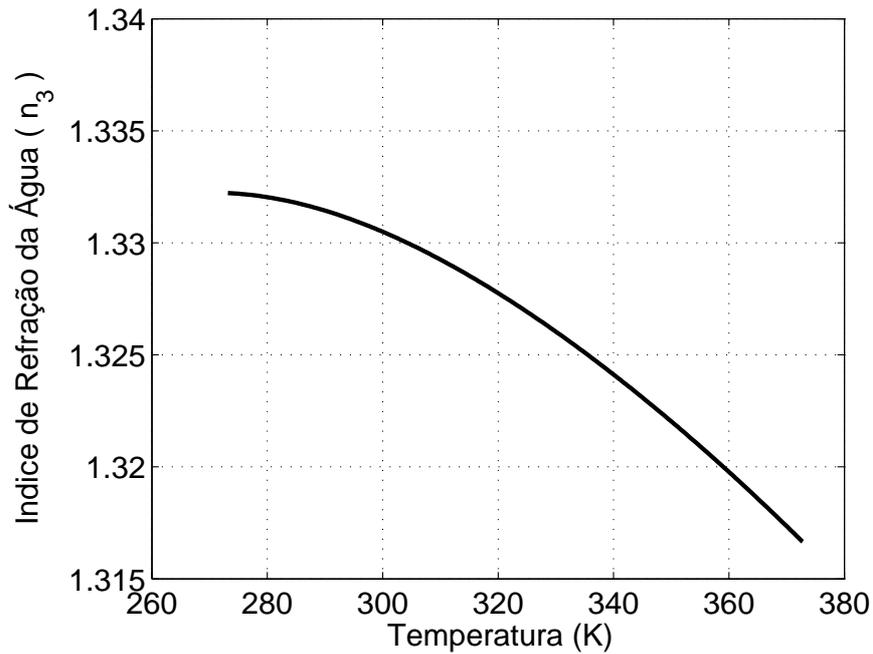


Figura 4.9: Variação do índice de refração da água em função da temperatura

Pode-se verificar que o aumento da temperatura provoca uma diminuição no valor do índice de refração da água, com variação máxima obtida de  $dn_{water}/dT = -1,3118 \cdot 10^{-005} RIU/K$ . A análise com relação a  $\lambda$  foi realizada com uma temperatura fixa de 293,15K variando-se o valor de  $\lambda$  na faixa de 365nm a 1014nm em intervalos de 1nm. O comportamento obtido está ilustrado na Figura

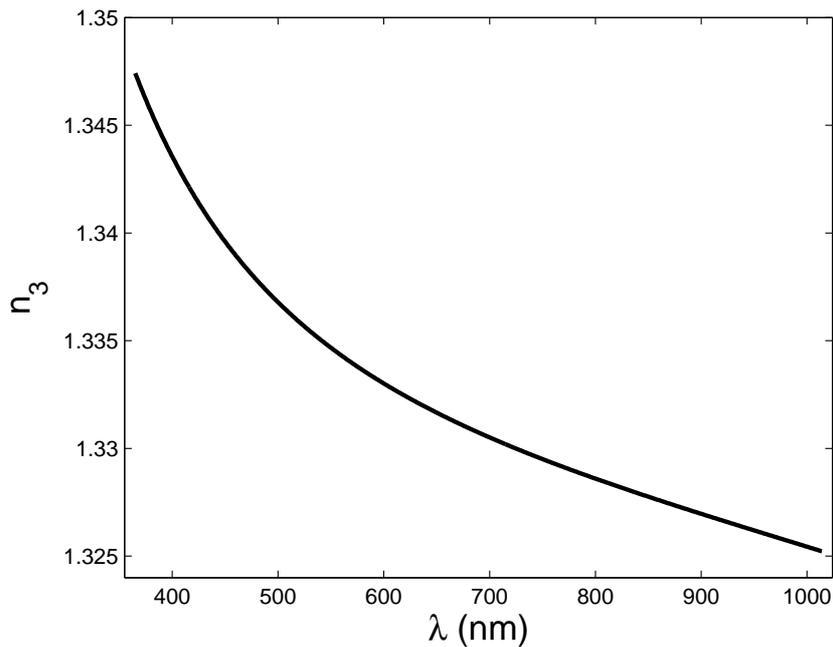


Figura 4.10: Variação do índice de refração da água em função do comprimento de onda

A sensibilidade com relação a  $\lambda$  para o índice de refração da água foi  $dn_{water}/d\lambda = -1,5111 \cdot 10^{-5} RIU/nm$ . Assim como o demonstrado para o ouro, o índice de refração da água sofre uma influência mais acentuada de  $\lambda$  do que de  $T$ .

### Índice de refração do substrato

O índice de refração do vidro, para um determinado valor de comprimento de onda na faixa de ultra violeta a infra vermelho, pode ser determinado através da equação de dispersão de Sellmeier expressa na equação 4.33.

$$n^2(\lambda) - 1 = \frac{B_1 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - C_1} + \frac{B_2 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - C_3} \quad (4.33)$$

onde  $B_1, B_2, B_3, C_1, C_2$  e  $C_3$  são coeficientes que dependem do tipo de vidro e podem ser encontrados nos catálogos dos fabricantes.

A dependência com relação a temperatura do índice de refração do vidro é obtida derivando-se a equação 4.33. Dessa forma, encontra-se o valor da variação do índice de refração determinado pela equação 4.34.

$$\Delta n_{abs}(\lambda, T) = \frac{n^2(\lambda, T_0) - 1}{2 \cdot n(\lambda, T_0)} \cdot \left( D_0 \cdot \Delta T + D_1 \cdot \Delta T^2 + D_2 \cdot \Delta T^3 + \frac{E_0 \cdot \Delta T + E_1 \cdot \Delta T^2}{\lambda^2 - \lambda_{TK}^2} \right) \quad (4.34)$$

onde,

- $T_0$  é a temperatura de referência
- $T$  é a temperatura em  $^{\circ}C$
- $\Delta T$  diferença de temperatura em relação a  $T_0$
- $\lambda$  é comprimento de onda da onda eletromagnética no vácuo em  $\mu m$
- $D_0, D_1, D_2, E_0, E_1$  e  $\lambda_{TK}$  são constantes que dependem do tipo de vidro

Utilizando-se as equações 4.33 e 4.34 encontra-se o valor do índice de refração do vidro em função da temperatura e do comprimento de onda, que é determinado através da equação 4.35.

$$n_{abs}(\lambda, T) = n_{abs}(\lambda, T_0) + \Delta n_{abs}(\lambda, T) \quad (4.35)$$

As constantes das equações 4.34 e 4.34 são válidas na faixa de temperatura entre  $-100^{\circ}C$  e  $140^{\circ}C$  e de comprimento de onda entre  $0,365\mu m$  e  $1,014\mu m$ . Os valores das constantes para o vidro  $N - BK7$  estão contidos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Parâmetros Utilizados no Cálculo do Índice de Refração do Substrato

Parâmetro	Valor
$B_1$	1,03961212
$B_2$	0,231792344
$B_3$	1,01046945
$C_1$	0,00600069867
$C_2$	0,0200179144
$C_3$	103,560653
$T_0$	20°C
$D_0$	$1,86 \cdot 10^{-6}$
$D_1$	$1,31 \cdot 10^{-8}$
$D_2$	$-1,37 \cdot 10^{-11}$
$E_0$	$4,34 \cdot 10^{-7}$
$E_1$	$6,27 \cdot 10^{-10}$
$\lambda_{TK}$	0,17 $\mu$ m

Utilizando-se as equações 4.33 a 4.35, com os valores expressos na Tabela 4.4, obteve-se a variação do índice de refração do substrato em função da temperatura para uma faixa de 0° a 100°C. O comportamento obtido, para um comprimento de onda fixo em 670nm, está ilustrado na Figura 4.11.

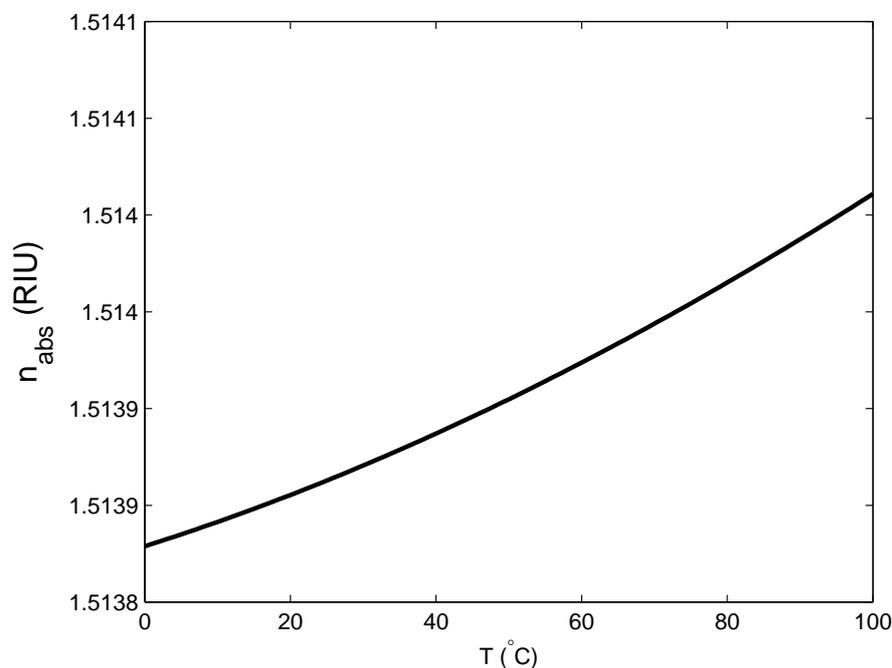


Figura 4.11: Variação do índice de refração do Substrato em função da Temperatura

Para analisar a variação em relação ao comprimento de onda, manteve-se a temperatura fixa em  $T = 20^\circ\text{C}$  e modificou-se o comprimento de onda no intervalo de 0,365 $\mu$ m a 1,014 $\mu$ m com incremento de 1nm. O comportamento obtido está ilustrado no gráfico da Figura 4.12.

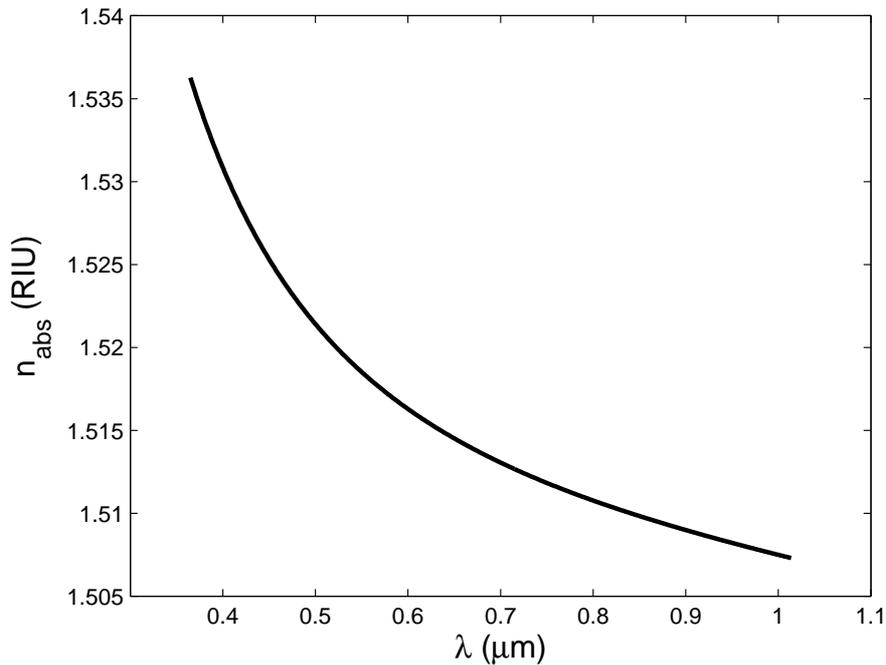


Figura 4.12: Variação do índice de refração do Substrato em função do Comprimento de Onda

Comparando-se as Figuras 4.12 com a Figura 4.11 verifica-se que a variação no valor do índice de refração da água é mais acentuada com aumento no valor de  $\lambda$  do que com o de  $T$ . As sensibilidades obtidas foram  $dn_{\text{abs}}/dT = 2,3880 \cdot 10^{-6} \text{RIU}/K$  e  $dn_{\text{abs}}/d\lambda = -1,3791 \cdot 10^{-5} \text{RIU}/nm$ .

### Efeito da variação do comprimento de onda e dilatação

A influência individual do *biochip* em função da variação de temperatura já foi avaliada na seção 3.2.3. Nesta análise considerou-se a luz incidente com distribuição espacial uniforme e os resultados obtidos para a variação relativa foram ilustrados na Figura 3.13.

Pode-se observar que existe um alargamento da curva SPR, verificado com aumento do valor de  $\Gamma$ , quando existe um acréscimo no valor da temperatura. Existe também um aumento da assimetria em função da temperatura e diminuição do valor do ângulo de ressonância. A diminuição de  $\theta_{res}$  indica que existe um deslocamento para esquerda na curva SPR com aumento da temperatura. O comportamento de  $\theta_{res}$  e de  $\Gamma$  são não lineares em função da variação de  $T$ , porém em torno da temperatura de  $25^\circ\text{C}$  as três características da curva SPR ( $\theta_{res}, \Gamma$  e  $G_R$ ) apresentam comportamentos lineares.

Além do efeito da variação do coeficiente de reflexão causado pela variação dos índices de refração das camadas do *biochip*, deve ser considerado o efeito da alteração das dimensões do *biochip* provocado pela expansão ou contração gerada pela variação da temperatura.

O transdutor físico químico da VIR é formado por um substrato e uma camada metálica,

que constituem um Elemento de Acoplamento Ótico de Difração (EAOD), além da camada bioquímica depositada sobre o EAOD para fixação da substância a ser analisada. A estrutura física do EAOD está ilustrada na Figura 4.13.

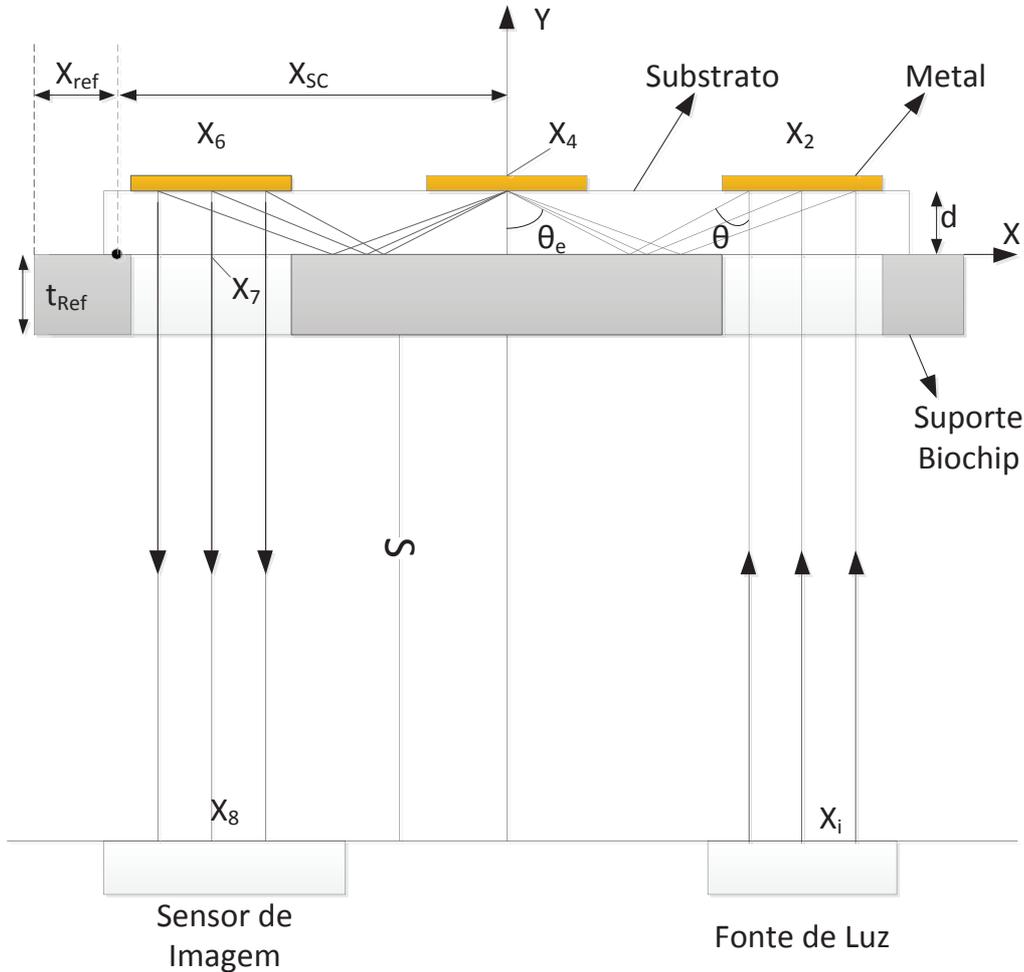


Figura 4.13: Estrutura Física do *Biochip* da Vir

O feixe de luz incide perpendicularmente sobre o EAOD na parte inferior do substrato de espessura  $d$ . Na parte superior deste substrato existe uma grade de difração de entrada. O feixe incide na grade na posição  $X_2$  onde é difratado com um ângulo  $\theta$ , sendo então refletido na parte inferior do substrato até encontrar a região central do *biochip* na posição  $X_4$ . Na região central é depositada a camada bioquímica que forma a região sensora. Na posição  $X_4$  existe apenas uma camada de ouro com  $50nm$  de espessura. O feixe reflete na região central e novamente na parte inferior do substrato até encontrar a grade de difração de saída na posição  $X_6$ . A grade de difração de saída difrata o feixe de luz de forma que a luz sai perpendicularmente do EAOD. Se o feixe proveniente da fonte de luz não for perfeitamente colimado, pode ter um ângulo de inclinação com a normal do EAOD ( $\theta_{in}$ ) diferente de zero de acordo com o ilustrado pela Figura

4.14.

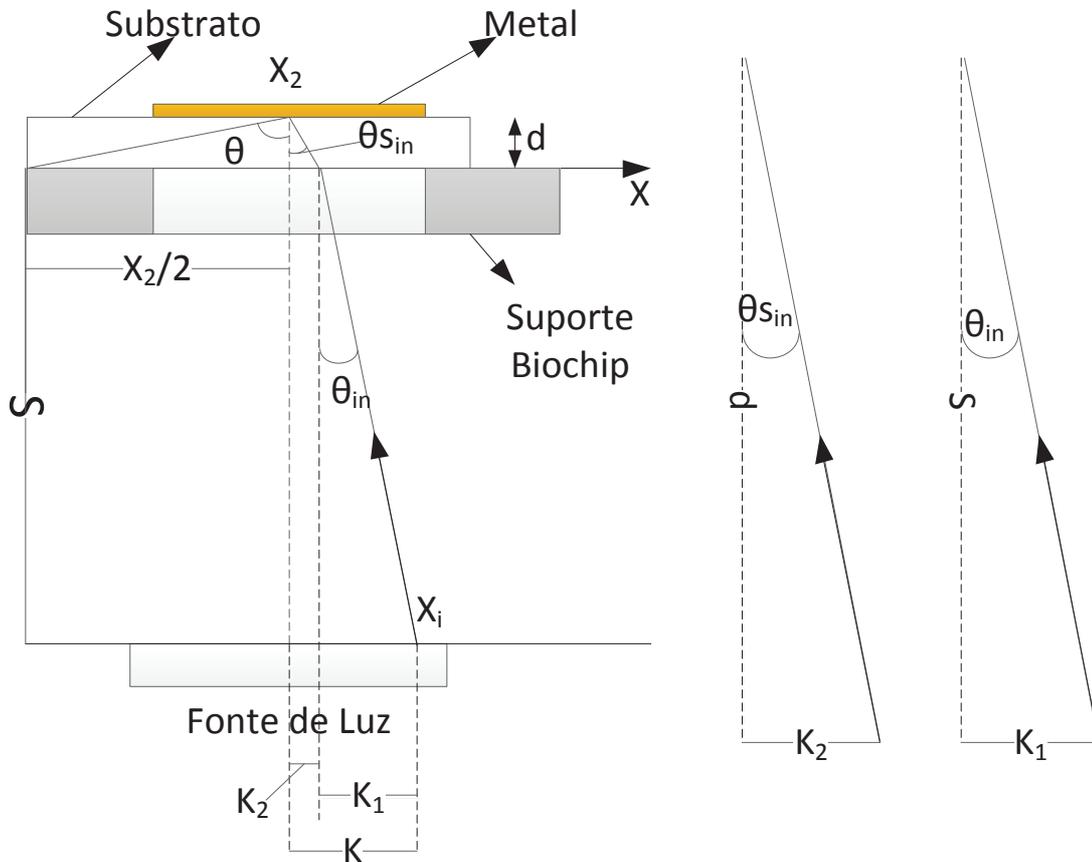


Figura 4.14: Estrutura Física do *Biochip* da Vir

O caminho óptico do feixe no interior do EAOD depende de suas dimensões físicas e do comprimento de onda do feixe. O EAOD foi projetado para que todo feixe oriundo da fonte de luz em uma posição  $X_i$  encontra a região sensora em um mesmo ponto na posição central  $X_4$ . Para tornar isto possível, foi preciso determinar o espaço da grade de difração adequado de acordo com a posição  $X_2$ . Desta forma, os ângulos do feixe difratado pela grade de entrada são dependentes da posição de entrada. Logo, na região sensora a luz incide com diferentes ângulos dependentes da posição de entrada do feixe  $\theta_e(X_2)$ , o que para um comprimento de onda único do feixe de luz forma o modo de interrogação angular para biossensores SPR.

O comportamento de um feixe de luz incidente em uma grade de difração é determinado pela equação da grade derivada da lei de Bragg, expressa através da equação 4.36

$$n \cdot \lambda_m = a \cdot (\text{sen}(\theta_i) \pm \text{sen}(\theta_r)) \quad (4.36)$$

onde,  $\theta_i$  é o ângulo do feixe de luz em relação à normal da grade de difração,  $\theta_r$  é o ângulo entre a normal e o feixe refletido,  $a$  é o período da grade de difração ou espaçamento entre

as fendas da grade de difração (espaçamento da grade),  $\lambda_m$  é o comprimento de onda da luz incidente se propagando no meio  $m$  e  $n$  é a ordem de difração. O sinal existente no lado direito da equação 4.36 se torna negativo quando o feixe refletido está do lado oposto do feixe incidente.

O feixe de luz é proveniente de uma fonte emissora e percorre um caminho pelo ar até incidir sobre o EAOD, passando através de um substrato onde está formada a grade de difração na interface com o metal. Um feixe de luz sofre um desvio quando passa de um meio 1 para outro meio 2 com índice de refrações diferentes, possuindo um comportamento determinado através da Lei de Snell expresso pela equação 4.37.

$$\frac{\text{sen}(\theta_1)}{\text{sen}(\theta_2)} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\lambda_1}{\lambda_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad (4.37)$$

onde  $\theta_i$ ,  $v_i$ ,  $\lambda_i$  e  $n_i$  são respectivamente o ângulo de incidência, velocidade da onda, comprimento de onda e índice de refração do meio  $i$ . Considerando o índice de refração do ar como unitário ( $n_1 = 1$ ) e que o feixe de luz possui um ângulo de propagação no ar  $\theta_{in}$ , utilizando a equação 4.37 pode-se determinar o valor do ângulo de propagação do feixe de luz no substrato  $\theta_{sin}$  através da equação 4.38.

$$\text{sen}(\theta_{sin}) = \frac{\text{sen}(\theta_{in})}{n_s} \quad (4.38)$$

onde  $n_s$  é o índice de refração do substrato. Da mesma forma, através da equação 4.37 pode-se determinar o valor da frequência da onda se propagando no substrato  $\lambda_s$  pela equação 4.39.

$$\lambda_s = \frac{\lambda}{n_s} \quad (4.39)$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz proveniente da fonte de luz ( $\lambda_1 = \lambda$ ). Substituindo a equação 4.38 e 4.39 na equação 4.36 encontra-se a equação 4.40.

$$\frac{n \cdot \lambda}{n_s} = a \cdot \left( \frac{\text{sen}(\theta_{in})}{n_s} - \text{sen}(\theta) \right) \quad (4.40)$$

Na determinação da equação 4.40 foi utilizado o fato de que o ângulo de incidência do feixe na grade de difração  $\theta_i$  é o ângulo de propagação do feixe no substrato  $\theta_{sin}$ , assim como o comprimento da onda incidente na grade de difração  $\lambda_m$  é o comprimento de onda no substrato  $\lambda_s$ . Além disso, o ângulo de reflexão do feixe incidente na grade de refração é denominado aqui apenas de  $\theta$ . Isolando-se o valor de  $a$  na equação 4.40 encontra-se o valor para o espaçamento da grade determinado pela equação 4.41.

$$a = \frac{n \cdot \lambda}{\text{sen}(\theta_{in}) - n_s \cdot \text{sen}(\theta)} \quad (4.41)$$

A grade de difração foi projetada para que os feixes de luz na entrada do *biochip* sempre

incidissem no ponto central, apresentando uma reflexão a meio caminho entre a posição de entrada  $x_2$  e o ponto central. Analisando-se a Figura 4.14 pode-se encontrar o valor de  $\text{sen}(\theta)$  determinado através da equação 4.42.

$$\text{sen}(\theta) = \frac{\frac{x_2}{2}}{\sqrt{\left(\frac{x_2}{2}\right)^2 + d^2}} = \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{2d}{x_2}\right)^2}} \quad (4.42)$$

Considerando que o feixe de luz incide perpendicularmente a superfície do *biochip* ( $\theta_{in} = 0$ ) e substituindo-se a equação 4.42 na equação 4.41, encontra-se o valor do espaçamento da grade em função da distância para a posição de entrada do feixe de luz  $x_2$  determinado através da equação 4.43.

$$a(X_2) = \frac{-n \cdot \lambda_0}{n_s} \sqrt{1 + \left(\frac{2d}{X_2}\right)^2} \quad (4.43)$$

onde  $\lambda_0$  é o comprimento de onda da fonte de luz do projeto. Para o *biochip* da VIR o valor de  $\lambda_0$  é de  $670\text{nm}$ , a espessura do substrato é  $d = 1,2\text{mm}$  e a posição de entrada do feixe de luz varia entre  $4,6\text{mm}$  e  $9,6\text{mm}$  [C.THISTRUP et al., 2004]. O valor de  $n_s$  foi calculado considerando o índice de refração para o substrato formado pelo material TOPAS [KHANARIAN; CELANESE, 2001]. Utilizando a equação 4.43 obtém-se o valor de  $a$  em função da posição de entrada. O comportamento obtido para variação de  $a$  está ilustrado na Figura 4.15.

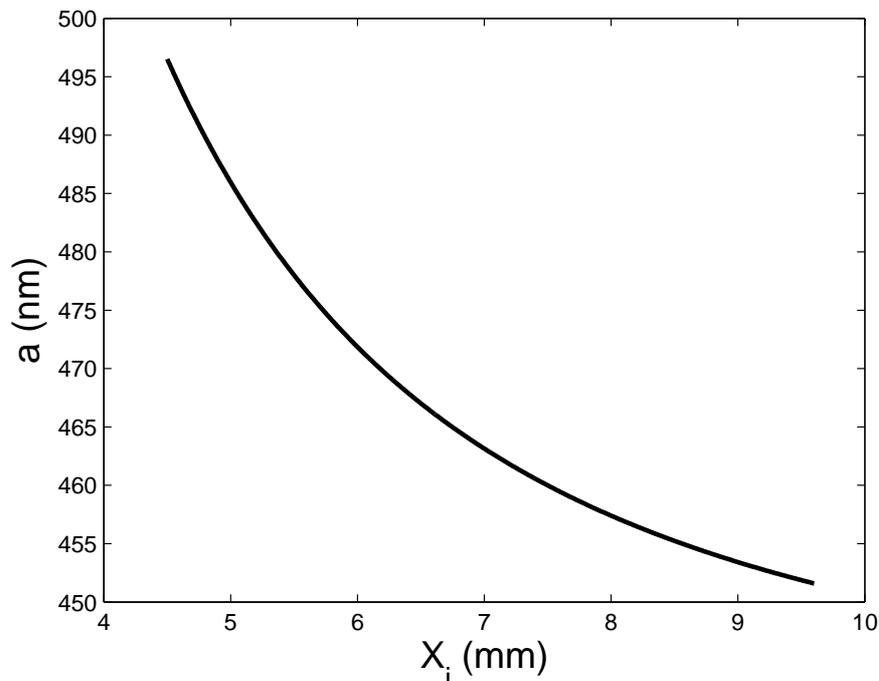


Figura 4.15: Valor do espaçamento da grade de difração em função da posição de entrada  $X_2$

Pode-se observar nas Figuras 4.13 e 4.14, que o valor do ângulo de incidência na região sen-

sível  $\theta_e$  é igual ao valor do ângulo de reflexão do feixe na grade de difração  $\theta$ . Logo, isolando-se o valor de  $\theta$  na equação 4.40 pode-se determinar o valor de  $\theta_e$  e  $\theta$  através da equação 4.44.

$$\theta_e = \theta = \arcsen\left(\frac{-n \cdot \lambda}{a(X_2) \cdot n_s} + \frac{\text{sen}(\theta_{in})}{n_s}\right) \quad (4.44)$$

Para um feixe perfeitamente colimado e perpendicular ao EAOD a posição de entrada  $X_2$  é igual à posição do feixe na fonte de luz. Entretanto quando existe uma inclinação do feixe de luz  $X_2 \neq X_i$ . Considerando a configuração ilustrada na Figura 4.14, onde uma fonte de luz está posicionada a uma distância  $S$  do EAOD, um feixe partindo da posição  $X_i$  com ângulo de inclinação em relação a normal  $\theta_{in}$  encontra a grade de difração na posição  $X_2$ . A inclinação do feixe pode ocasionar uma área de sombreado na grade de difração, causada pelo bloqueio da luz por parte do suporte do *biochip*. Para encontrar o valor de  $X_2$  em função de  $X_i$  denomina-se de  $K$  a distância entre  $X_2$  e  $X_i$ ,  $K_1$  a distância entre o ponto no qual o feixe intercepta a entrada do EAOD e  $X_i$  e de  $K_2$  a distância entre  $X_2$  e o ponto onde o feixe intercepta o EAOD. Do triângulo ilustrado na Figura 4.14 pode-se obter o valor de  $K_1$  através da equação 4.45.

$$K_1 = S \cdot \theta_{in} \quad (4.45)$$

Analogamente obtém-se o valor para  $K_2$  através da equação 4.46.

$$K_2 = d \cdot \theta_{sin} \quad (4.46)$$

Utilizando-se as equações 4.45 e 4.46 obtém-se o valor de  $K$  através da equação 4.47.

$$K = K_1 + K_2 = S \cdot \theta_{in} + d \cdot \theta_{sin} \quad (4.47)$$

Substituindo-se o valor de  $\theta_{sin}$  da equação 4.38 (considerando-se  $\text{sen}(\theta_{sin}) \cong \theta_{sin}$ ) em 4.47 obtém-se a equação 4.48.

$$K = S \cdot \theta_{in} + d \cdot \frac{\theta_{in}}{n_s} = \theta_{in} \left( S + \frac{d}{n_s} \right) \quad (4.48)$$

Utilizando-se a equação 4.48 obtém-se o valor para  $X_2$  através da equação 4.49.

$$X_2 = X_i - K = X_i - \left( S + \frac{d}{n_s} \right) \cdot \theta_{in} \quad (4.49)$$

Quando o comprimento de onda do feixe de luz é igual ao comprimento de onda de projeto da grade de difração, o feixe incide no ponto central posicionado em  $X_4$  como ilustrado na Figura 4.13. Entretanto, para um comprimento de onda diferente de  $\lambda_0$  o caminho ótico percorrido pelo feixe de luz é modificado, pois de acordo com a equação 4.42 o ângulo de reflexão muda em função do comprimento de onda. Para encontrar o ponto de incidência do feixe de luz na

região central, onde está posicionada a camada sensível do *biochip*, é primeiramente necessário determinar a distância entre o ponto de incidência na entrada do *biochip* ( $X_2$ ) e o ponto de incidência da primeira reflexão do feixe na camada superior do substrato, denominada aqui como  $X_c$ . Como  $X_c/2$  é o cateto oposto ao ângulo de reflexão  $\theta$ , o valor de  $X_c$  pode ser determinado através da equação 4.50.

$$X_c = \frac{2 \cdot \text{sen}(\theta) \cdot d}{\sqrt{1 - (\text{sen}\theta)^2}} = \frac{2 \cdot d}{\sqrt{\left(\frac{1}{(\text{sen}(\theta))^2}\right) - 1}} \quad (4.50)$$

Utilizando-se as equações 4.43 e 4.44 é possível provar que, para um feixe de luz perfeitamente colimado incidente perpendicularmente ao *biochip* ( $\theta_{in} = 0$ ) e uma fonte de luz com comprimento de onda igual ao de projeto da grade de difração ( $\lambda = \lambda_0$ ), o valor de  $X_c$  na equação 4.50 é igual a  $X_2$ . Substituindo-se a equação 4.44 na equação 4.50 e considerando-se o fato que o ângulo entre o feixe de luz e a normal da grade de difração é muito pequeno ( $\text{sen}(\theta_i) \simeq \theta_i$ ), obtém-se a equação 4.51.

$$X_c = \frac{2 \cdot d}{\sqrt{\left[\left(\frac{1}{\left[\left(\frac{-n\lambda}{a(X_2)} + \theta_{in}\right) \cdot \frac{1}{n_s}\right]^2}\right) - 1\right]}} = \frac{2 \cdot d}{\sqrt{\left(\frac{n_s}{\frac{-n\lambda}{a(X_2)} + \theta_{in}}\right)^2 - 1}} \quad (4.51)$$

As demais posições de incidência do feixe de luz na interface entre o substrato e a camada de metal no *biochip*, ilustradas na Figura 4.13, podem ser calculadas em função do valor de  $X_c$  de acordo com a equação 4.53.

$$X_j = X_2 - \frac{j}{2} \cdot X_c, j = 4, 6 \quad (4.52)$$

O valor de  $X_j$  representa a posição de cada retorno  $j$  do feixe de luz na superfície superior do substrato após refletir na superfície inferior. Analisando-se as equações 4.51 e 4.53 observa-se que o caminho óptico percorrido pelo feixe de luz é modificado em função do comprimento de onda da fonte de luz. Desta forma, as posições de interceptação na superfície superior podem ser diferentes das idealizadas no projeto do EAOD, quando utiliza-se comprimentos de onda diferentes de  $\lambda_0$ . Logo a posição de saída e de incidência do feixe de luz na região central são modificadas com a variação de  $\lambda$ . Da mesma forma, analisando-se a equação 4.44 o valor dos ângulos de incidência na região sensora são modificados em função de  $\lambda$ . A Figura 4.16 ilustra o caminho óptico percorrido para o comprimento de onda  $\lambda = \lambda_0$  e  $\lambda = 632nm$  (Figura 4.16 a) para as posições de entrada mínima  $X_{2min}$  e máxima  $X_{2mx}$  (Figura 4.16 a).

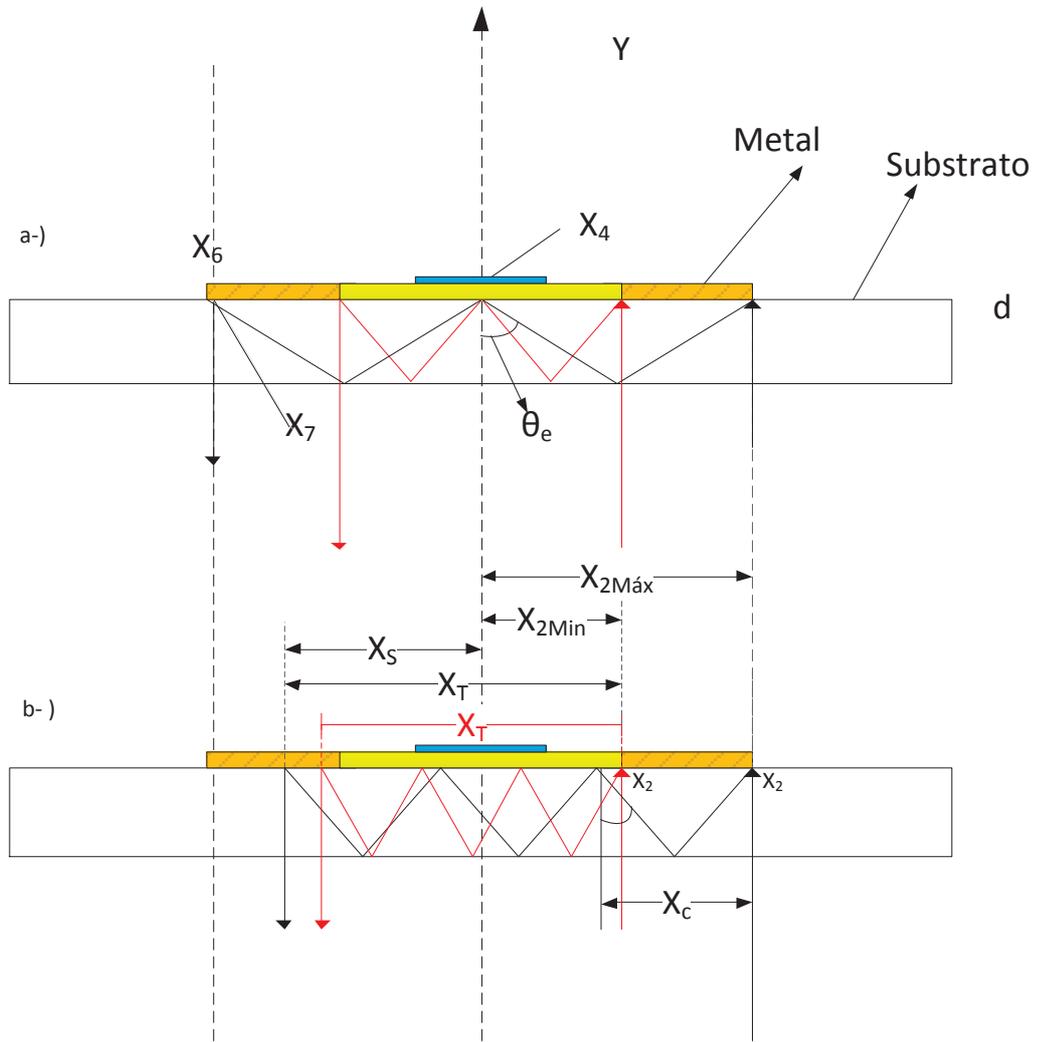


Figura 4.16: Caminho óptico do feixe de luz

Para encontrar a posição de saída do feixe de luz é preciso determinar o número de reflexões existentes até o feixe incidir na grade de difração de saída. A determinação da posição de saída foi de acordo com o fluxograma ilustrado na Figura 4.17.

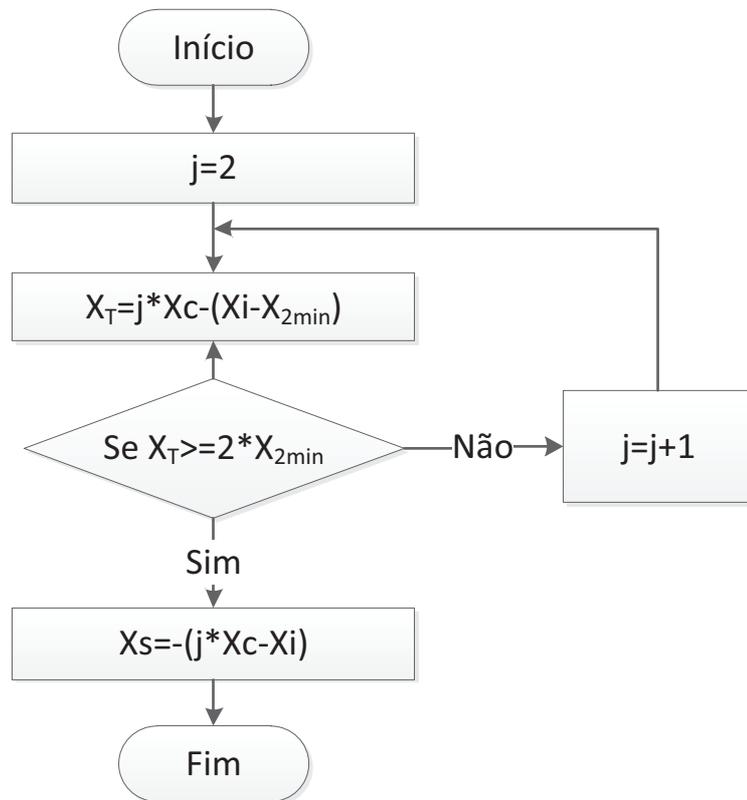


Figura 4.17: Fluxograma para determinação da posição de saída do feixe de luz

Estipula-se inicialmente o número de reflexões como sendo a quantidade de reflexões que deveria existir se  $\lambda = \lambda_0$ . Calcula-se então a distância entre o caminho percorrido pelo feixe de luz e a posição de entrada mínima  $X_2$  denominada aqui como  $X_T$  e ilustrada na Figura 4.16. Se o valor de  $X_T$  for maior que a distância entre a grade de difração de entrada e de saída, ou seja  $X_T \geq 2 \cdot X_{2Min}$ , significa que o feixe de luz incidiu na grade de difração de saída. Caso contrário, existe um número maior de reflexões dentro do EAOD para que o feixe de luz encontre a grade de saída. Logo, incrementa-se o valor de  $j$  e repete-se o procedimento até encontrar o valor do número de reflexões que atenda a condição. Admitindo-se que o ponto central corresponde a distância 0, posições a esquerda do ponto central assumem valores negativos. O valor da posição de saída  $X_s$  pode ser determinado utilizando-se a equação .

$$X_s = -(j \cdot X_c - X_i) \tag{4.53}$$

#### Análise do caminho óptico do feixe de luz

O feixe de luz proveniente das telas de dispositivos computacionais portáteis é gerado por dispositivos que emitem luz nas componentes primárias Vermelho (R), Verde (G) e Azul (B). As

demais cores são geradas pela composição destas três componentes primárias.

O caminho óptico percorrido pelo feixe de luz foi analisado para  $\lambda = \lambda_0 = 670nm$  e para as componentes principais de cada canal correspondentes as cores primárias. Os valores para os canais R,G e B são respectivamente  $\lambda = \lambda_R = 628,3nm$ ,  $\lambda = \lambda_G = 529,7nm$  e  $\lambda = \lambda_B = 466,9nm$ . Os resultados obtidos considerando o feixe de luz perfeitamente colimado, com ângulo de incidência  $\theta_{in} = 0^\circ$ , está ilustrado na Figura 4.18.

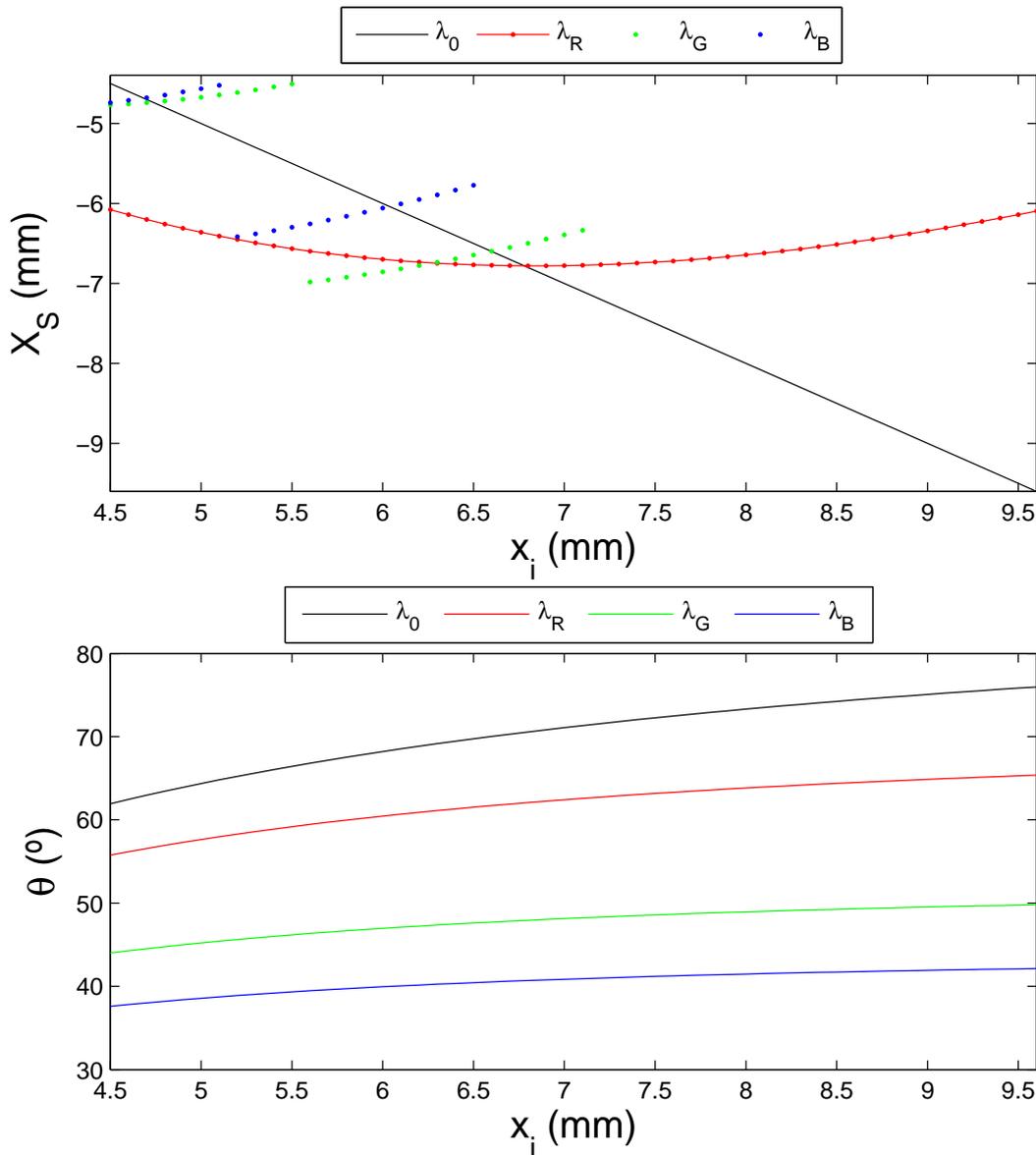


Figura 4.18: Posição de Saída Feixe de Luz para os comprimentos de onda principais de cada componente primária gerada pela tela do SIII, com  $\theta_{in} = 0$

Pode-se observar na Figura 4.18 que para  $\lambda = \lambda_0$  existe uma simetria entre a posição de entrada e de saída. Para os comprimentos de onda correspondentes as componentes primárias, pode-se verificar que existe sobreposição entre as posições de saída. Desta forma, para a

mesma posição de saída pode existir a influência de mais de um comprimento de onda. Entretanto, é possível verificar que existe uma segmentação das componentes de cores para as posições de saída. Analisando desde a posição mais próxima ao centro ( $X_S = -4,5mm$ ) até a mais distante ( $X_S = -9,6mm$ ) verifica-se na ordem a predominância das cores azul ( $\lambda = \lambda_B$ ), verde ( $\lambda = \lambda_G$ ) e vermelho ( $\lambda = \lambda_R$ ). A faixa de valores dos ângulos de incidência também são modificadas de acordo com a modificação do valor de  $\lambda$ . Pode-se verificar nas Figura 4.18 e 4.19 que a medida que diminui-se o comprimento de onda os valores dos ângulos também diminuem.

Os resultados obtidos considerando o ângulo de incidência  $\theta_{in} = 1^\circ$  estão ilustrados na Figura 4.19.

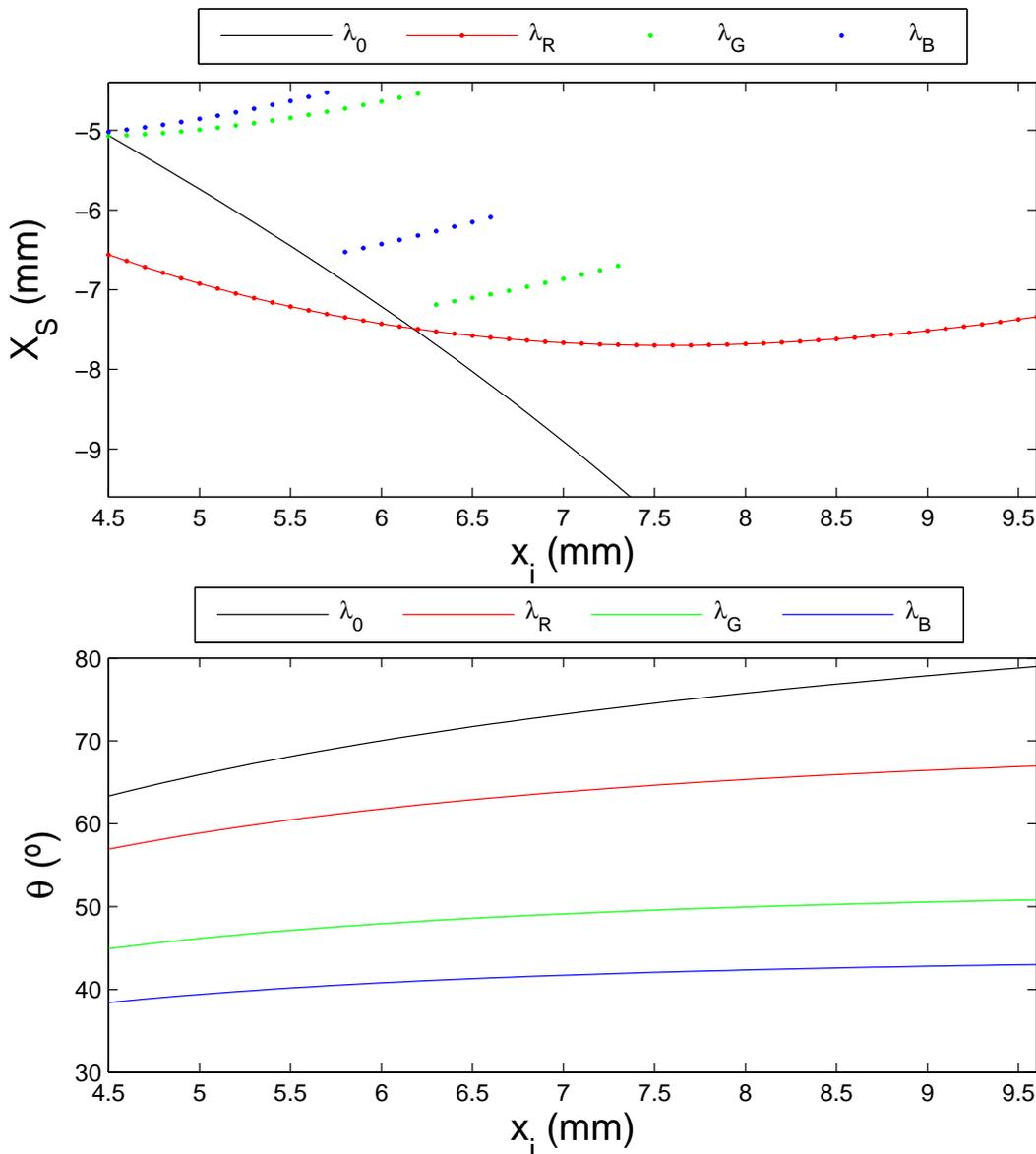


Figura 4.19: Posição de saída feixe de Luz para os comprimentos de onda principais de cada componente primária gerada pela tela do SIII, com  $\theta_{in} = 0^\circ$

Pode-se observar que as posições de saída foram alteradas para todos os valores de  $\lambda$ . É possível verificar que as componentes verde e azul estão em um intervalo de posição de saída menor, o que implica em um estreitamento da área correspondente a estes componentes. Por outro lado, existe um menor sombreamento entre as componentes vermelha e verde.

### 4.1.5 Influência do fotodetector

Os circuitos internos para cada câmera podem variar muito de acordo com a arquitetura utilizada por diferentes fabricantes. Logo, o modelo matemático para representar a influência do sinal e do ruído da câmera dependerá do tipo de fotodiodo utilizado, amplificadores de coluna e de saída, circuito de reset e outros fatores que dependem da construção do dispositivo. Isto dificulta uma análise detalhada sobre a influência do sinal e ruído na câmera.

Como a câmera utilizada nos biossensores pode variar bastante, optou-se por um modelo que não considera características específicas dos dispositivos internos utilizados. O modelo adotado neste trabalho é o Modelo de Transferência de Fótons do padrão 1288 EMVA (Europe Machine Vision Association) versão 3.1 [EMVA, 2012]. Este padrão é utilizado para caracterização de sensores de imagens e câmeras.

#### Modelo de transferência de fótons padrão 1288

O padrão 1288 EMVA considera o processo de conversão da quantidade de luz incidente em um sinal digital, desde a chegada dos fótons aos elementos sensores até a transformação em valor digital pelo conversor AD. A Figura 4.20 ilustra o processo de conversão e o diagrama de blocos do Modelo de Transferência de Fótons.

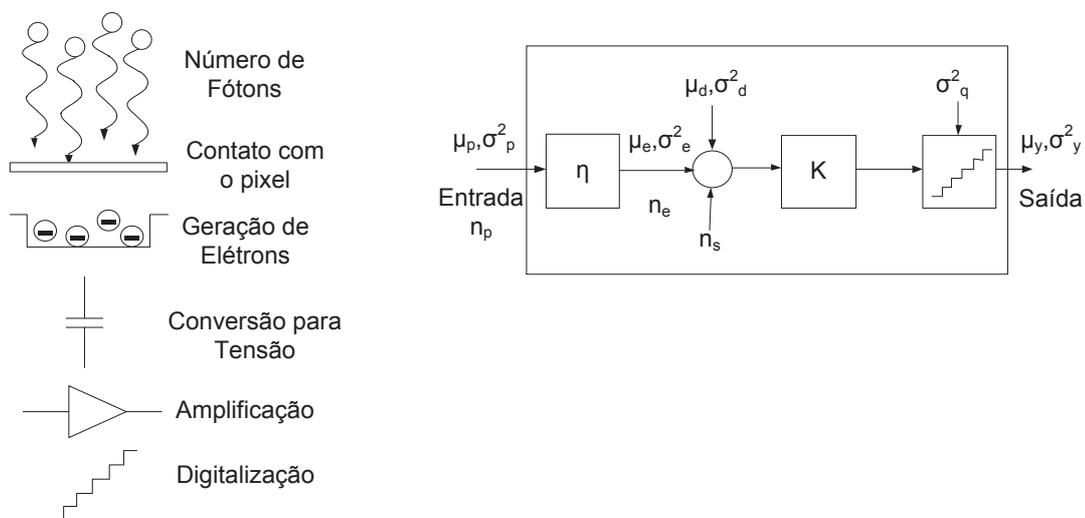


Figura 4.20: Modelo de Transferência de Fótons para Câmeras

Os fótons incidentes em cada *pixel* da câmera são inicialmente convertidos em elétrons pelo fotodetector. Em seguida são armazenados no capacitor de saída, amplificados e digitalizados. Durante um tempo de exposição  $t_{exp}$  um média de  $\mu_p$  fótons, provenientes de uma fonte de irradiação  $E$ , incide em uma área total  $A$  de um *pixel*, sendo uma fração destes fótons absorvidos e acumulados em  $\mu_e$  unidades de cargas. O valor de  $\mu_p$  pode ser expresso pela equação 4.54.

$$\mu_p = \frac{AE\lambda}{hc} \cdot t_{exp} \quad (4.54)$$

A quantidade de fótons convertidos em elétrons é dada pela eficiência quântica  $\eta = \frac{\mu_e}{\mu_p}$ . De acordo com o diagrama de blocos ilustrado na Figura 4.20, a média do sinal de saída  $\mu_y$  pode ser encontrada pela equação 4.55.

$$\mu_y = K(\mu_e + \mu_d) = K(\eta \cdot \mu_p + \mu_d) = K \cdot \eta \cdot \mu_p + \mu_{y,esc} \quad (4.55)$$

onde,

- $K$  é o ganho total do sistema
- $\mu_d$  é o número de elétrons presentes sem luz
- $\mu_{y,esc} = K \cdot \mu_d$  é o sinal escuro médio com irradiação zero

O valor do sinal escuro  $\mu_d$  não é constante, pois é gerado principalmente em função dos elétrons termicamente induzidos. O sinal escuro varia linearmente em função do tempo de exposição de acordo com a expressão da equação 4.56.

$$\mu_d = \mu_{d,0} + \mu_i t_{exp} \quad (4.56)$$

A corrente escura  $\mu_i$  varia exponencialmente em função da temperatura de acordo com a expressão da equação 4.57.

$$\mu_i = \mu_{i,ref} \cdot 2^{\frac{T-T_{ref}}{T_d}} \quad (4.57)$$

onde,

- $T_d$  é a constante que indica o intervalo de temperatura que dobra o valor da corrente escura
- $T_{ref}$  é a temperatura de referência
- $\mu_{i,ref}$  é a corrente escura na temperatura de referência

No padrão 1288 EMVA o ruído temporal é representado pela desvio padrão  $\sigma_y$  e o ruído espacial pelo desvio padrão  $s_y$ . Desta forma, neste trabalho a variância do ruído de saída é definida como  $\sigma_{y.tot}^2$  de acordo com a equação 4.58.

$$\sigma_{y.tot}^2 = \sigma_y^2 + s_y^2, \quad (4.58)$$

O número total de fótons que atinge o sensor de imagem durante o tempo de exposição é governado por uma distribuição de Poisson. Logo o número de elétrons gerados também apresenta uma distribuição de Poisson, o que determina que a média de elétrons é igual a variância  $\mu_e = \sigma_e^2$ . Além da flutuação de elétrons gerados existe a influência do ruído de quantização e ruído escuro, representados respectivamente por suas variâncias  $\sigma_q$  e  $\sigma_d$ . Desta forma, o ruído temporal pode ser representado pela equação 4.59.

$$\sigma_y^2 = K^2(\sigma_d^2 + \sigma_e^2) + \sigma_q^2, \quad (4.59)$$

Considerando  $\mu_e = \eta\mu_p$  e que  $\mu_e = \sigma_e^2$ , utilizando a equação 4.55 obtém-se a expressão para a variância do ruído temporal da equação 4.60.

$$\sigma_y^2 = K^2\sigma_d^2 + \sigma_q^2 + K(\mu_y - \mu_{y.esc}) \quad (4.60)$$

O ruído escuro apresenta variância que cresce linearmente com o tempo de exposição de acordo com a expressão da equação 4.61.

$$\sigma_d^2 = \sigma_{d,0}^2 + \mu_i t_{exp} \quad (4.61)$$

O ruído de quantização pode ser determinado pela expressão  $\sigma_q^2 = 1/12DN^2$  (DN- número digital). Algumas câmeras fornecem o sinal analógico na saída, logo, o ruído de quantização está presente apenas no conversor AD do sistema de aquisição.

O ruído espacial é representado pela não uniformidade do sinal escuro (DSNU- Dark signal Nonuniformity) e pela não uniformidade da resposta do fóton (PRNU- Photo Response Nonuniformity). A variância do ruído espacial é calculada pela equação 4.62.

$$s_y^2 = K^2 DSNU_{1288}^2 + PRNU_{1288}^2 K^2 (\eta\mu_p)^2 \quad (4.62)$$

Utilizando-se as equações 4.55, 4.58, 4.60 e 4.62 pode-se determinar a relação sinal ruído do sensor de imagem pela equação 4.63.

$$SNR(\mu_p) = \frac{\eta\mu_p}{\sqrt{\sigma_d^2 + DSNU_{1288}^2 + \sigma_q^2/K^2 + \eta\mu_p + PRNU_{1288}^2 (\eta\mu_p)^2}} \quad (4.63)$$

### 4.1.6 Influência do conversor AD

O conversor AD transforma o sinal analógico de cada elemento de imagem do fotodetector em um valor digital que será adquirido e processado pela unidade de processamento. A digitalização do sinal ótico pode limitar a resolução da resposta de um biossensor SPR [JOHANSEN et al., 2000].

A resolução é fortemente dependente do conversor AD utilizado, do fotodetector e do algoritmo para encontrar o vale da curva SPR [JOHANSEN et al., 2000]. O tipo do conversor AD determina a velocidade de conversão para digital o que limita a frequência de aquisição do fotodetector. O período de aquisição entre um *pixel* e outro não pode ser menor do que o tempo de conversão do conversor AD somado com o tempo que o processador leva para armazenar o resultado.

Para algoritmos de detecção do ângulo de ressonância que utiliza medição de amplitude a resolução do sensor aumenta proporcionalmente a resolução do conversor AD utilizado [JOHANSEN et al., 2000]. A resolução do conversor AD está diretamente relacionada com a quantidade de bits utilizada e pode ser representada pela equação 4.64.

$$q = \frac{V_m}{2^n - 1}, \quad (4.64)$$

onde,

- $n$  é a quantidade de bits do conversor AD
- $V_m$  é o limite da faixa de trabalho ou a tensão de referência do conversor AD

A fonte primária de ruído no conversor AD é o erro de quantização. A incerteza máxima obtida é igual a metade do valor da resolução  $\pm \frac{1}{2}q$ . O valor RMS do erro de quantização pode ser expresso pela equação 4.65 [BALBINOT; BRUSAMARELLO, 2010].

$$e_q = \frac{LSB}{\sqrt{12}}, \quad (4.65)$$

onde, LSB é o valor do bit menos significativo.

O ruído causado pelo conversor AD  $\sigma_{ad}$  pode ser aproximado pelo erro de quantização  $e_q$ , logo  $\sigma_{ad} = e_q = \frac{LSB}{\sqrt{12}}$ . Em instrumentos onde o ruído é muito maior do que a resolução, a resolução digital pode ser desprezada [JOHANSEN et al., 2000].

No sensor utilizado para ensaios experimentais o conversor AD possui 12 bits com tensão de referência de 5V. Desta forma, através equação 4.64 calcula-se a resolução do AD obtendo-se o valor de  $q = 1,2mV$ . O ruído do conversor AD obtido pela equação 4.65 é  $\sigma_{ad} = 0,35247mV$ .

## 4.2 Compensação do diodo laser

Nos biossensores convencionais existe normalmente um controlador de temperatura para o diodo laser e um controle de potência ótica realizado através da realimentação do sinal luminoso por um fotodiodo, que age através da modificação da corrente para manter constante a intensidade luminosa. Entretanto como demonstrado no modelo, alterar o valor de corrente, mesmo que para uma temperatura controlada provoca uma modificação no comprimento de onda do sinal. A modificação de  $\lambda$  altera a abertura do feixe de luz, os índices de refração dos materiais do *biochip* e afeta a eficiência quântica do fotodetector utilizado. Para compensar a influência da fonte de luz, é proposto controlar o valor da corrente para manter fixo o comprimento de onda principal do espectro da luz gerada. Desta forma a intensidade luminosa é alterada, porém pode ser compensada através de software, pois, modifica apenas o valor médio do sinal captado pela câmera. Neste trabalho são propostas duas alternativas para o controle da fonte de luz que estão ilustradas no diagrama de bloco da Figura 4.21.

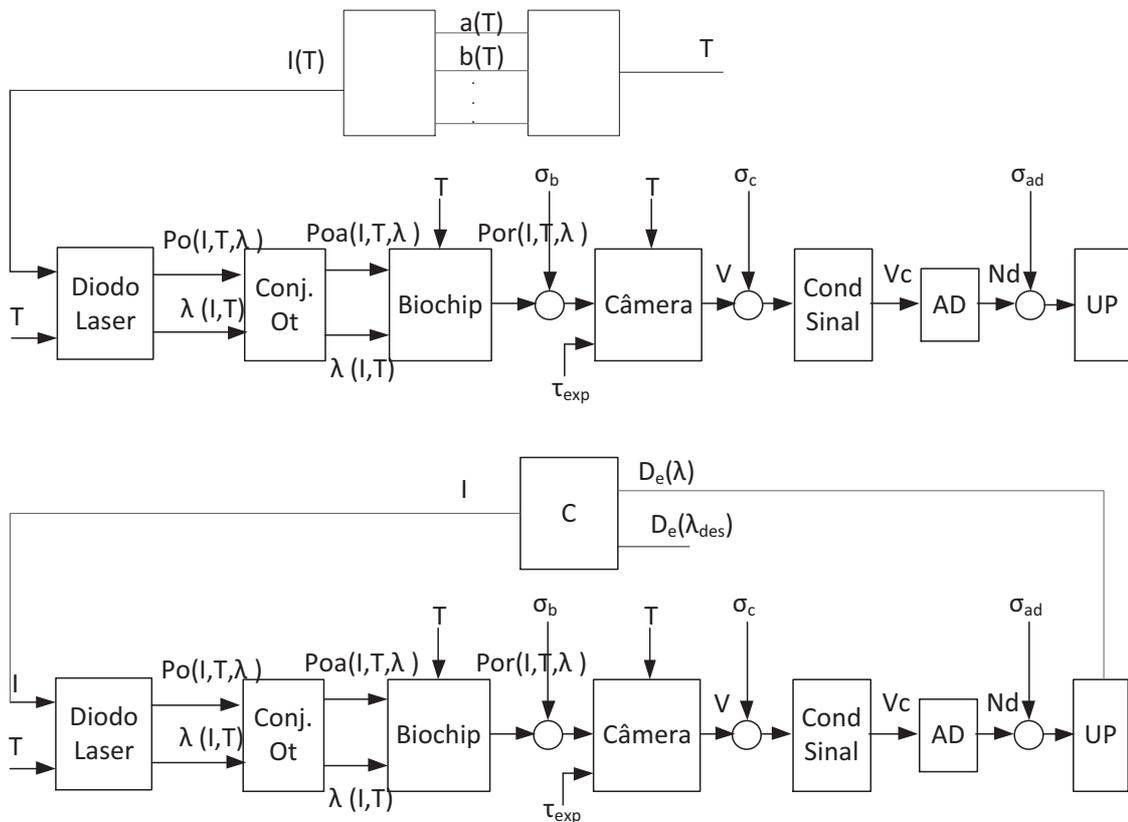


Figura 4.21: Diagrama de blocos para controle do diodo laser

A primeira proposta é inicialmente caracterizar a fonte de luz e obter o comportamento em

função da variação da temperatura e da corrente. Mantendo-se a fonte de luz a uma temperatura fixa, pode-se variar o valor da corrente e obter o espectro correspondente para cada valor de  $I$ . Em seguida, modifica-se a temperatura dentro da faixa desejada e repete-se o procedimento com a variação da corrente. De acordo com o apresentado na equação 4.7 o valor de  $\lambda$  cresce linearmente com o aumento da temperatura. O comportamento de  $\lambda$  em função de  $I$  a uma temperatura constante, também pode ser aproximado por uma reta  $\lambda_{max}(I) = a(T) \cdot I + b(T)$ , onde  $\lambda_{max}$  é o valor da componente principal do espectro obtido no valor máximo do sinal captado por um espectômetro. Para cada valor de  $T$  determina-se a equação da reta e obtém-se então os valores dos coeficientes  $a$  e  $b$  em função de  $T$ , que podem ser aproximados por um polinômio. Após caracterizado o diodo laser, mede-se o valor de  $T$  e determina-se o valor de  $a(T)$  e  $b(T)$ , com os quais pode-se determinar o valor de corrente que deve ser inserido para obter o comprimento de onda desejado  $\lambda = \lambda_{des}$  através da equação 4.66.

$$I(T) = (\lambda_{des} - b(T))/a(T), \quad (4.66)$$

A segunda proposta é implementar o controle da corrente em função do erro obtido para abertura do feixe do laser. De acordo com a equação 4.22 a abertura do feixe é proporcional a  $\lambda$ . Medindo-se a largura do sinal de imagem captado ( $D_e(\lambda)$ ), pode-se determinar qual a largura do feixe de laser. Desta forma, para manter o comprimento de onda fixo é possível estipular uma largura do sinal de imagem desejado ( $D_e(\lambda_{des})$ ) e realizar o controle da corrente em função do erro obtido ( $e = D_e(\lambda_{des}) - D_e(\lambda)$ ).

## 4.3 Resultados experimentais

### 4.3.1 Análise do ruído temporal

Esta seção tem como objetivo apresentar os resultados obtidos na análise do ruído temporal. Inicialmente é realizado um estudo sobre o tipo de ruído predominante no sinal. Em seguida são analisadas as influências da variação da temperatura ambiente, da corrente do *laser* e do tempo de integração sobre o sinal de imagem capturado.

O biossensor utilizado para análise foi o CAMBIO desenvolvido previamente [SOUZA FILHO; LIMA; NEFF, 2008; SOUZA FILHO, 2006]. Este biossensor possui uma configuração baseada no *biochip* da VIR [C.THISTRUP et al., 2004] com modo de interrogação angular. O fotosensor é unidimensional possuindo 1024 *pixels*. O módulo de aquisição do CAMBIO só possui 2KB de memória interna o que possibilita o armazenamento de apenas um quadro de imagem, pois cada quadro possui 1024 *pixels* e cada pixel utiliza 16 bits. Logo, é possível realizar apenas a soma de uma nova amostra com o valor anterior o que possibilita a realização de uma média de 16 amostras do sinal de imagem completa. Para que um novo quadro do sinal de

imagem seja adquirido é necessário enviar o quadro armazenado no módulo de aquisição para o PC o que limita o tempo de amostragem de dois sinais completos.

Por esta razão para analisar o ruído foi necessário modificar o *firmware* para que armazenasse apenas o *pixel* desejado. Desta forma, o tempo de amostragem reduz drasticamente ficando limitado ao tempo de integração permitido. O tempo de amostragem foi reduzido de 0,8s para 5,26ms. Com isto a faixa de frequência analisada se torna bem mais ampla permitindo uma análise mais precisa do comportamento do sinal.

Com o *firmware* modificado o tempo de integração utilizado foi de 5,26ms. Cada quadro adquirido corresponde a 1024 pontos obtidos para o mesmo *pixel* da câmera. O desvio padrão calculado em cada amostra é determinado sobre os 1024 pontos adquiridos. O tempo de amostragem de cada quadro ( $t_{hq}$ ) é limitado ao tempo de aquisição dos 1024 pontos, somados ao tempo necessário para transferir os dados correspondentes ao computador. O valor de  $t_{hq}$  foi de 11,5s.

A substância utilizada para a análise foi a água pura. Após a obtenção do sinal de referência para o ar, foi inserido a água no biossensor através da bomba peristáltica até o instante em que o nível do sinal se estabilizava. Para evitar a influência do fluxo sobre o biossensor a bomba foi desligada e o sinal obtido foi em relação a presença da água sobre o *biochip*.

### Determinação do ruído

O ruído predominante em biossensores SPR é apresentado na literatura como sendo o ruído *shot*. Este ruído possui desvio padrão proporcional a  $1/\sqrt{N}$ , onde  $N$  é o número de quadros utilizados para realizar a média do sinal. Na maioria dos biossensores existentes, o tratamento realizado sobre o sinal de imagem é a realização da média de  $N$  quadros para obtenção de uma amostra do sinal.

Para verificar se o sinal de imagem obtido está de acordo com a literatura foi realizada a análise do valor do desvio padrão  $\sigma$  em função de  $N$ . Como cada quadro possui apenas 1024 valores de um mesmo *pixel*, foram utilizados 3 quadros consecutivos do sinal para possibilitar a utilização de valores maiores para  $N$ . Apesar de existir um intervalo de 11,5s entre cada quadro, a variação de temperatura e de corrente é desprezível para o tempo total de aquisição dos três quadros.

Os valores armazenados para os três quadros foram agrupados em um vetor único  $x(n)$ . Para cada  $N$  pontos de  $x(n)$  foi realizada a média e criado um novo vetor  $X(k)$ . Sobre o vetor  $X(k)$  foi calculado o desvio padrão  $\sigma$ . O valor de  $N$  foi modificado de 1 até 700, calculando-se o valor de *sigma* correspondente para cada  $N$ . Os valores de *sigma* foram normalizados pelo maior valor obtido, gerando o gráfico dos dados experimentais ilustrado na Figura 4.22. O sinal teórico traçado foi calculado pela expressão  $1/\sqrt{N}$ .

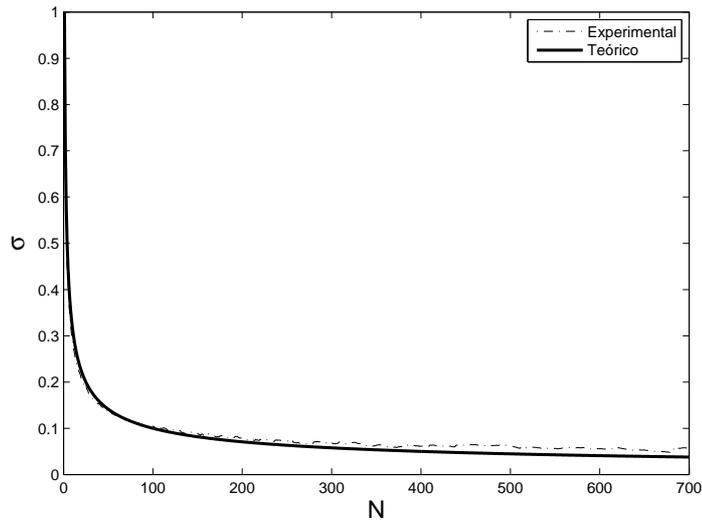


Figura 4.22: Desvio padrão do ruído em função do número de pontos utilizados para a média

Os valores experimentais obtidos seguem os valores teóricos demonstrando que o desvio padrão do ruído é proporcional a  $1/\sqrt{N}$ . Isto indica que o ruído predominante apresenta o comportamento do ruído *shot*. Quando utiliza-se valores de  $N$  superiores a 200, os valores experimentais começam a divergir dos teóricos. Este resultado está de acordo com a literatura, que é justificado pelo fato de que a realização da média não é capaz de remover o ruído correlacionado. Este ruído é de natureza espacial e não pode ser removido no domínio do tempo, necessitando de técnicas que utilizem os valores de *pixels* vizinhos para o tratamento do sinal. Em estudos anteriores foi demonstrado que a utilização de técnicas simples, para o tratamento de ruído espacial, pode minimizar significativamente o ruído do sinal [SOUZA FILHO, 2006].

O ruído temporal foi analisado no domínio da frequência através da FFT do sinal ilustrada no gráfico da Figura 4.23.

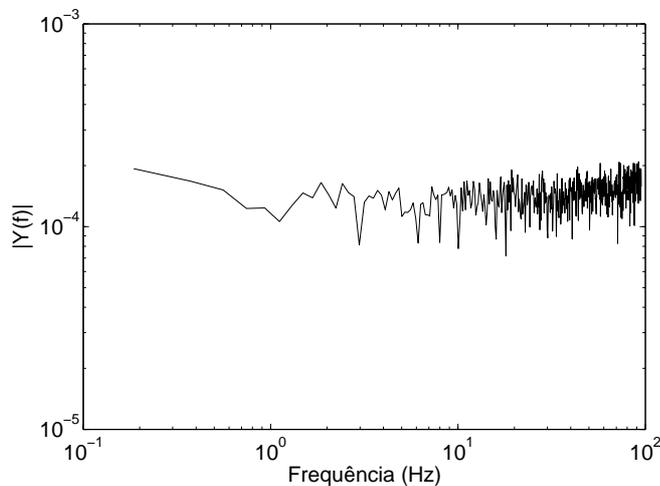


Figura 4.23: Análise no domínio da Frequência do Ruído do sinal

Na faixa de frequência analisada, os valores podem ser aproximados por uma reta constante no domínio da frequência o que indica um comportamento de ruído branco.

### Variação com a temperatura

É extremamente importante controlar a temperatura ou compensar a influência de seu efeito para garantir a qualidade da medição. Entretanto, controlar a temperatura de todos os componentes se torna praticamente inviável, por isso na maioria dos biossensores é controlada apenas a temperatura do *laser*. Para biossensores portáteis, um controle da temperatura faz com que o tempo de utilização da bateria seja limitado. Dessa forma é mais interessante compensar o efeito da variação da temperatura sobre a saída.

Nesta seção é descrito o experimento utilizado para avaliar o efeito da variação da temperatura sobre o sinal de imagem captado. Outro ponto analisado é a influência da temperatura sobre o controlador de corrente do *laser*. Este efeito é desprezado pela literatura. Apesar da referência de corrente ter sido mantida constante, como o controlador existente utiliza a realimentação do fotodiodo, o controle na verdade é sobre o nível de intensidade luminosa. Dessa forma quando existe variação de temperatura a corrente é modificada pelo controlador para manter constante a potência luminosa emitida.

A substância analisada foi a água pura, que foi mantida parada para evitar o efeito do fluxo sobre o *biochip*. A temperatura ambiente foi modificada na faixa de  $17^{\circ}\text{C}$  à  $25^{\circ}\text{C}$ .

O primeiro experimento realizado avalia a variação negativa da temperatura. A temperatura inicial era a ambiente que estava próxima à  $25^{\circ}\text{C}$ . Para variar a temperatura ambiente o sistema de condicionamento de ar foi acionado com referência de  $17^{\circ}\text{C}$ . A partir deste momento foram armazenados os valores da temperatura do *laser*  $T_{Laser}$ , da temperatura ambiente  $T_{Amb}$ , da temperatura no interior do equipamento, da corrente do *laser*  $I_{Laser}$  e do sinal de imagem captado pela câmera. O sinal de imagem é avaliado em função do valor médio  $V_m$  e do desvio padrão  $\sigma$ . Os sinais foram adquiridos por 2h13 apresentando um comportamento ilustrado pelos gráficos da Figura 4.24.

A diminuição da temperatura ambiente provoca uma diminuição da temperatura do *laser*, o que gera uma redução na corrente do *laser* para compensar a variação da intensidade de luz emitida. Apesar do controlador tentar manter constante a luz emitida pode-se verificar que o valor médio captado pela câmera aumenta com a diminuição de temperatura. Isto pode ser causado pelo aumento da intensidade luminosa, pelo aumento na sensibilidade da câmera ou pela influência do *biochip* e/ou componentes óticos. Admitindo que a intensidade está constante pela ação do controlador, este efeito é causado provavelmente pelo aumento na sensibilidade do fotodiodo da câmera.

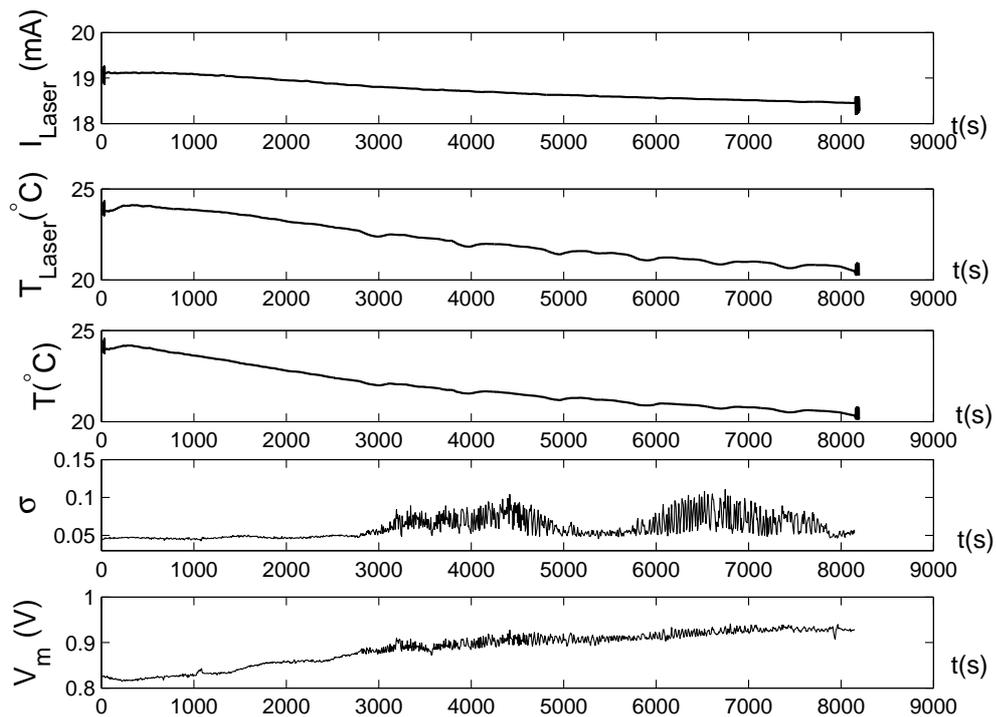


Figura 4.24: Variação do sinal do pixel com a diminuição da Temperatura

Pode-se verificar que após 3000s existem oscilações no valor da temperatura causadas pela atuação do sistema de condicionamento. Quando a temperatura ambiente passa a ser inferior a  $22^{\circ}\text{C}$  observa-se um aumento no nível de ruído, verificado pela alteração no valor do desvio padrão.

A sensibilidade do equipamento em relação à temperatura foi avaliada com o acréscimo do valor da temperatura, para comparar se a dinâmica da variação positiva é similar a variação negativa da temperatura. A temperatura inicial do ambiente de teste era de  $19,6^{\circ}\text{C}$  controlada pelo sistema de condicionamento. Para provocar um aumento na temperatura o sistema de condicionamento foi configurado com referência de  $30^{\circ}\text{C}$ . Os valores de tensão do *pixel* foram armazenados e posteriormente calculado o desvio padrão de cada amostra. Os comportamentos obtidos para os sinais estão ilustrados na Figura 4.25.

O aumento na temperatura provoca um aumento na corrente do *laser*, gerado pelo controlador para compensar a variação da intensidade de luz emitida. Apesar do aumento na corrente do *laser* pode-se verificar que o valor de tensão no *pixel* da câmera diminuiu. Este efeito pode ser atribuído a variação da sensibilidade da câmera.

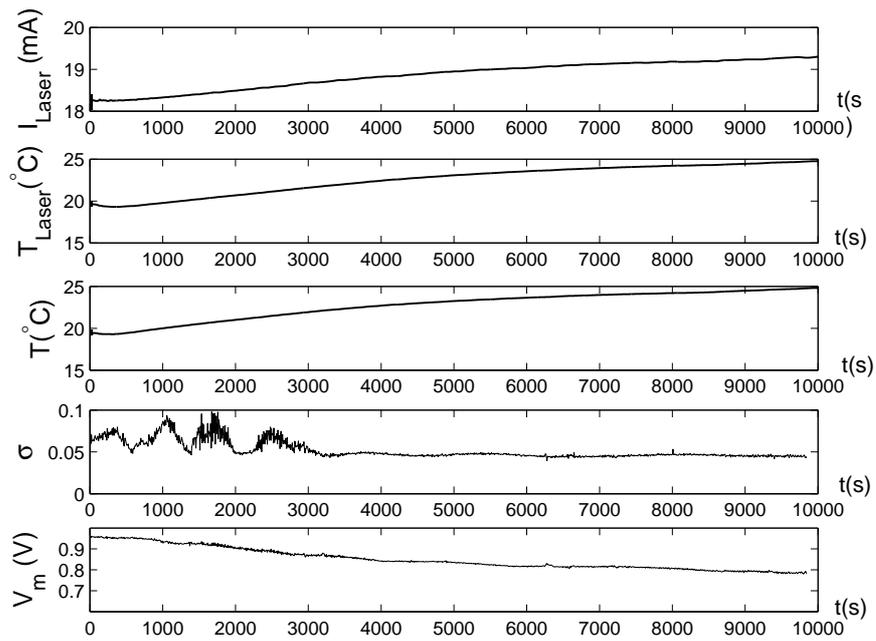


Figura 4.25: Variação do sinal do pixel com o aumento da Temperatura

O nível de ruído é elevado em temperaturas abaixo de  $22^\circ\text{C}$  assim como verificado no experimento ilustrado na Figura 4.24. Quando a temperatura passa de  $22^\circ\text{C}$  o nível de ruído diminui permanecendo praticamente constante.

Como o valor da corrente pode alterar a intensidade de luz emitida, se o controlador não estiver atuando adequadamente, a variação no valor captado pela câmera pode ser causada pela variação na intensidade de luz emitida. Por esta razão foi avaliada a variação na corrente do *laser* causada em função da temperatura, que está ilustrada na Figura 4.26.

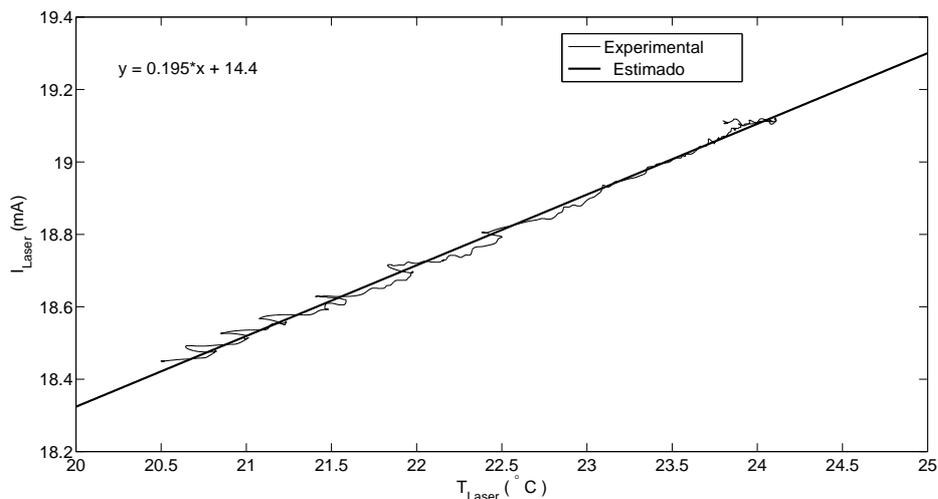


Figura 4.26: Comportamento da Corrente do Laser em função da Temperatura

Pode-se verificar que a relação entre a temperatura e a corrente do *laser* é linear e positiva. A

medida que a temperatura aumenta o valor da corrente do *laser* é incrementado pelo controlador.

O ruído do sinal também foi analisado no domínio da frequência. O sinal analisado é composto por um mesmo ponto de cada quadro adquirido, o que torna o tempo de amostragem igual a  $t_{hq}$ . Os quadros utilizados são referentes ao experimento da variação negativa de temperatura ilustrado na Figura 4.24. O espectro do sinal obtido está ilustrado na Figura 4.27.

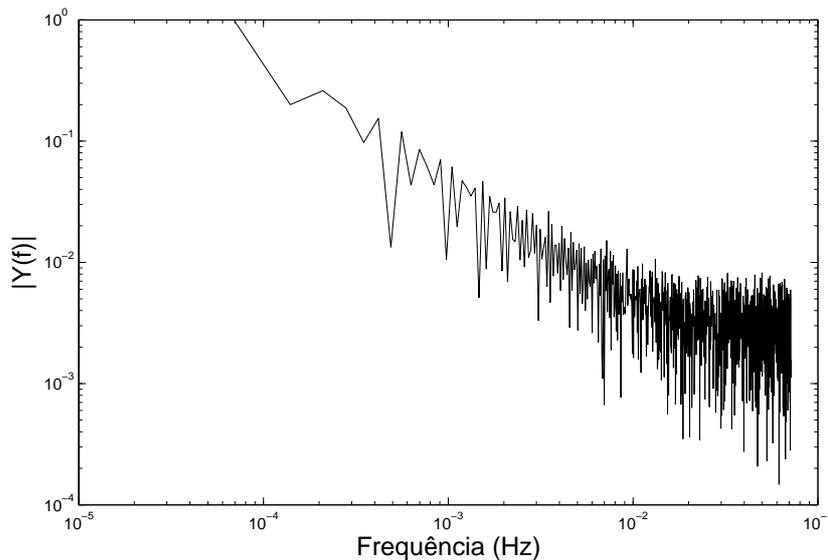


Figura 4.27: Comportamento no domínio da frequência da variação do sinal do pixel com a variação da temperatura

O resultado da análise no domínio da frequência indica que o ruído apresenta o comportamento de  $1/f$ . Para comprovar que este efeito é causado pela temperatura, calculou-se a transformada de Fourier para um único quadro adquirido. O tempo necessário para aquisição de um quadro é muito pequeno, logo a temperatura permanece constante. O comportamento no domínio da frequência obtido para ruído em apenas um quadro é de um ruído branco, similar ao apresentado na Figura 4.23.

Desta forma conclui-se que o efeito  $1/f$  é causado por variações da temperatura. Isto afeta a corrente do diodo *laser* e a sensibilidade da câmera. Logo, com o período de amostragem elevado existente nos biossensores convencionais, não é possível realizar uma análise fidedigna do ruído.

### Variação com a corrente

O sinal de imagem adquirido foi avaliado em função da variação do nível de corrente do diodo laser, com objetivo de verificar a mudança na intensidade do sinal captado e no nível do ruído obtido. O efeito da variação de corrente sobre o ruído do sinal é avaliado através do desvio padrão  $\sigma$ . A temperatura ambiente foi mantida constante em  $24^{\circ}\text{C}$  para evitar a influência do efeito térmico sobre o equipamento.

A corrente do *laser* foi modificada no intervalo de  $12,9\text{mA}$  até  $26,4\text{mA}$ , pois valores superiores levam a saturação da câmera utilizada. O comportamento obtido para o valor médio da intensidade do pixel ( $V_m$ ) e do desvio padrão ( $\sigma$ ) está ilustrado na Figura 4.28.

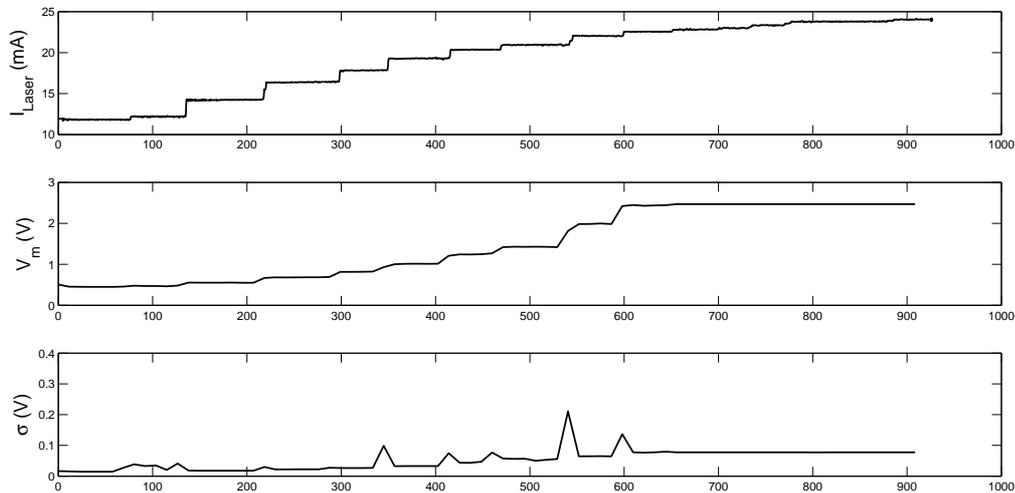


Figura 4.28: Variação do Sinal de Imagem em função da Corrente

Pode-se verificar, nos gráficos da Figura 4.28, que o aumento da corrente provoca um acréscimo no valor médio do sinal e no desvio padrão obtido. A elevação no valor da corrente provoca um aumento da potência luminosa emitida pelo *laser* e conseqüentemente no valor de intensidade captado pela câmera. Para correntes superiores a  $22,8\text{mA}$  não observa-se variação em  $V_m$  e  $\sigma$  devido à saturação do sinal do *pixel* na câmera CMOS.

Os picos visualizados no desvio padrão são correspondentes aos instantes de modificação na intensidade da corrente. Isso é causado por um fenômeno conhecido como "mode hopping" ou seja, o modo ressonante na cavidade do laser muda subitamente para o próximo modo ressonante causando uma variação abrupta de comprimento de onda

A variação do valor da intensidade do *pixel*, provocada pela mudança na corrente do diodo *laser* está ilustrada na Figura 4.29. Só foram incluídos valores de corrente até  $22\text{mA}$  para desconsiderar o efeito de saturação, que é uma limitação proveniente da câmera.

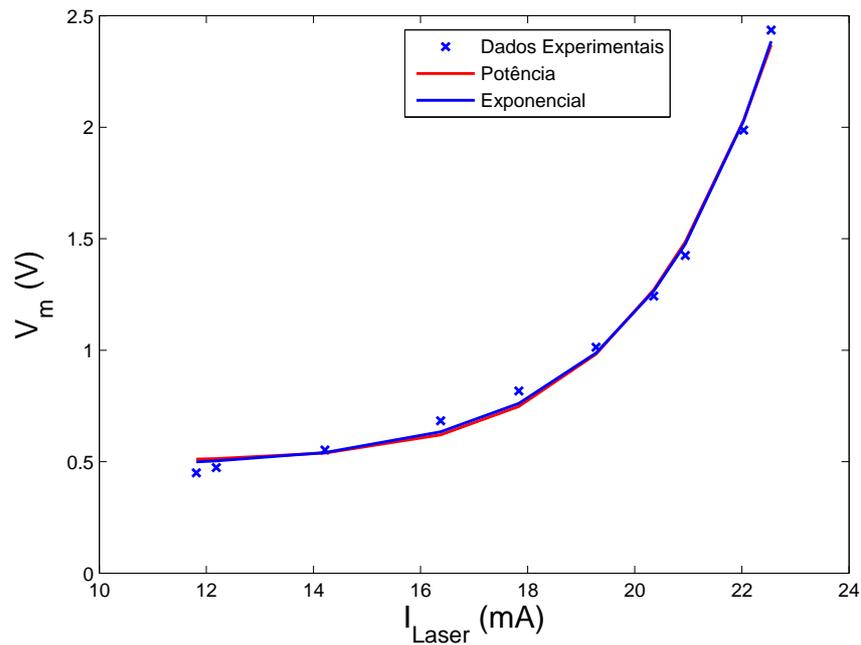


Figura 4.29: Valor médio do sinal do pixel em função do valor da corrente do laser

Os valores obtidos experimentalmente podem ser aproximados através de uma curva exponencial ou de uma potência. Os dados experimentais foram ajustados obtendo-se as equações  $V_m = a \cdot (I_{Laser}(mA))^b + c$  ( $a = 3,314e - 012$ ,  $b = 8,684$ ,  $c = 0,5046$ ) e  $V_m = a \cdot e^{b \cdot I_{Laser}(mA)} + c$  ( $a = 0,0002203$ ,  $b = 0,4022$  e  $c = 0,4741$ ). A relação entre a corrente do *laser* e o nível de ruído sobre o *pixel* obtido está ilustrada na Figura 4.30.

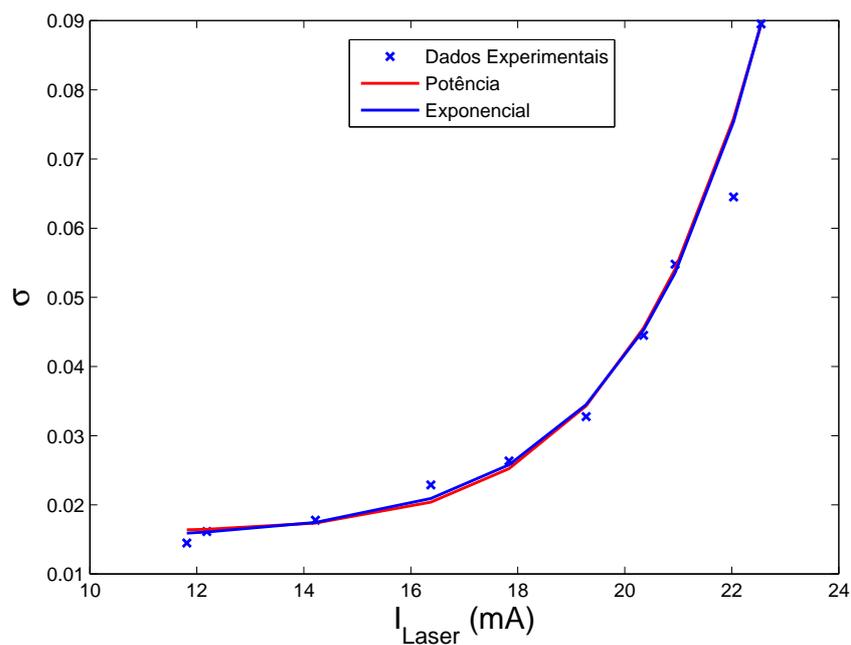


Figura 4.30: Desvio padrão do sinal do pixel em função do valor da corrente do laser

O valor de  $\sigma$  apresenta um comportamento similar a  $V_m$ , descrevendo uma função que pode ser aproximada por uma exponencial ou uma potência de  $I$ . As equações encontradas foram  $V_m = a \cdot (I_{Laser}(mA))^b + c$  ( $a = 6,36e - 014$ ,  $b = 8,914$ ,  $c = 0,01617$ ) e  $V_m = a \cdot e^{b \cdot I_{Laser}(mA)} + c$  ( $a = 7,184e - 006$ ,  $b = 0,4101$  e  $c = 0,01501$ ).

Pode-se verificar que com o aumento da corrente existe um acréscimo no nível do ruído, com taxa de variação crescente de acordo com a corrente. Apesar de existir um nível de tensão maior no *pixel* com o aumento da corrente o ruído obtido também aumenta. Isto demonstra que este ruído não é causado predominantemente pela influência do conversor AD utilizado, mas por oscilações na fonte de luz.

O valor de corrente do diodo *laser* afeta diretamente a potência ótica emitida e consequentemente o nível do sinal captado pela câmera. A intensidade do feixe de luz também altera a variação do comprimento de onda e da variação angular do feixe. O ruído do sinal depende fortemente da quantidade de *fótons* incidentes em cada *pixel* da câmera, consequentemente do valor médio do sinal. Para avaliar se a resposta obtida está de acordo com os resultados apresentados na literatura, foi traçada a relação entre o valor médio do sinal e o desvio padrão do ruído ilustrada na Figura 4.31.

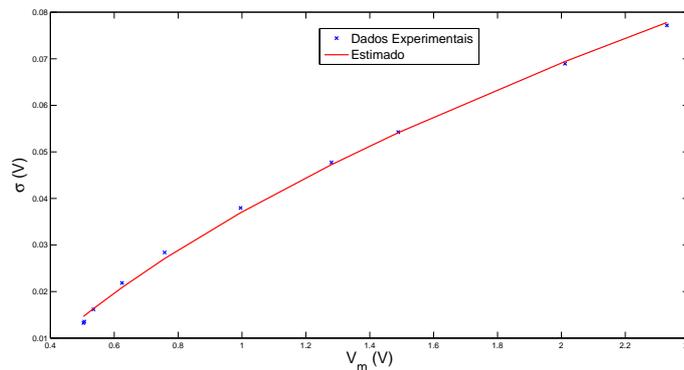


Figura 4.31: Desvio padrão do sinal do pixel em função do valor médio

Os dados experimentais obtidos foram aproximados através de um ajuste de curva pela expressão da equação 4.67.

$$\sigma = a \cdot \sqrt{b \cdot V_m} + c. \tag{4.67}$$

Os valores encontrados para os coeficientes da equação 4.67 foram  $a = 0,08429$ ,  $b = 0,8408$  e  $c = -0,0402$ . A equação obtida para magnitude do ruído está de acordo com a apresentada na literatura para o ruído *shot*, que é apontado com o ruído predominante do sistema.

A alteração no valor da corrente pode influenciar no comprimento de onda  $\lambda$  da luz emitida pelo diodo *laser*. Esta alteração provoca uma variação na curva SPR e consequentemente gera um erro na medição do índice de refração. É necessário verificar a relação entre a corrente do

*laser* e o comprimento de onda para analisar se a variação de corrente, causada pela mudança na temperatura, influencia na medição do sinal ou se este efeito é desprezível.

### Variação com o tempo de integração

Uma maneira de se modificar o nível de sinal captado pela câmera é através da alteração do tempo de integração. O tempo de integração não influencia na fonte de luz e nem na resposta do *biochip*, pois altera apenas a frequência de aquisição da câmera utilizada. Desta forma é possível minimizar o ruído sem a necessidade de alterações nas partes óticas do instrumento.

Para avaliar a influência da variação do tempo de integração no nível do sinal, o experimento foi realizado com temperatura constante de  $23,5^\circ$  e corrente de  $19mA$ . O tempo de integração foi ajustado na faixa permitida pelo equipamento que varia de  $5,4 \times 10^{-3}s$  até  $13,2 \times 10^{-3}s$ . Para cada tempo de integração foram obtidos 10 quadros e calculados os valores médios para os parâmetros avaliados. Em cada quadro foram adquiridos 1024 pontos do sinal de tensão do *pixel* analisado, sobre os quais foram calculados o valor médio da tensão ( $V_m$ ) e o desvio padrão correspondente ( $\sigma$ ). O comportamento do sinal para a variação do tempo de integração está ilustrado na Figura 4.32.

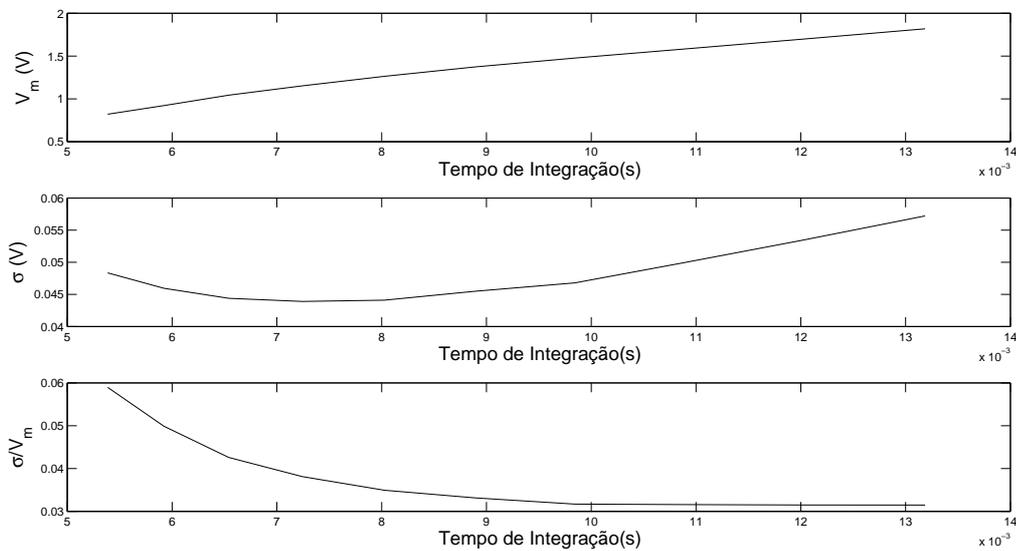


Figura 4.32: Variação do sinal do pixel em função do tempo de integração

O aumento do tempo de integração provoca um acréscimo no valor de  $V_m$ , pois permite a captura de mais fótons pelo fotodiodo da câmera. A relação entre o tempo de integração e  $V_m$  é praticamente linear na região avaliada, estando de acordo com a equação 4.54 e 4.55. O nível de ruído diminui até aproximadamente  $8ms$ . A partir deste instante o ruído aumenta com o acréscimo do tempo de integração. De acordo com o modelo de transferência de fótons o tempo de integração aumenta tanto o ruído escuro, calculado na equação 4.61, quanto a variância do

número de fótons que atinge o fotodetector. Logo o resultado obtido está de acordo com o modelado pela equação 4.60.

O terceiro gráfico da Figura 4.32 ilustra o desvio padrão proporcional ao nível do sinal, obtido pela razão de  $\sigma$  por  $V_m$ . Pode-se verificar que o desvio proporcional diminui com o aumento do tempo de integração, indicando que o sinal é menos ruidoso a medida que se eleva o tempo de integração, pois apresenta uma relação sinal ruído mais elevada.

### 4.3.2 Caracterização do diodo *laser*

Para caracterizar o diodo *Laser*, foi utilizado um espectrômetro da Ocean Optics (USB4000) [OPTICS, 2008] alinhado com o feixe de luz na saída do diodo *laser*. A corrente e temperatura do diodo *laser* foram controladas através do controlador ICT 102 da Thorlabs [THORLABS, 2006]. O sinal foi adquirido através do *software* Ocean View e processado através do Matlab.

Foram realizados experimentos para avaliar o comportamento da intensidade do feixe de luz e do espectro do *laser* em função da corrente de injeção e da temperatura. O experimento para avaliar o comportamento em relação a temperatura foi realizado ajustando-se o valor da temperatura no controlador e adquirindo-se o espectro pelo *software* Ocean View. Para avaliar a variação em relação a corrente, a cada valor de temperatura o valor da corrente foi incrementado e adquirido o respectivo espectro.

#### Varição da intensidade luminosa

O comportamento da intensidade máxima do *laser* em função da corrente e da temperatura obtido está ilustrado na Figura 4.33.

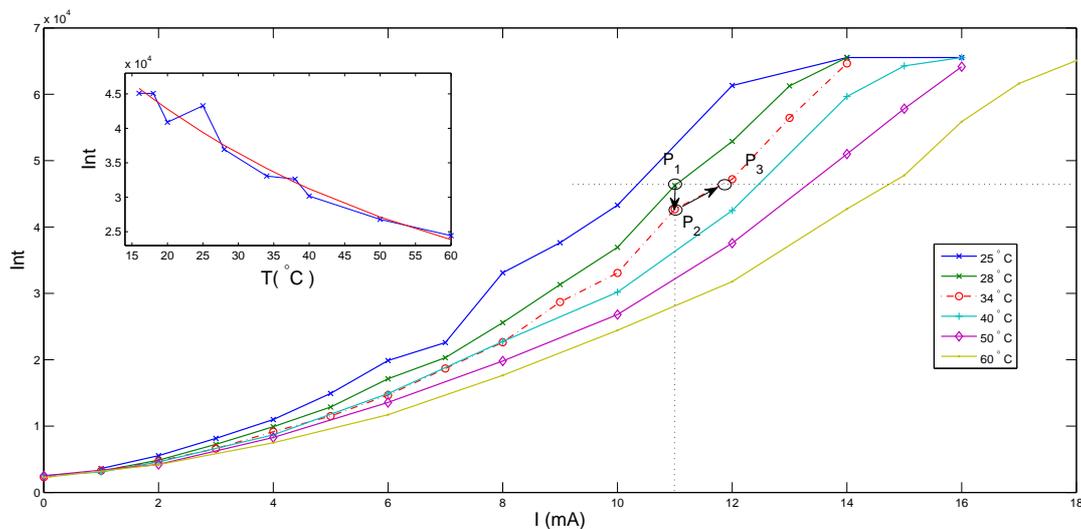


Figura 4.33: Variação da Intensidade Luminosa do *Laser* em função da Corrente para as temperaturas de 16°C 25°C 40°C 60°C

Pode-se observar que o valor da intensidade varia exponencialmente em relação à corrente de injeção, resultados similares ao verificado para o sinal adquirido pela câmera ilustrado na Figura 4.29. Este comportamento está de acordo com o modelo do diodo *laser* obtido através das equações de taxa. A partir do valor de  $12mA$  o espectrômetro começa a saturar para alguns valores de temperatura, o que limita uma análise mais detalhada. Quando existe um acréscimo no valor de temperatura a curva se torna mais suave, apresentado um acréscimo menos acentuado no valor da intensidade quando se eleva o valor da corrente. O comportamento da intensidade em função da temperatura pode ser visualizado no gráfico ilustrado na Figura 4.34.

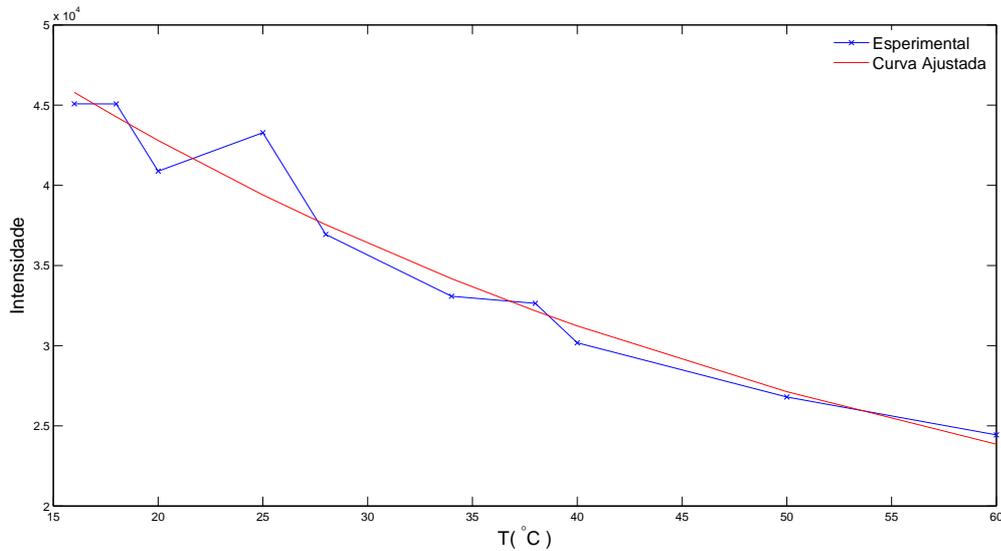


Figura 4.34: Variação da Intensidade Luminosa do *Laser* em função da Temperatura para uma corrente de  $10mA$

A curva da Figura 4.34 foi obtida com um valor de corrente fixo em  $10mA$ . Pode-se observar que existe um decaimento no valor da intensidade em função do acréscimo do valor da temperatura. Este comportamento foi aproximado por uma função exponencial  $I = a \times e^{b \times T / T_{ref}} + c$ . Para uma temperatura de referência  $T_{ref} = 25^{\circ}C$ , os valores para os coeficientes foram :  $a = 5,008 \times 10^4$ ,  $b = -0,5612$  e  $c = 1,083 \times 10^4$ .

### Variação do espectro

Além da variação da intensidade luminosa do diodo *laser*, existe uma modificação no espectro de frequência da luz emitida em função da temperatura e da corrente do diodo *laser*. O *laser* apresenta um espectro de luz com comportamento gaussiano de intensidade em relação ao comprimento de onda. Para avaliar a variação do comprimento de onda em relação à temperatura, a corrente do diodo foi mantida constante em  $10mA$  e adquiridos os espectros para temperaturas entre  $16^{\circ}C$  e  $60^{\circ}C$ . Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4.35.

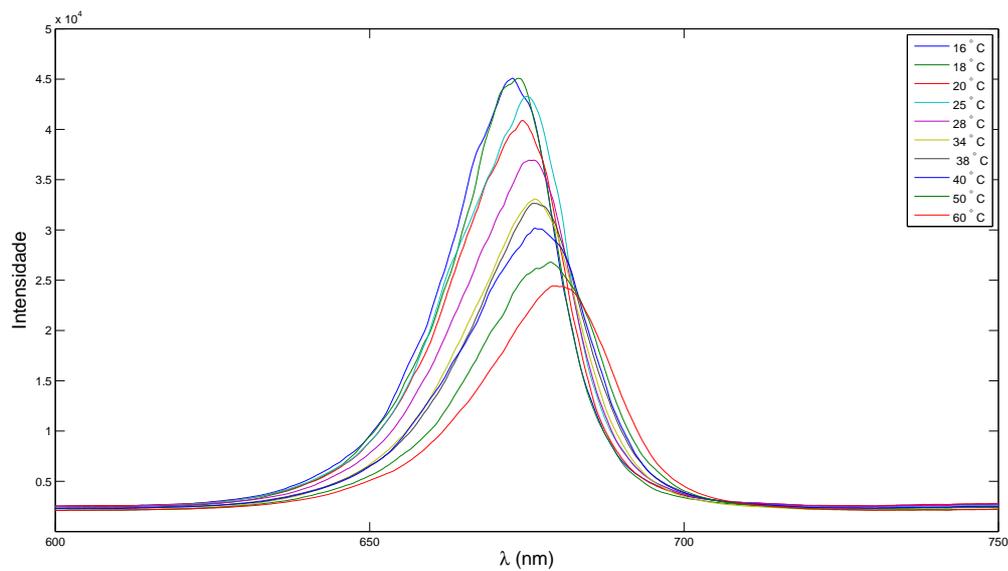


Figura 4.35: Variação do espectro de luz do diodo *Laser* em função da temperatura para uma corrente de 10mA

Analisando a Figura 4.35, verifica-se que existe uma diminuição na intensidade luminosa e um deslocamento do comprimento de onda principal com o aumento no valor da temperatura do *laser*. A variação obtida para o comprimento de onda de intensidade máxima está ilustrada na Figura 4.36.

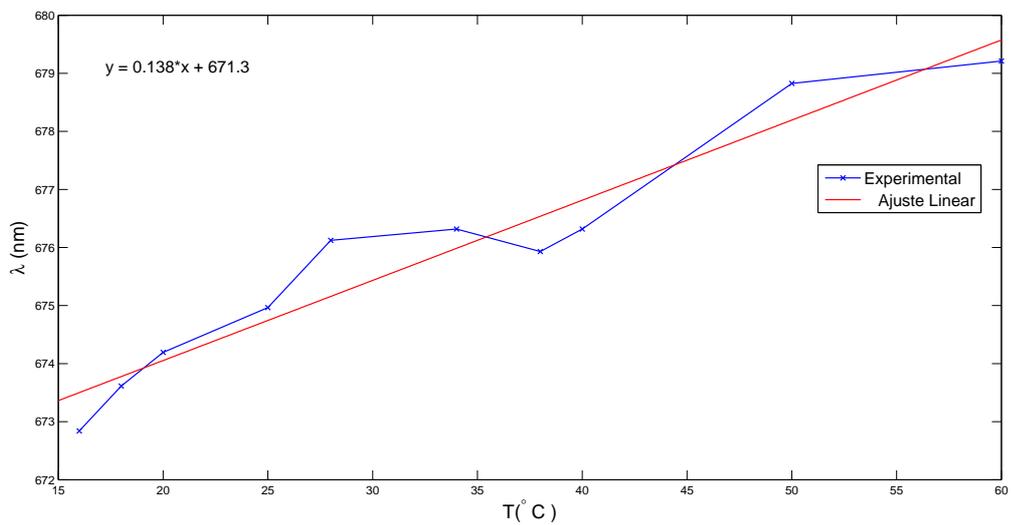


Figura 4.36: Variação do comprimento de onda principal do *Laser* em função da Temperatura

Pode-se observar que o comprimento de onda  $\lambda$  aumenta linearmente com o acréscimo da temperatura. Este resultado está de acordo com o apresentado anteriormente na literatura [BYRNE; KEATING, 1989]. A variação encontrada foi de  $0,138\text{nm}/^\circ\text{C}$ , o que está próximo de valores apresentados em manuais de diodos *laser*. Não foi possível obter o comportamento da curva

para temperaturas menores que  $16^{\circ}\text{C}$ , em função da limitação do controlador de temperatura utilizado.

Além da variação em função da temperatura, foi analisado a variação do espectro em função da corrente do diodo *laser*. A temperatura foi mantida em  $25^{\circ}\text{C}$  e a corrente incrementada em intervalos de  $1\text{mA}$ . Os resultados dos espectros obtidos estão ilustrados na Figura 4.37.

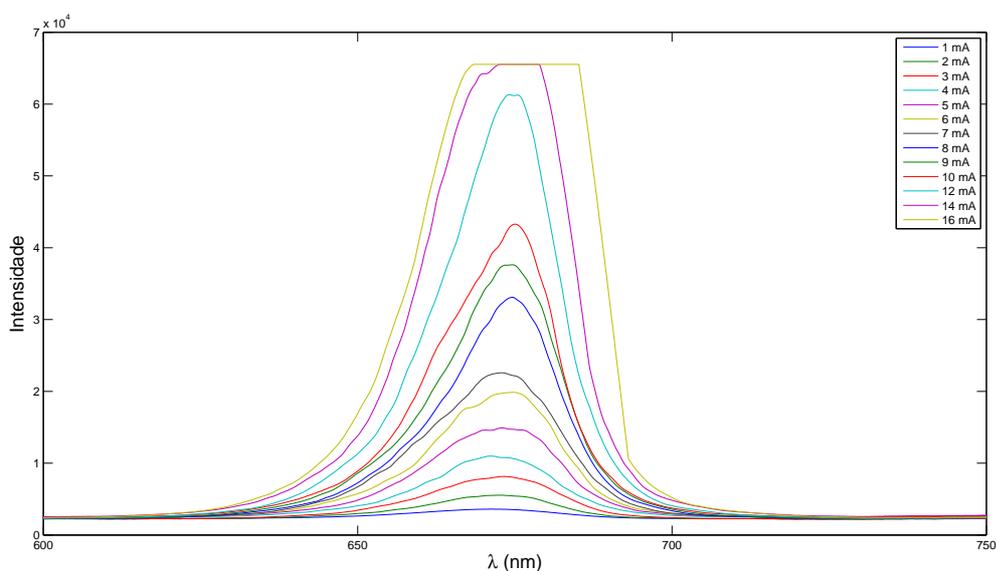


Figura 4.37: Variação espectro de luz do diodo *Laser* em função da corrente para temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$

A partir de uma corrente de  $14\text{mA}$  o espectrômetro começa a saturar, o que limitou uma análise para corrente superiores a  $16\text{mA}$ . O comportamento do comprimento de onda de intensidade máxima  $\lambda_{Max}$  em função da variação de corrente está ilustrado na Figura 4.38.

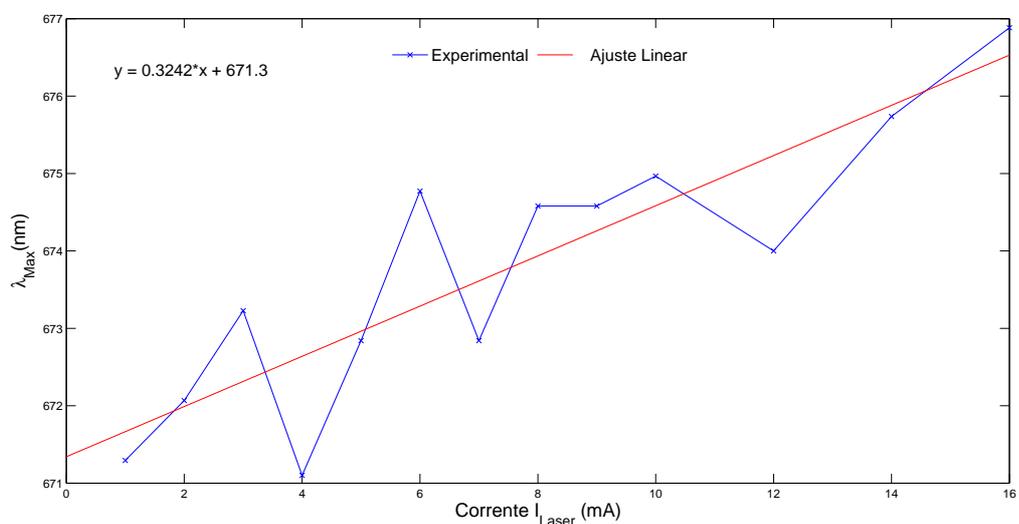


Figura 4.38: Variação do comprimento de onda principal do *Laser* em função da Corrente

É possível observar na Figura 4.38 que o comprimento de onda apresenta uma variação positiva e linear em função do valor da corrente do diodo *laser*. A cada  $1mA$  obteve-se um acréscimo de  $0,3242nm$ .

### 4.3.3 Compensação do diodo *laser*

De acordo com os resultados obtidos, ilustrados nas Figuras 4.35 e 4.37, a variação de  $\lambda$  em função da temperatura e da corrente pode ser aproximada por uma reta. Logo para, compensar o efeito causado por  $T$  na modificação do espectro, obteve-se a equação que determina o comportamento da variação de  $\lambda_{max}$  em função de  $I$  para diferentes temperaturas. Em seguida determinou-se a modificação dos coeficientes da reta que determina  $\lambda_{max}(I) = a(T) \cdot I + b(T)$ . A partir dos valores de  $a(T)$  e  $b(T)$  encontra-se facilmente o valor de  $I$  para manter o valor de  $\lambda_{max}$  constante ( $\lambda_{max} = \lambda_{des}$ ) para uma determinada faixa de variação de  $T$ , que pode ser determinado através da equação 4.66.

Para o laser utilizado os valores dos coeficientes foram  $a(T) = 0,2075T + 666,6643$  e  $b(T) = -0,0040T + 0,3610$  considerando o valor de  $\lambda$  em  $nm$ .

Utilizando a configuração tradicional por controle de intensidade do feixe de luz com o diodo laser no ponto de operação  $P_1$  ( $I = 11mA$  a uma temperatura  $T = 28^\circ C$ ), ilustrado na Fig.4.33, se existir uma mudança de temperatura para  $T = 34^\circ C$ , o ponto de operação se desloca para  $P_2$  ( $T = 34^\circ C$  e  $I = 11mA$ ) alterando o valor de intensidade do feixe. O controlador aumenta o valor de  $I$  para compensar a variação no valor da intensidade deslocando o ponto de operação para  $P_3$  ( $T = 34^\circ C$  e  $I = 11,8mA$ ). Apesar do valor de intensidade ser o mesmo para  $P_1$  e  $P_3$ , observa-se na Fig. 4.39 que existe um deslocamento no espectro obtido, provocando uma mudança no valor de  $\lambda$  de  $\lambda_1 = 676,1nm$  para  $\lambda_3 = 677,3nm$ .

Utilizando a primeira proposta apresentada no diagrama da Fig. 4.21, a ação de controle obtida em 4.66 para manter  $\lambda = 676.1nm$  dentro da faixa de  $20^\circ C \leq T \leq 40^\circ C$  está ilustrada no gráfico inserido na Fig. 4.39. Se o sistema está a  $T = 28^\circ C$  ( $P_1\lambda$  com  $I = 14.66mA$ ) e sofre uma mudança para  $T = 34^\circ C$  o controlador diminui o valor da corrente para  $I = 10.69mA$  (ponto  $P_2\lambda$ ). Observa-se na Fig. 4.39 que apesar de existir uma diminuição na intensidade o valor de  $\lambda$  não se altera.

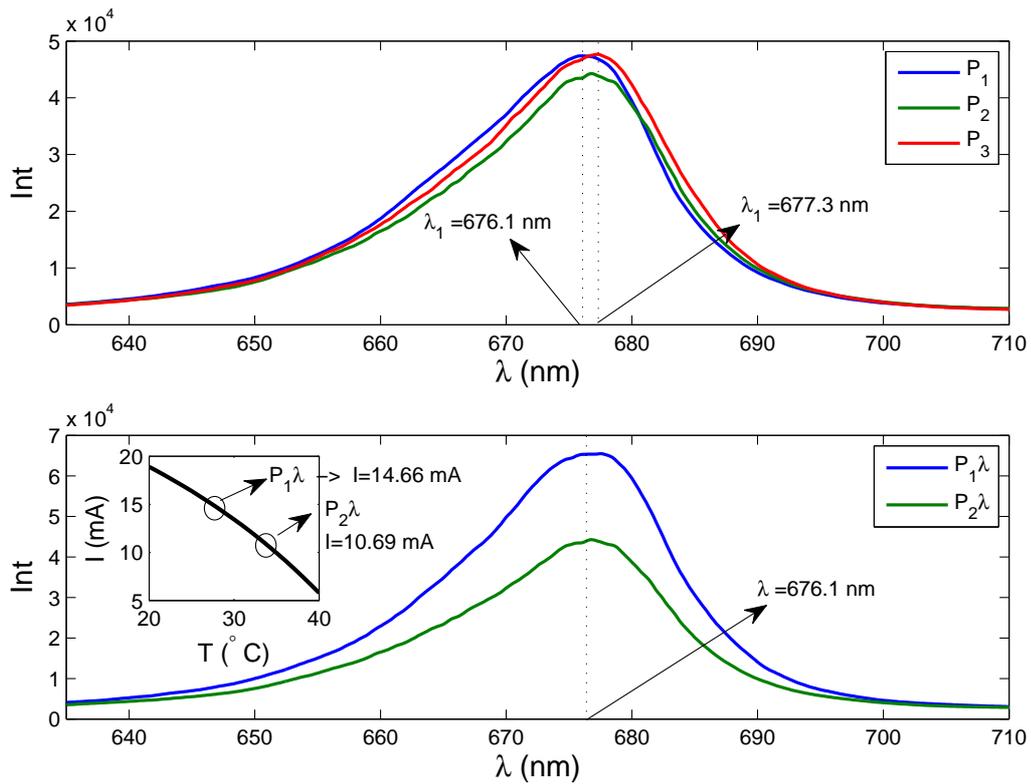


Figura 4.39: Variação do Ponto de operação com controle de potência ótica e com controle do comprimento de onda

## 4.4 Conclusões

Neste capítulo foram apresentados os resultados experimentais obtidos durante a realização deste projeto. Foi realizada uma análise do comportamento do ruído no domínio da frequência, constatando-se que a predominância era de um ruído branco de acordo com o mencionado na literatura.

Para superar as limitações existentes, foi realizada uma modificação no *firmware* que controlava a aquisição do sinal de imagem. Ao invés de adquirir todo o quadro de 1024 pontos da imagem, o *firmware* foi modificado para adquirir apenas o sinal de *pixel*. Desta forma conseguiu-se reduzir drasticamente o tempo de amostragem de 0,8s para 5,26ms, o que possibilitou a aquisição de pontos suficientes em um intervalo curto com variação de temperatura desprezível.

O comportamento em relação à variação de temperatura foi analisado alterando-se a temperatura de toda a sala através do sistema de condicionamento de ar. Foi verificado que existe uma relação linear entre a temperatura e corrente do diodo *laser*, causada pela ação do controlador do diodo *laser* para tentar manter constante a potência ótica. Com o tempo de amostragem reduzido, foi provado que o comportamento  $1/f$  do ruído só existia com alteração do valor de

temperatura.

O comportamento em relação à variação de corrente apresentou resultados assim como o esperado para a média do sinal e desvio padrão do ruído. O valor médio apresentou comportamento exponencial em função da corrente de injeção, o que está de acordo com o valor teórico para potência ótica do diodo *laser* obtido pelas equações de taxa. O ruído obtido apresentou comportamento do ruído *shot*.

Com relação ao tempo de integração, obteve-se uma relação praticamente linear do valor médio e desvio padrão do sinal adquirido. Este comportamento é previsto pelo modelo de transferência de fótons do padrão EMVA 1288.

Além da análise do ruído foi realizada a caracterização do diodo *laser* em função da variação de corrente e temperatura. Foi constatado o comportamento do aumento da potência luminosa em função da corrente de injeção assim como o esperado. Com relação ao acréscimo da temperatura observou-se um decaimento exponencial da intensidade luminosa.

O espectro de luz do diodo *laser* também sofreu variação em função da corrente e temperatura. Observou-se que o comprimento de onda  $\lambda$  máximo do espectro cresce linearmente a uma taxa de  $0,138nm/^{\circ}C$  com o aumento da temperatura e de  $0,3242nm/mA$  com o acréscimo da corrente de injeção.

# Capítulo 5

## Projeto da solução embarcada

Este capítulo descreve o projeto da solução proposta para transformar um dispositivo computacional portátil comercial existente em um biossensor SPR. Será apresentada a arquitetura proposta, o desenvolvimento da estrutura mecânica utilizada, a elaboração do *software* de aquisição e análise. Para validar a solução proposta foram realizados ensaios experimentais para análise de substâncias inorgânicas e de proteínas.

### 5.1 Arquitetura

Um biossensor SPR necessita de uma fonte de luz, fotodetectores, unidade de processamento e interface com usuário de acordo com ilustrado na Figura 2.5. A configuração proposta substitui estes itens convencionais por um dispositivo computacional portátil que já possui estas configurações. A arquitetura proposta está ilustrada na Figura 5.1.

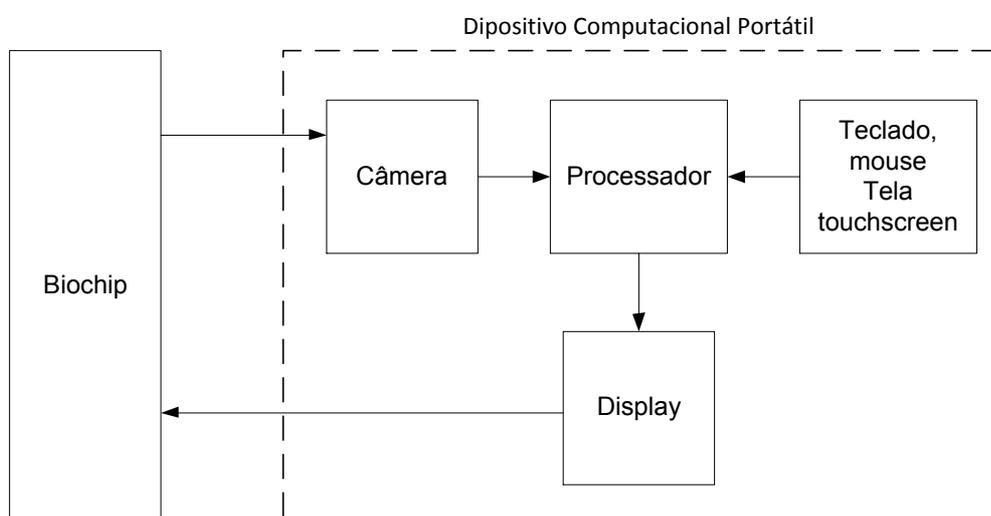


Figura 5.1: Arquitetura de Hardware do Sistema Proposto

A fonte de luz, o processador, a interface com o usuário e os fotodetectores estão presentes no próprio dispositivo computacional portátil.

O feixe de luz pode ser gerado pela própria tela do dispositivo, que é formada por uma matriz de fotodiodos, ou pelo *flash* existente na parte de trás de alguns *smartphones* e *tablets*. As telas atuais possuem alta resolução e brilho elevado, possibilitando a geração do feixe de luz adequado para excitar o efeito SPR. Além disto, é possível utilizar cores diferentes o que altera os comprimentos de onda existentes no feixe de luz.

Quando utilizada a tela para gerar o feixe de luz, os fotodetectores utilizados são a câmera frontal. A câmera posterior é utilizada como fotodetector quando o feixe de luz for gerado pelo *flash* da câmera.

A unidade de processamento é o próprio processador existente no dispositivo portátil. Os *smartphones* e *tablets* atuais apresentam um poder de processamento elevado, com até 8 núcleos que operam em frequência superior a  $2GHz$ .

A interface com o usuário é formada pelas telas sensíveis ao toque, botões e teclados existentes em alguns dispositivos e até mesmo a possibilidade de comando por voz ou movimento.

O transdutor físico químico escolhido foi o EAOD (Elemento de Acoplamento Ótico de Difração) da VIR, o mesmo das montagens convencionais utilizadas para análise morfológica e de ruído descritas nos capítulos 3 e 4, que foi explicado em detalhes anteriormente [C.THISTRUP et al., 2004]. A célula de fluxo e o transdutor são os únicos componentes externos ao dispositivo computacional portátil.

Para validar a estrutura proposta foi escolhido o *smartphone* Galaxy SIII como dispositivo computacional portátil. No início do desenvolvimento deste trabalho o SIII era um dos *martphones* mais completos existentes. O SIII apresenta uma série de características que o tornam adequado para ser utilizado como biossensor, dentre as quais pode-se destacar:

- um processador (Exynos) com quatro núcleos de  $1,4GHz$  cada;
- uma tela sensível ao toque super AMOLED de 4,8 polegadas com  $720 \times 1280$  pixels e 16 milhões de cores;
- uma câmera principal, localizada na parte de trás, de 8 Mp  $3264 \times 2448$  pixels;
- uma câmera auxiliar frontal de 1,9Mp com  $960 \times 1280$  pixels;
- um sistema operacional aberto (Android).

## 5.2 Estrutura mecânica

O equipamento proposto transforma um dispositivo computacional portátil em um biossensor SPR, sem o uso de qualquer dispositivo óptico ou fonte de luz externa. Como na configuração inicial foi escolhido um *smartphone*, a estrutura mecânica foi projetada de forma a compor um *case* a ser acoplado ao *smartphone*.

Foram desenvolvidas duas configurações sendo a primeira um suporte de mesa e a segunda uma capa, similar as comerciais, que pode ser acoplada ao *smartphone* como um acessório capaz de transformá-lo em um biossensor.

### 5.2.1 Suporte de Mesa

Para o protótipo da primeira configuração, optou-se por um *case* de mesa com estrutura modular que permitisse alterações, trocas de peças e regulagens para facilitar a realização de experimentos. O *case* foi produzido com o polímero ABS (Acrylonitrile Butadiene Styrene) através de uma impressora 3D. A Figura 5.2 ilustra a interação entre a configuração mecânica confeccionada e os dispositivos do biossensor.

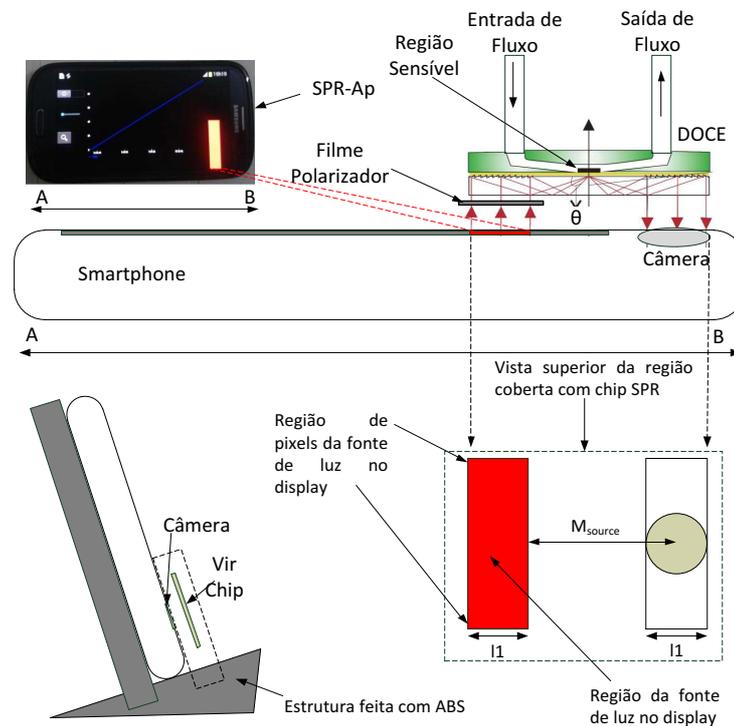


Figura 5.2: Estrutura Mecânica

No *case* existe um anteparo para sustentação do *smartphone*, um suporte para o transdutor físico químico e célula de fluxo. O transdutor e a célula de fluxo são fixados dentro do suporte, posicionado paralelamente ao SIII, que faz parte do *case* confeccionado. O anteparo para

*smartphone* e o suporte para célula de fluxo e transdutor são encaixados em uma base inclinada, com objetivo de facilitar a utilização da tela sensível ao toque durante a operação do sistema.

Na visão superior (AB), com mesma inclinação do anteparo do *smartphone*, ilustrada na Figura 5.2, pode-se identificar o posicionamento do transdutor em relação a fonte de luz e o fotodetector. A fonte de luz é gerada pela tela do SIII e incide perpendicularmente no transdutor físico químico. Para garantir condições apropriadas para excitar o efeito SPR, a luz emitida pela tela do *smartphone* passa através de um filme polarizador como indicado na Figura 5.2. A luz é direcionada pelo transdutor até a região central onde está presente a superfície sensível formada pela camada bioquímica. Como a luz polarizada incide na superfície do EAOD a 90 graus, o ângulo de incidência  $\theta$  é definido pela grade de difração existente no transdutor. A luz refletida é direcionada até a saída e captada pela câmera do SIII. Sobre a região central do transdutor está posicionada a célula de fluxo que permite a passagem da substância a ser analisada até a superfície sensível.

A fonte de luz é gerada através da criação de uma imagem retangular com a cor desejada. As dimensões do retângulo criado são as mesmas da entrada de luz do transdutor. A saída de luz do transdutor é posicionada no centro da câmera, que fica a uma distância  $M_{source}$  da fonte de luz. Este valor corresponde à distância entre o centro da saída de luz e a borda da entrada de luz no transdutor. É possível visualizar detalhes do *case* projetado através da visão em perspectiva ilustrada nas Figura 5.3.

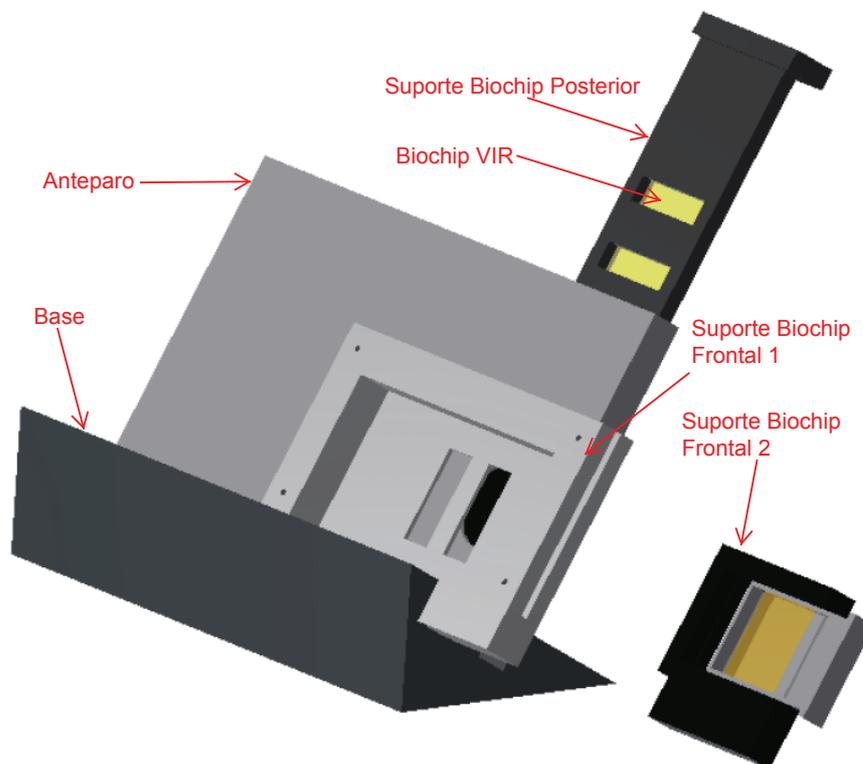


Figura 5.3: Estrutura Mecânica desenvolvida em ABS para o *case* de mesa

O anteparo e suporte para o *biochip* frontal são encaixados na base através de uma fenda existente na parte superior da base. Optou-se pela modularidade dos componentes para facilitar a troca e permitir testes com diferentes configurações e estruturas. Dessa forma é possível utilizar tanto o *biochip* da VIR como o *biochip* trapezoidal [MOREIRA et al., 2009], apenas substituindo o suporte para o *biochip* 1 (confeccionado para acoplar o *biochip* da VIR) pelo suporte 2 (confeccionado para acoplar o *biochip* trapezoidal). Os suportes frontais permitem a utilização do transdutor com a fonte de luz gerada pela tela do SIII e captada pela câmera frontal. O suporte para o *biochip* Frontal 1 teve que passar por várias configurações até atingir uma configuração eficiente. A configuração ilustrada na Figura 5.3 foi projetada para acoplar uma estrutura de alumínio que se encaixa ao *biochip* da VIR. Esta configuração foi necessária pois o ABS apresentou deformação ao fixar a célula de fluxo sobre o *biochip*. Isto é devido à espessura da camada do suporte existente após o *biochip*, que deve ser pequena para diminuir a distância da saída da fonte de luz até a câmera. A célula de fluxo frontal, tampa, suporte de alumínio e *biochip* utilizados estão ilustrados na Figura 5.4.

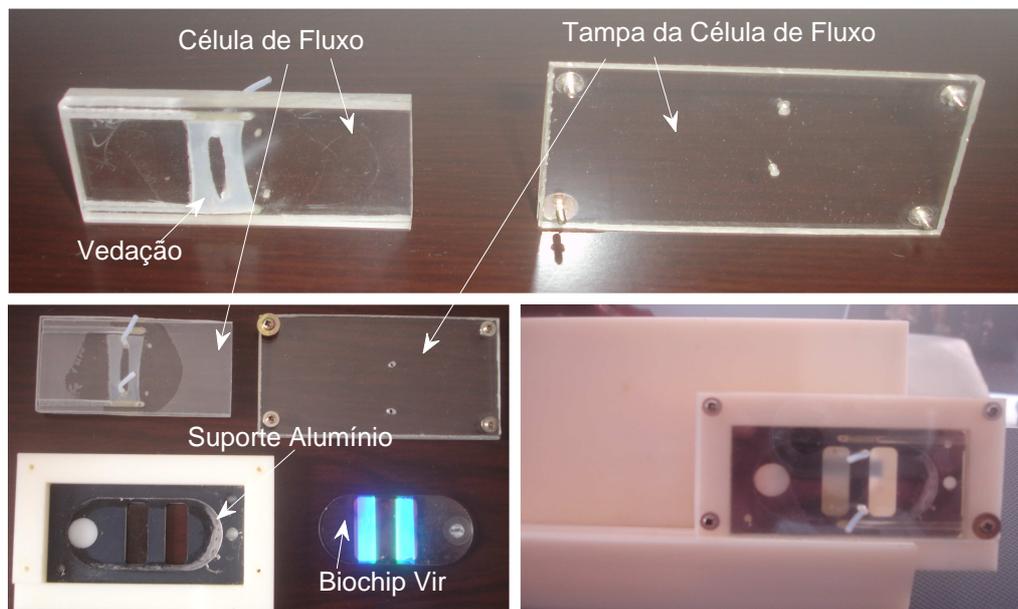


Figura 5.4: Célula de fluxo frontal, tampa da célula de fluxo, suporte de alumínio e *biochip* da VIR

A célula de fluxo frontal foi construída manualmente a partir de uma placa de acrílico. Foi recortado um retângulo com dimensões do suporte frontal no qual foram realizados dois furos para entrada e saída do fluido. Estes furos estão localizados de forma a ficarem alinhados com

a região sensível do *biochip* da VIR. Em cada furo foi fixado um tubo com cola araldite para evitar vazamentos. A vedação no lado que entra em contato com o *biochip* foi realizada através da confecção de uma junta de silicone. Para fixar a célula de fluxo no suporte frontal foi confeccionada uma tampa de acrílico presa ao suporte através de quatro parafusos nas extremidades.

Para utilizar a câmera posterior, optou-se por construir um suporte removível para o *biochip* da VIR que se encaixa no próprio anteparo. O *biochip* trapezoidal não foi utilizado com a câmera posterior por limitações de dimensões, que não são compatíveis com a distância entre o *flash* e a câmera. Na vista posterior ilustrada na Figura 5.5 pode-se observar a disposição dos componentes utilizados.

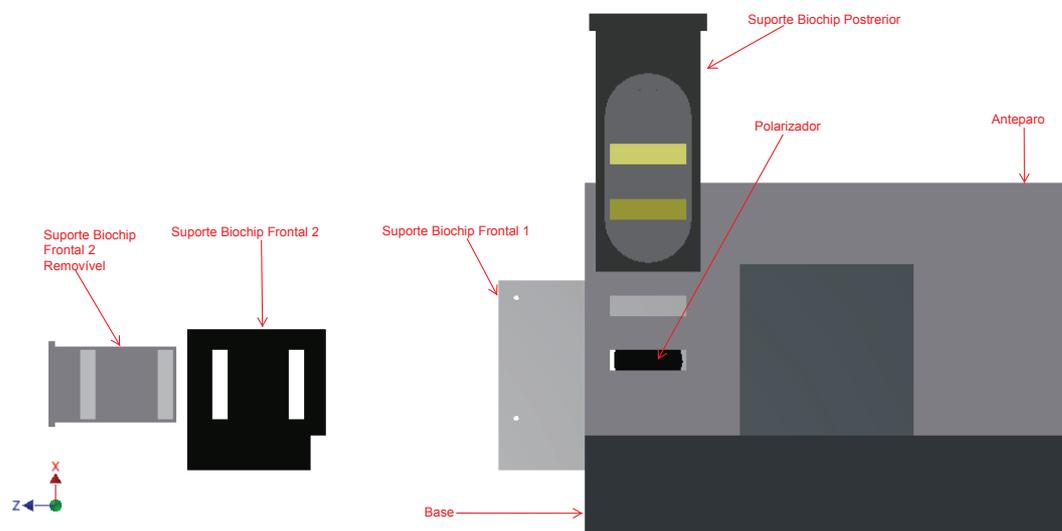


Figura 5.5: Visão posterior da estrutura mecânica desenvolvida em ABS para o *case* de mesa

O *Biochip* é encaixado no suporte posterior, que pode ser removido deslocando-o para cima. Na parte anterior do anteparo, na região da entrada de luz, existe um rebaixo circular onde é fixado um polarizador. A entrada e saída de luz foram posicionadas entre a localização do *flash* e o centro da câmera posterior do SIII. A célula de fluxo é fixada no anteparo, ficando posicionada sobre o suporte posterior quando deslocado completamente para baixo.

A estrutura final confeccionada está ilustrada na Figura 5.6, através das visões Frontal, Posterior e Laterais. Na visão em perspectiva, apresentada na Figura 5.7, é possível visualizar a disposição dos componentes confeccionados já com o *smartphone* acoplado ao suporte.

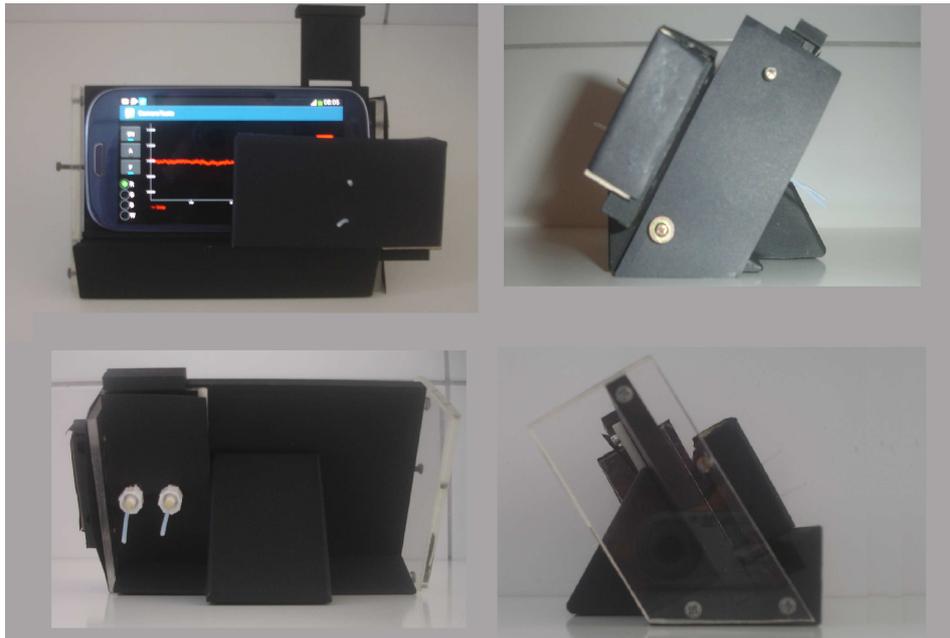


Figura 5.6: Estrutura mecânica para o *case* de mesa nas visões frontal, laterais e posterior

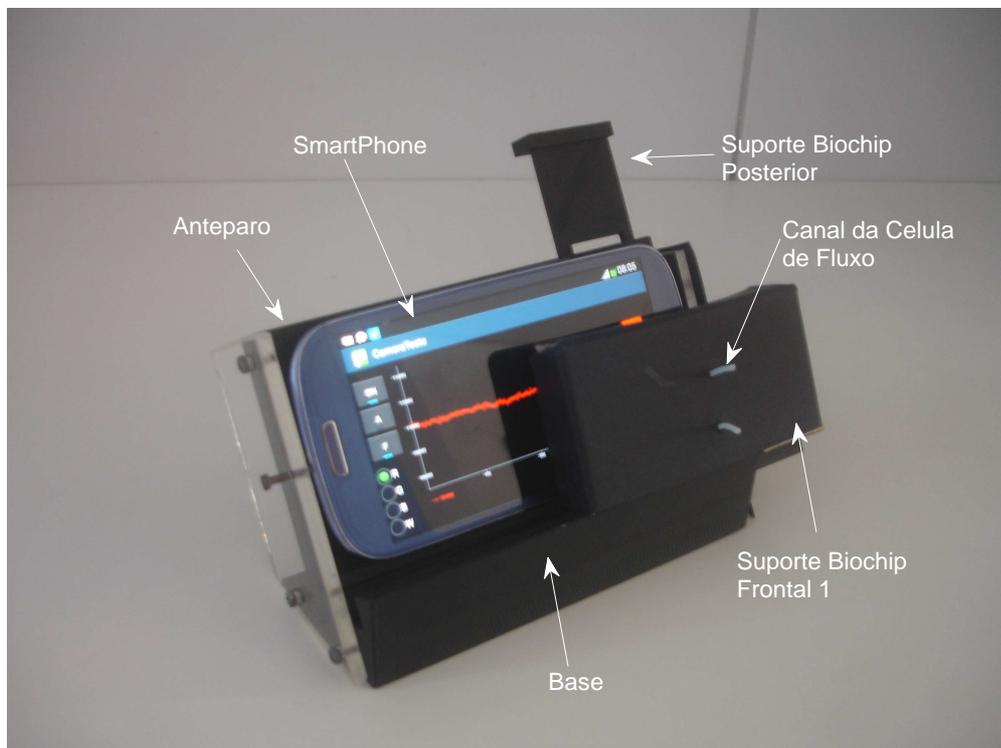


Figura 5.7: Visão em perspectiva da montagem final para o *case* de mesa

Pode-se perceber que existe espaço suficiente para que o usuário possa manipular os dispositivos de controle da interface, além de visualizar os resultados obtidos. O suporte do *biochip* frontal 1 ocupa um espaço considerável, pois foi projetado para atender as dimensões originais do *biochip* da VIR. Entretanto existe a possibilidade de redução no tamanho cortando-se a parte do *biochip* da VIR que não possui deposição de ouro.

## 5.2.2 Estrutura tipo Capa

A estrutura tipo capa desenvolvida foi projetada para acoplar todos os componentes, permitindo uma fácil remoção para agilizar uma manutenção eventual. Analogamente ao suporte de mesa descrito na seção 5.2.1, a estrutura tipo capa permite a utilização da câmera frontal e posterior do *smartphone* assim como a possibilidade de utilização de *biochips* diferentes. A Figura 5.8 ilustra a estrutura desenvolvida.

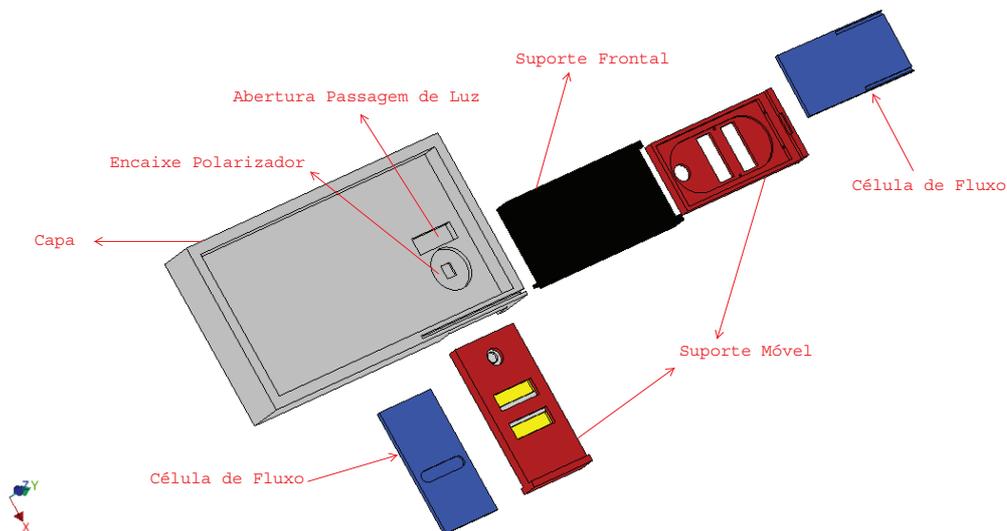


Figura 5.8: Visão em perspectiva da estrutura mecânica para a estrutura tipo Capa

A Capa que envolve o *smartphone* possui na parte frontal uma fenda que permite o encaixe do suporte frontal, uma abertura na região posterior para entrada do suporte móvel, um encaixe para posicionar o polarizador e uma abertura que permite a imagem refletida pelo *biochip* ser captada pela câmera.

O suporte frontal é uma peça para sustentação do suporte móvel, com finalidade de utilização da fonte de luz gerada através da tela do *smartphone*. O suporte móvel encaixa no suporte frontal similarmente a uma gaveta, de forma que é facilmente removível pelo usuário para troca do *biochip* e ou célula de fluxo. O *biochip* é encaixado no suporte móvel e em seguida colocada a célula de fluxo sobre o *biochip*.

Para utilização do led do *flash* como fonte de luz foi criado um rebaixo no formato circular para encaixar o polarizador em frente ao *flash*. Alinhado com a câmera do *smartphone* e com a

posição de retorno da luz refletida pelo *biochip*, foi criada uma abertura para permitir a passagem da luz até a câmera. Na região posterior da Capa foi criada uma abertura no formato gaveta para encaixar o conjunto suporte móvel, *biochip* e célula de fluxo que é o mesmo utilizado para o suporte frontal. A visão frontal de todas as peças confeccionadas e do *biochip* da VIR está ilustrada na Figura 5.9.

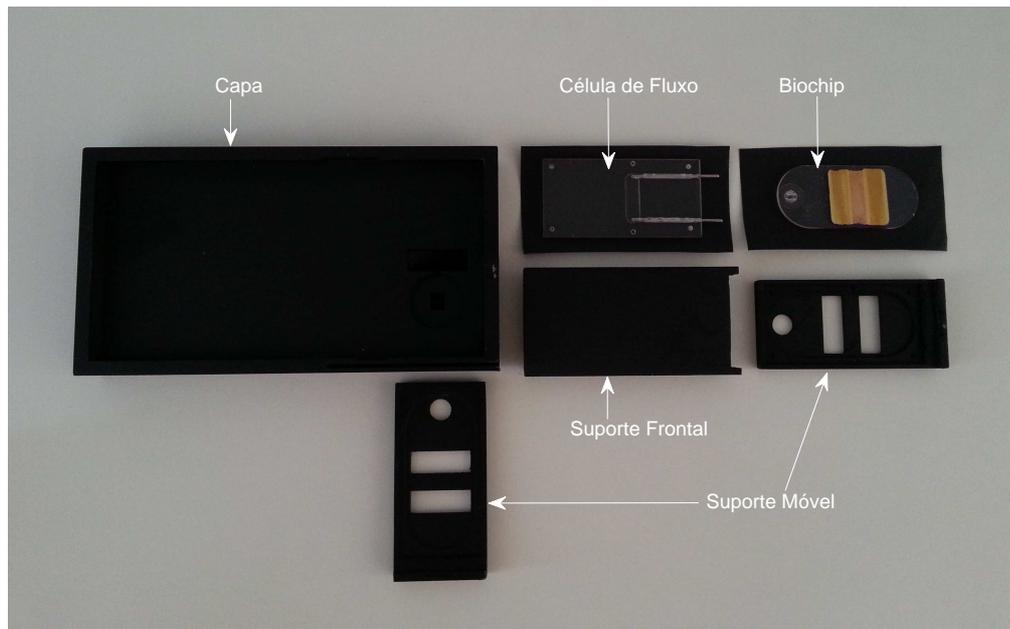


Figura 5.9: Visão frontal dos componentes da estrutura mecânica para o modelo tipo Capa

A célula de fluxo foi criada com acrílico de  $2\text{mm}$  de espessura. O canal para passagem do fluxo foi confeccionado através de um rebaixe feito na própria estrutura de acrílico. A entrada e saída do fluido é realizada por dois tubos de agulha de seringa posicionados lateralmente em relação ao canal. A vedação é realizada através de uma junta de silicone fixada ao redor do canal. A visão posterior das peças confeccionadas está ilustrada na Figura 5.10.

O *smartphone* é encaixado na Capa que o envolve completamente mantendo uma rigidez ao equipamento. O suporte frontal encaixa na fenda existente na Capa e permite a colocação do conjunto do suporte móvel, *biochip* e célula de fluxo. A fixação do *biochip* no suporte móvel em conjunto com a célula de fluxo, proporciona uma maior liberdade e facilidade de manipulação para eventual troca ou verificação. Pode-se visualizar na Figura 5.11 que esse conjunto é facilmente colocado no suporte frontal ou na região posterior, para a utilização da tela ou do led do *flash* como fonte de luz.

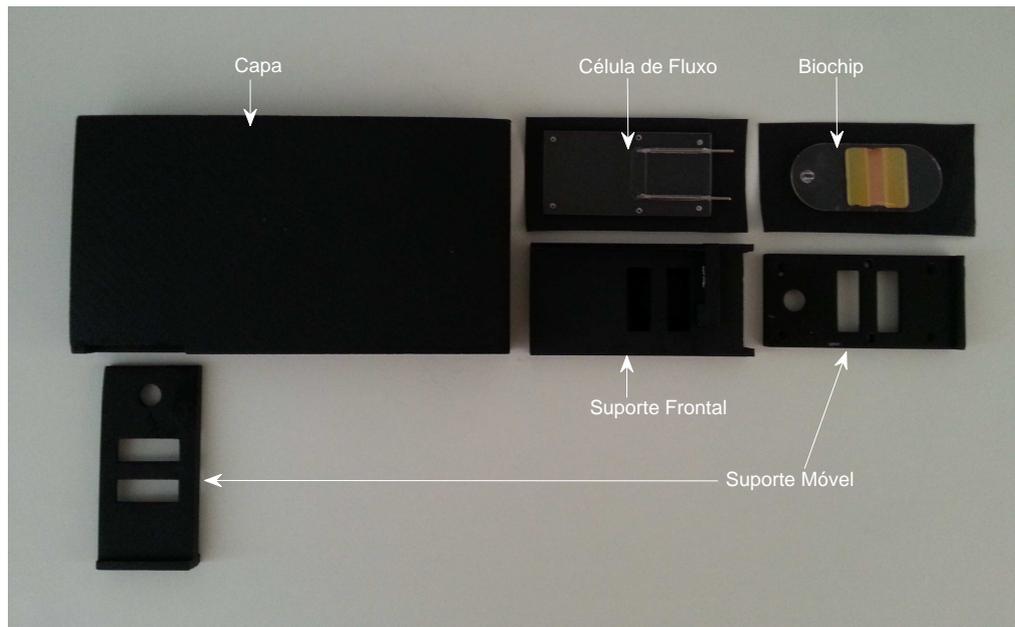


Figura 5.10: Visão posterior dos componentes da estrutura mecânica para o modelo tipo Capa

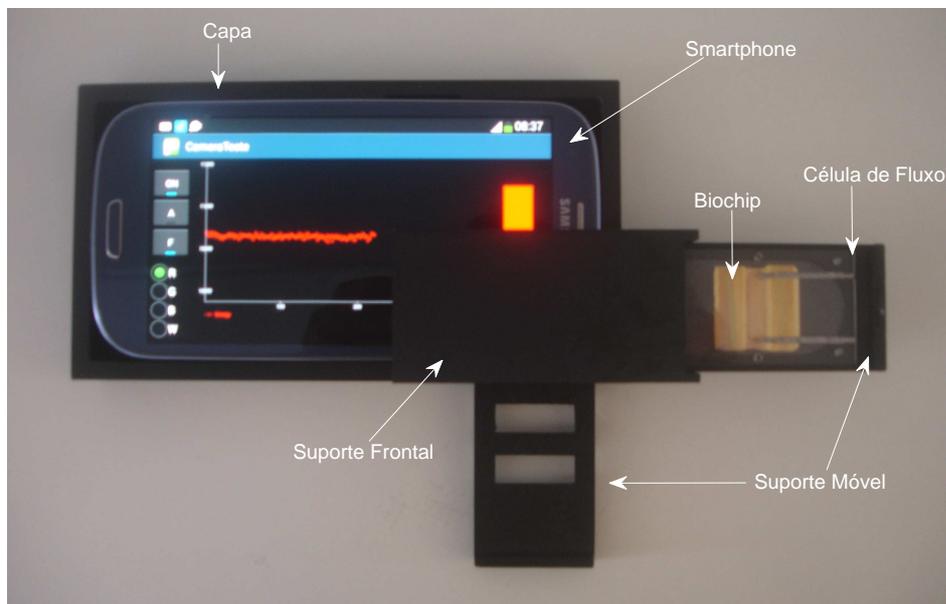


Figura 5.11: Visão frontal da montagem para o modelo tipo Capa com os suportes móveis abertos

A montagem final de todos os componentes proporciona uma solução compacta e prática, o que permite uma portabilidade ao biossensor e custo reduzido. A Figura 5.12 ilustra a montagem da solução proposta em forma de Capa.

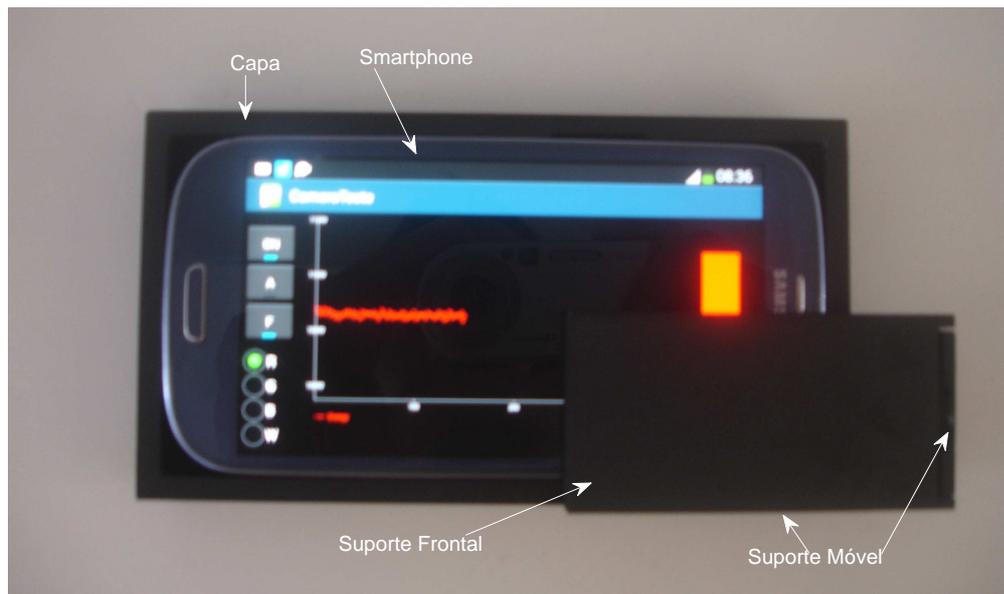


Figura 5.12: Visão frontal da montagem completa da estrutura mecânica para o modelo tipo Capa

## 5.3 Software

Com objetivo de realizar a aquisição e processamento dos dados foi desenvolvido um aplicativo para o sistema operacional Android. O Android é o sistema operacional do *smartphone* escolhido SIII, possuindo uma plataforma aberta que é empregada em vários dispositivos e fabricantes diferentes. O aplicativo foi desenvolvido utilizando-se o Eclipse como plataforma de desenvolvimento e o SDK do Android 4.3.

O aplicativo gera a imagem que proporciona a fonte de luz na cor desejada, controla a aquisição da imagem refletida pelo transdutor, realiza o armazenamento e processamento das informações, mostrando os valores calculados na tela para visualização do usuário.

### 5.3.1 Interface

A interface com usuário foi desenvolvida com objetivo de permitir a operação de forma simples e intuitiva, fornecendo a evolução temporal dos valores processados na tela do dispositivo. A interface do aplicativo desenvolvido para o *smartphone* está ilustrada na Figura 5.13, obtida através de imagens do próprio *smartphone* enquanto o aplicativo estava em operação.

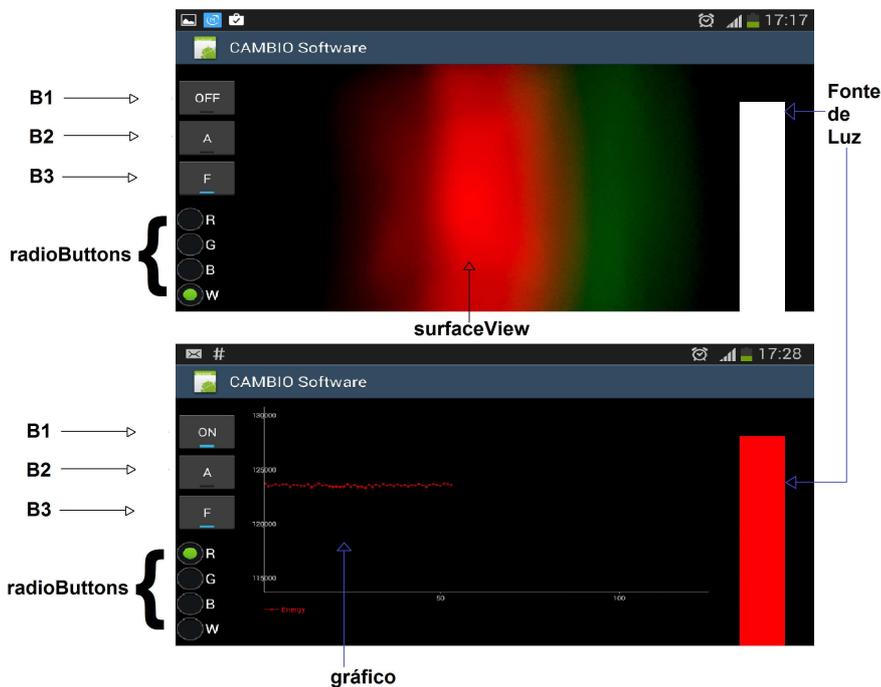


Figura 5.13: Interface gráfica do aplicativo desenvolvido

A fonte de luz foi gerada através de um retângulo criado com dimensões e posição compatível com a entrada do EAOD do *biochip* da VIR. A cor do preenchimento da imagem para geração da fonte de luz é alterada através de elementos do tipo **radioButton** localizados a esquerda da tela. Na versão desenvolvida até o momento optou-se por escolher apenas entre as três componentes primárias (vermelho (R), verde (G) e azul (B)) e a luz branca (W). A imagem captada é previamente visualizada na região central através de uma **SurfaceView**. Na Figura 5.13 a imagem captada é proveniente da luz refletida pelo *biochip* gerada pela imagem preenchida pelo branco puro. Pode-se perceber na imagem captada que existe uma decomposição das componentes de cores que é causada pela grade de difração do *biochip*. No momento que o programa está em operação a pré-visualização da imagem captada é substituída pelo gráfico que ilustra a evolução temporal dos dados processados. É possível observar, na imagem inferior ilustrada na Figura 5.13, a evolução dos dados captados do sinal de referência utilizando-se como fonte de luz a imagem do vermelho puro.

Foram criados na tela principal três botões: o primeiro (B1) define se o aplicativo está no modo de operação ou parado, o segundo (B2) entre calibração e aquisição e o terceiro botão (B3) é utilizado para escolher qual das câmeras será utilizada para captura da imagem (frontal ou posterior).

### 5.3.2 Descrição do funcionamento

Na versão do *software* desenvolvida até o momento optou-se por utilizar a técnica mais simples porém eficiente para determinação da saída que correspondesse a variação do índice de refração efetivo da substância analisada. Como demonstrado no capítulo 3, o valor da energia  $E_{sig}$  pode facilmente ser obtido através do sinal bruto da imagem captada para a substância analisada, sem a necessidade de normalização pelo sinal de referência. Logo, para a versão atual utilizou-se o valor de  $E_{sig}$  para indicação da evolução temporal das substâncias analisadas. A imagem bruta referente à substância analisada é salva no cartão de memória do dispositivo móvel, permitindo uma análise posterior com outras técnicas em um computador pessoal. A Figura 5.14 ilustra o diagrama de estados do aplicativo desenvolvido.

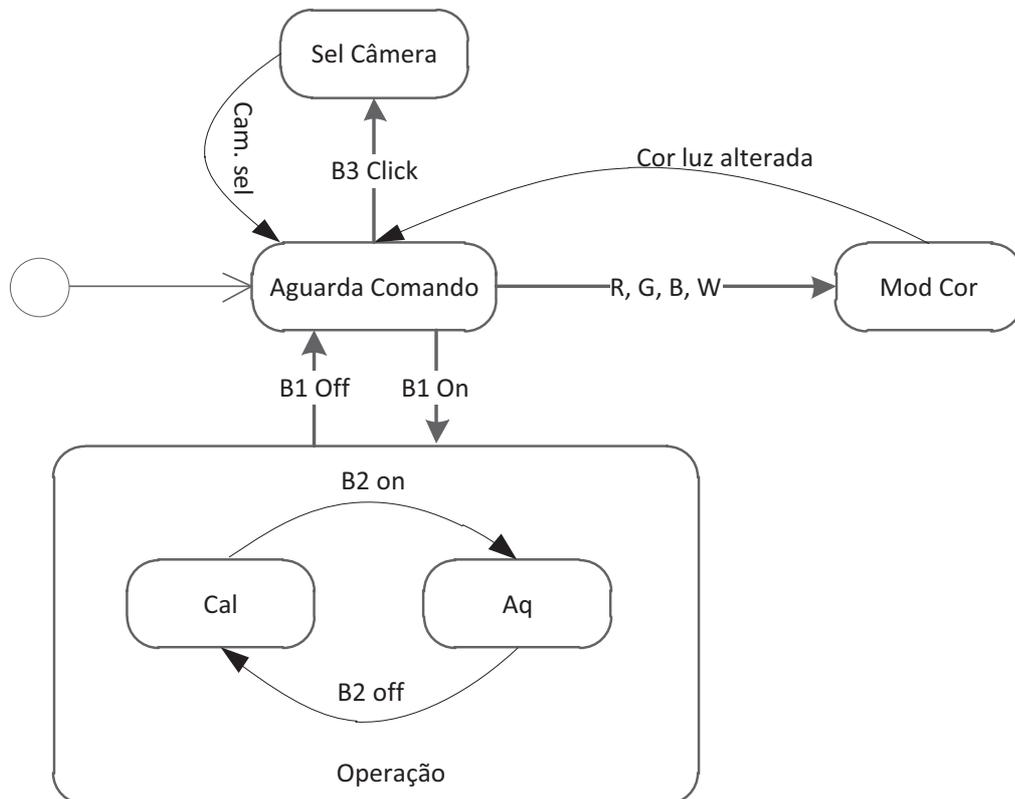


Figura 5.14: Diagrama de Estados do Aplicativo Desenvolvido

Ao iniciar o aplicativo ele entra em um estado **Aguarda Comando**, onde apenas apresenta na região central da tela a pré-visualização da imagem captada pela câmera, o que permite um possível ajuste na posição do celular e verificação do sinal obtido. Ao clicar no botão *B3* o aplicativo entra no estado de **Sel. Câmera** alternando a captura da imagem entre a câmera frontal

e a posterior. Após selecionar qual câmera é utilizada o aplicativo retorna ao estado **Aguarda Comando**. Quando pressionado um dos **radioButton** existentes (R,G,B,W) o aplicativo passa para o estado **Mod Cor**, onde é alterado o preenchimento da imagem que gera a fonte de luz na tela para os valores correspondentes a cor selecionada ( $R = (255,0,0)$ ,  $G=(0,255,0)$ ,  $B=(0,0,255)$  e  $W=(255,255,255)$ ). Se o botão  $B1$  for ativado ( $B1$  on) o aplicativo passa ao estado de **Operação**. No estado de operação quando  $B2$  estiver ativado( $B2$  on) o aplicativo entrará no estado de aquisição (**Aq**), ou quando  $B2$  estiver desativado ( $B2$  Off) no estado de calibração (**Cal**). A Figura 5.15 ilustra o diagrama de fluxo do estado de operação.

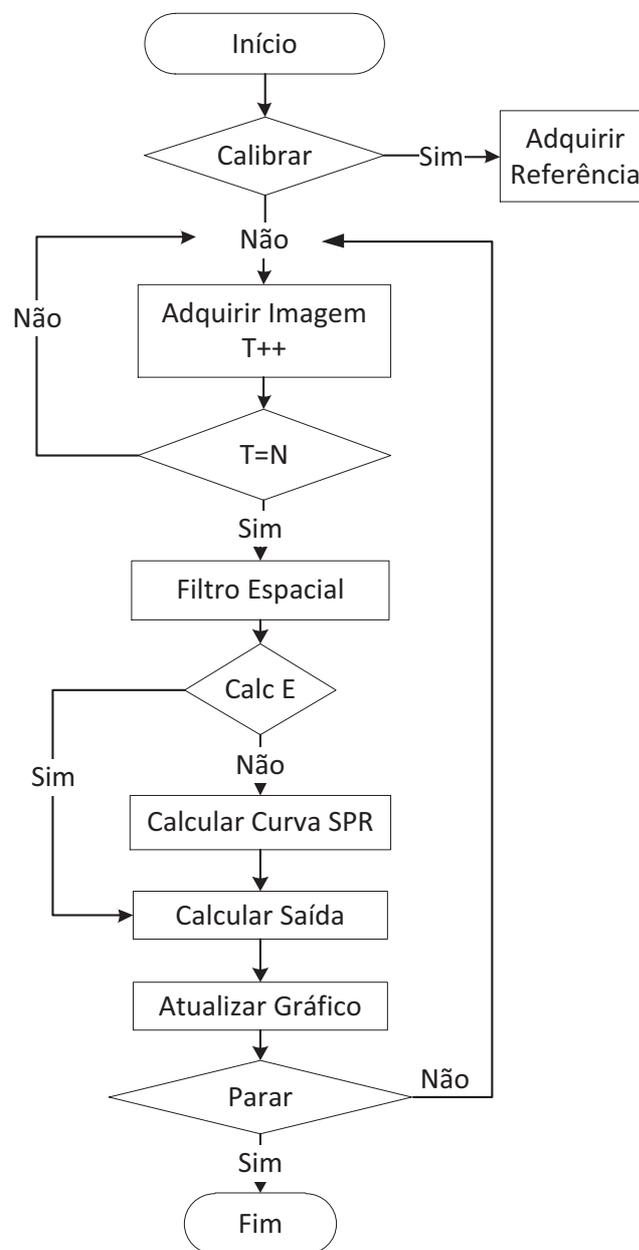


Figura 5.15: Diagrama de Fluxo do estado de operação do aplicativo desenvolvido

No modo de aquisição o sinal de imagem é captado pela câmera e armazenado no cartão de memória do celular para futuras análises na etapa Adquirir Imagem representada no diagrama de fluxo da Figura 5.15. É realizado inicialmente uma média de  $N$  amostras para minimizar o ruído temporal. Este sinal é submetido a um filtro espacial para minimizar o ruído correlacionado entre *pixels*. Após a realização do filtro espacial é calculada a curva SPR dividindo-se o sinal de imagem pelo sinal da referência obtido na calibração. Através do sinal da curva SPR são calculados os parâmetros desejados como ângulo de ressonância, largura da curva, assimetria. Quando o parâmetro desejado é a energia do sinal não é necessário o cálculo da curva SPR, pois o valor de  $E_{sig}$  é obtido diretamente do sinal bruto. Após a determinação do parâmetro desejado o gráfico é atualizado com a inserção do novo valor obtido. Utilizando os parâmetros obtidos da curva SPR pode-se calcular valores como índice de refração efetivo  $n_{eff}$  e espessura da camada sensível  $d_3$ .

Na versão atual optou-se pela utilização do valor da energia por facilidade de implantação, não necessidade de obtenção de sinal de referência e velocidade para processamento de seu valor. Os demais parâmetros são calculados posteriormente em um computador pessoal. O filtro espacial utilizado inicialmente foi a média de  $N$  linhas ao redor da região central da área sensível quando utilizada a câmera frontal, ou de  $N$  colunas quando utilizada a câmera posterior. O diagrama de classes que representa o aplicativo desenvolvido está ilustrado na Figura 5.16.

Foi desenvolvida apenas uma atividade que engloba todas as funcionalidades implementadas até o momento, através da classe **biosensorActivity**. A aquisição da imagem é realizada através do objeto **camera** que é uma instância da classe **Camera** nativa do android. Para esta finalidade foi implementado o método **takePicture** na classe **biosensorActivity**. O método **chooseCamera** foi criado para permitir a escolha de qual das câmeras do dispositivo é utilizada para aquisição da imagem. Desta forma, pode-se utilizar a câmera frontal quando a fonte de luz é gerada pela tela e a câmera traseira quando utiliza-se o led do *flash* como fonte de luz. O método **setLigthSource** permite escolher entre uma luz vermelha, verde, azul ou branca como fonte de luz na utilização da tela. O gráfico para visualização de valores obtidos com o processamento foi implementado com o objeto **mChartView** que é uma instância da classe **GraphicalView** da biblioteca **AChartEngine**.

A detecção da condição de ressonância é realizada através das classes **firtMoment** e **poliFit** derivadas de **getResonance**, que implementam as técnicas descritas na seção 2.3.

A suavização do sinal foi implementada nas classes **moveAverage** e **median** derivadas de **preProcess**, que implementam respectivamente os filtros de média móvel e mediana.

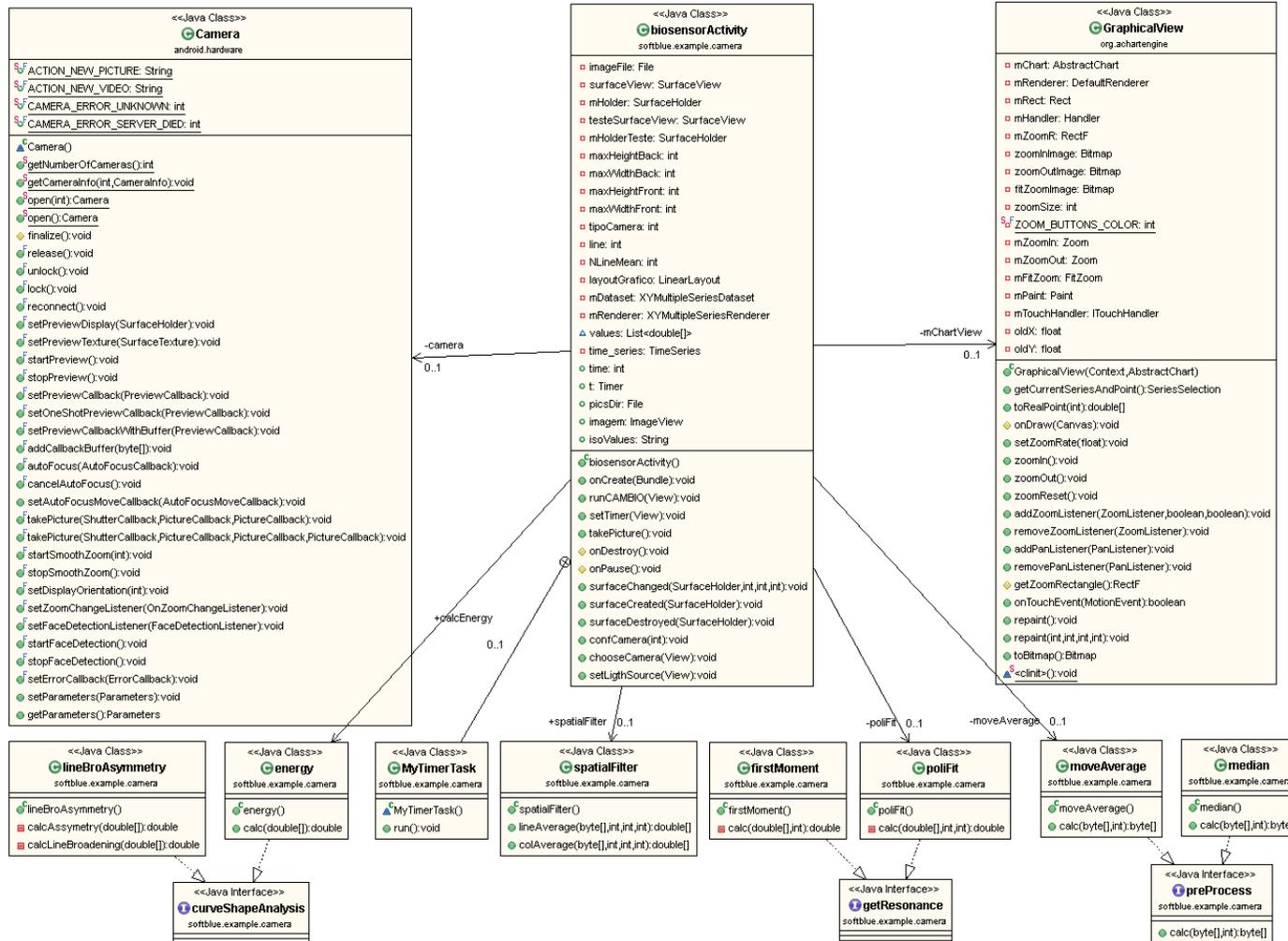


Figura 5.16: Diagrama de Classes do Aplicativo Desenvolvido para Android

O cálculo dos parâmetros da forma da curva largura da curva  $\Gamma$ , assimetria  $G$  e energia  $E_{sig}$  descritos na seção 3.1, são calculados através das classes derivadas de **curveShapeAnalysis**. A classe **lineBroAsymetry** determina o valor de  $\Gamma$  e  $G$  através dos métodos **calcAsymetry** e **calcLineBroadening**. A classe **energy** determina o valor de  $E_{sig}$  através do método **calc**.

O filtro espacial foi implementado na classe **spatialFilter** que recebe a imagem adquirida pela câmera e retorna um vetor com sinal correspondente a média de  $N$  linhas ou colunas da imagem captada.

As interfaces **getResonance**, **preProcess** e **curveShapeAnalysis** foram desenvolvidas para permitir futuras expansões e inclusões de métodos para detecção da condição de ressonância, suavização e análise da forma da curva SPR.

## 5.4 Resultados experimentais

Esta seção contém a descrição e análises dos resultados experimentais obtidos com o sistema proposto. Foram submetidas para análises: substâncias inorgânicas utilizadas normalmente para limpeza da superfície do filme metálico (Água e hipoclorito); proteína BSA (Bovine Serum Albumin) para investigar o comportamento do sistema proposto na adsorção de compostos orgânicos e formação da monocamada. Além disto foi adquirido o espectro de luz proveniente da tela do *smatphone* utilizado.

### 5.4.1 Determinação do espectro de luz do SIII

Cada elemento da imagem gerada pelas telas de led são formadas pela composição da luz proveniente de três leds, que geram luz vermelha (R), verde (G) e azul (B). Logo o branco gerado pelas telas de led não é uma luz branca, mas a composição do espectro de cada canal RGB. O espectro da luz para cada led se assemelha a uma curva gaussiana, porém estas curvas se sobrepõem em determinadas regiões. Dessa forma, ponderando as componentes de cada canal é possível gerar diferentes cores.

Para determinar o espectro de luz da tela do SIII, foram geradas imagens com as cores primárias puras utilizando apenas as componentes de cada canal e uma imagem com a cor branca. Cada cor pura foi gerada com a componente correspondente no valor máximo e as demais com valor mínimo (ex:vermelho puro  $R = 255$ ,  $G = 0$ ,  $B = 0$ ). A imagem branca foi gerada com todas as componentes no valor máximo ( $R=255$ ,  $G=255$  e  $B=255$ ). Para cada imagem gerada foi adquirido o espectro de luz através de um espectrômetro da Ocean Optics (USB4000) [OPTICS, 2008]. Cada sinal do espectro utilizou uma média de 16 amostras obtidas. Os resultados obtidos para o espectro do SIII estão ilustrados na Figura 5.17.

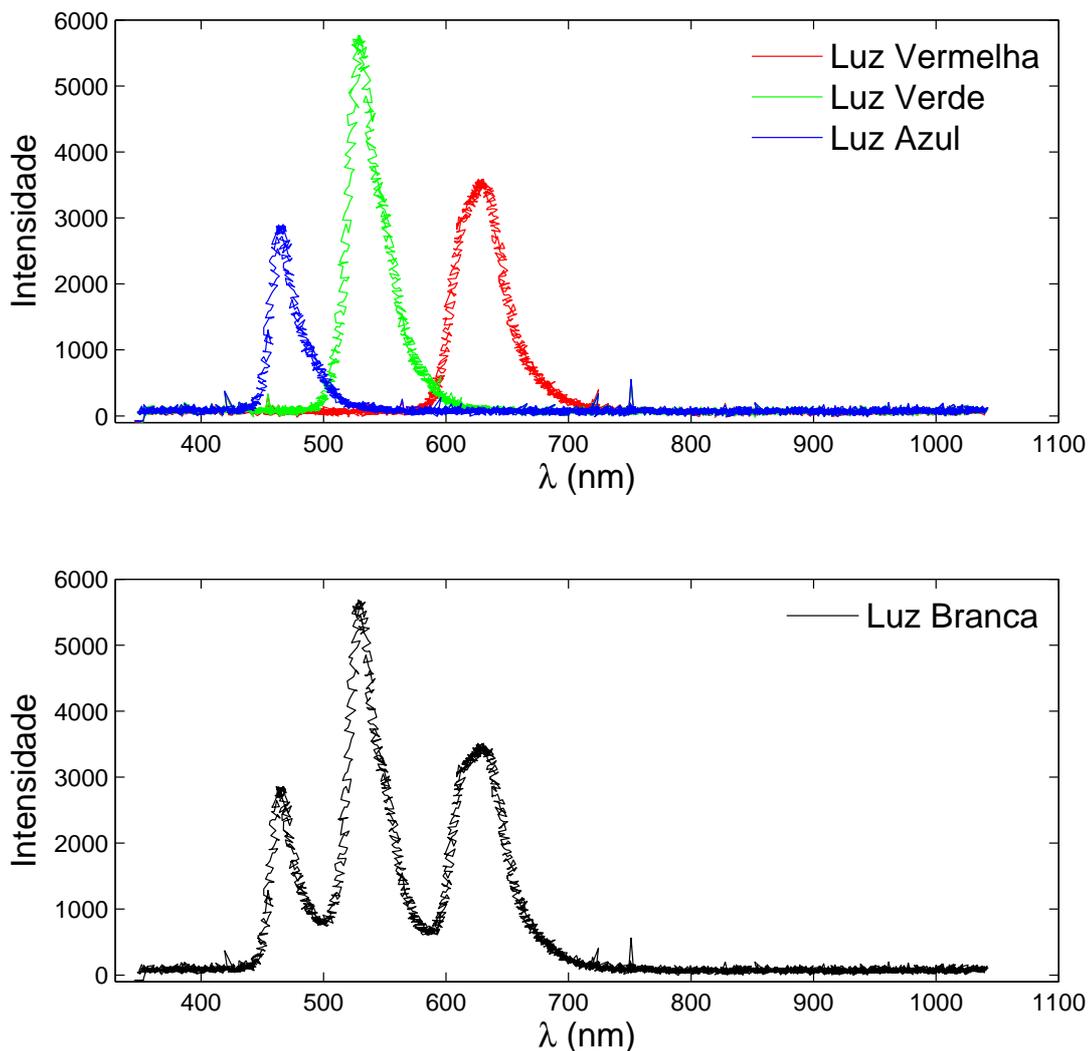


Figura 5.17: Espectro do sinal de luz da tela do SIII

O espectro obtido para cada imagem pura está ilustrado no primeiro gráfico da Figura 5.17. O segundo gráfico mostra o espectro obtido para a luz branca gerada. Pode-se observar que o espectro da luz branca é exatamente a soma das três cores puras individuais. A luz branca apresenta um espectro diferente da ideal, que deveria ser uma reta com os mesmos valores para cada comprimento de onda. Visivelmente não é possível perceber a diferença na luz gerada, porém, isto limita um pouco a influência de alguns comprimentos de onda no biossensor.

#### 5.4.2 Plataforma experimental

Para demonstrar a viabilidade do sistema proposto foi desenvolvida uma plataforma experimental que está ilustrada na Figura 5.18. A plataforma montada para realização dos experimentos é composta pelo equipamento proposto, estrutura utilizando um *case* de mesa, um *smartphone*,

uma bomba peristáltica e as substâncias a serem analisadas.

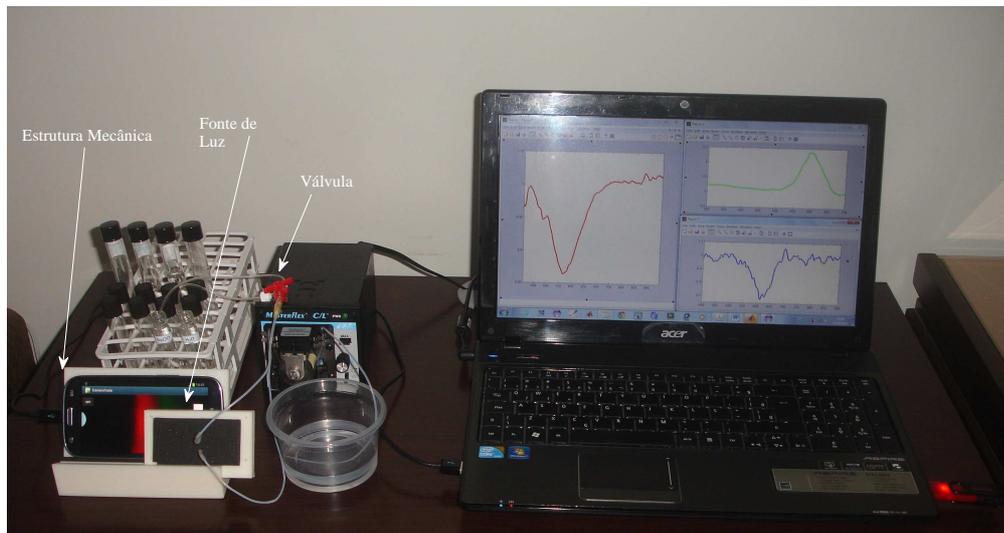


Figura 5.18: Plataforma Experimental utilizada

As substâncias foram colocadas em tubos de ensaio devidamente etiquetados. A bomba peristáltica succiona a substância direcionando-a até a célula de fluxo e superfície sensível do equipamento proposto. Para permitir a troca entre as substâncias foi utilizada uma válvula direcional manual com duas entradas e uma saída. Cada entrada da válvula é conectada a uma mangueira. A outra extremidade de cada mangueira é colocada no tubo de ensaio da substância desejada. Desta forma, é possível alternar entre as duas substâncias utilizadas no experimento mudando a posição da válvula direcional. Quando mais de duas substâncias são utilizadas, adiciona-se válvulas as entradas expandindo-se a possibilidade de escolha. O SIII é conectado a um *notebook* para monitorar o experimento e realizar o processamento dos dados coletados.

### 5.4.3 Resultados obtidos com a câmera frontal

Utilizando a tela do SIII para gerar a fonte de luz e a câmera frontal para captar a imagem refletida, foram realizados uma série de experimentos com substâncias conhecidas. O primeiro grupo de experimentos consiste em um ciclo de limpeza com uma solução de hipoclorito de sódio NaClO. O segundo grupo de experimentos realizado foi o ciclo de adsorção de BSA (Bovine Serum Albumin), uma proteína que pode ser utilizada na formação da monocamada. Ambos os experimentos apresentam comportamentos bastante conhecidos, tendo sido bastante explorados em biossensores convencionais. Desta forma, é possível validar a solução proposta comparando os resultados obtidos com dados já existentes na literatura e obtidos com a configuração tradicional.

Antes de cada experimento é realizado o procedimento de calibração com a célula de fluxo vazia, que tem como objetivo proporcionar uma imagem do feixe de luz refletido no sensor de imagem sem a resposta SPR, ou seja, gerar uma imagem de referência para ser usada na normalização de futuras medições.

### Ciclo de limpeza

O ciclo de limpeza foi realizado diversas vezes para comprovar a repetibilidade das medições. As substâncias foram analisadas com a plataforma experimental desenvolvida, sendo colocadas na célula de fluxo através da bomba peristáltica. Na troca entre as substâncias, sempre parava-se a bomba antes da mudança da posição da válvula. Em seguida religava-se a bomba para inserção da nova substância. A sequência de etapas e substâncias utilizadas no ciclo de limpeza foram de acordo com o seguinte procedimento:

1. calibração do instrumento com aquisição e armazenamento da imagem de referência com célula de fluxo seca;
2. água degaseificada e deionizada ( $H_2O$ ) foi bombeada através da célula de fluxo para a superfície do filme de ouro no *Biochip*;
3. uma solução de 10% NaClO (HPC) foi bombeada;
4. insere-se água novamente para remover o HPC.

Após o fim do ciclo de limpeza, as imagens armazenadas no SIII foram transferidas para o computador onde foram analisadas através do MATLAB. Com objetivo de diminuir o ruído temporal foi realizada a média de 5 imagens obtidas para cada substância. Este sinal foi segmentado nos canais RGB para serem processados individualmente. O sinal da solução foi obtido após a realização da média de 50 linhas da imagem e utilização de suavização do sinal. A suavização foi obtida através do filtro da média móvel que já demonstrou bons resultados anteriormente, melhorando a resolução do sinal de saída [SOUZA FILHO, 2006]. A curva SPR de cada canal (RGB) foi calculada normalizando o sinal da solução pelo sinal de referência obtido na calibração. A Figura 5.19 apresenta as curvas SPR obtidas para  $H_2O$  e  $NaClO$ .

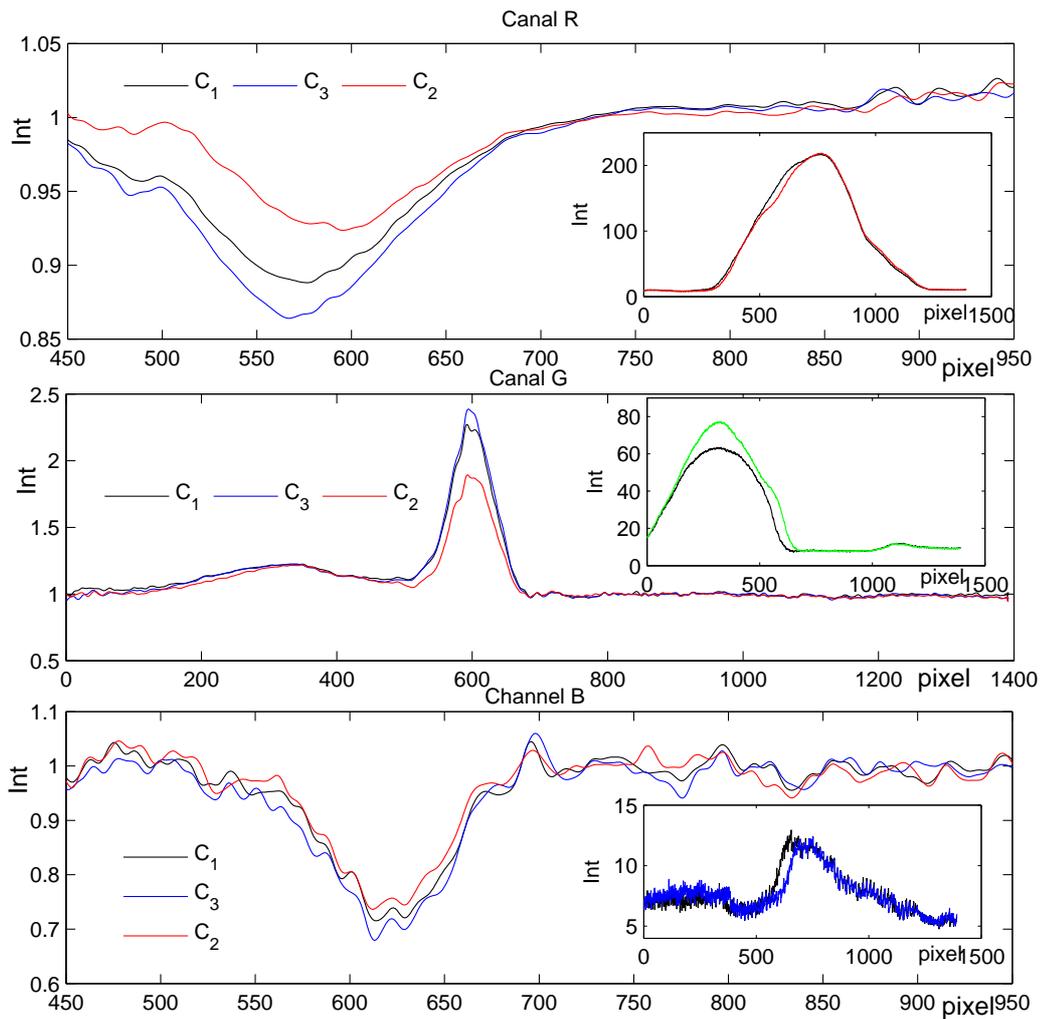


Figura 5.19: Curvas SPR obtidas para os canais R,G e B

Pode-se observar na Figura 5.19 que o efeito SPR se pronuncia nos canais R e B. É claramente verificado a mudança na posição e valor do mínimo da curva SPR com a alternância de substâncias ( $C_1/C_2/C_3$ ). Observa-se que existe uma alteração entre a curva da água antes (curva  $C_1$ ) e depois (curva  $C_3$ ) da passagem de  $NaClO$  (curva  $C_2$ ). Este efeito é justificado pois a passagem de  $NaClO$  limpa a superfície de impurezas existentes previamente. Observa-se que a curva SPR do canal R e B apresentam decaimentos em posições diferentes assim como esperado. O efeito SPR é verificado na atenuação do sinal (curvas vermelha e azul) em relação ao sinal de referência (curva preta) que pode ser visualizada nos gráficos contidos no interior de cada figura. No canal G é verificado a mudança no valor máximo da curva com a alteração das substâncias.

Além da posição de ressonância, convencionalmente utilizada em biossensores SPR com interrogação angular, foram analisados parâmetros da curva e energia do sinal. Para os três canais foram avaliados os valores da energia do sinal. Além disto foram analisadas características específicas a cada canal. Para o canal R foram analisados a posição e o valor da intensidade do

*pixel* correspondente ao ângulo de ressonância. Para o canal G foi avaliado o valor da intensidade máxima da curva. Para o canal B foi traçado o comportamento do valor mínimo da curva. Os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 5.20 e 5.21.

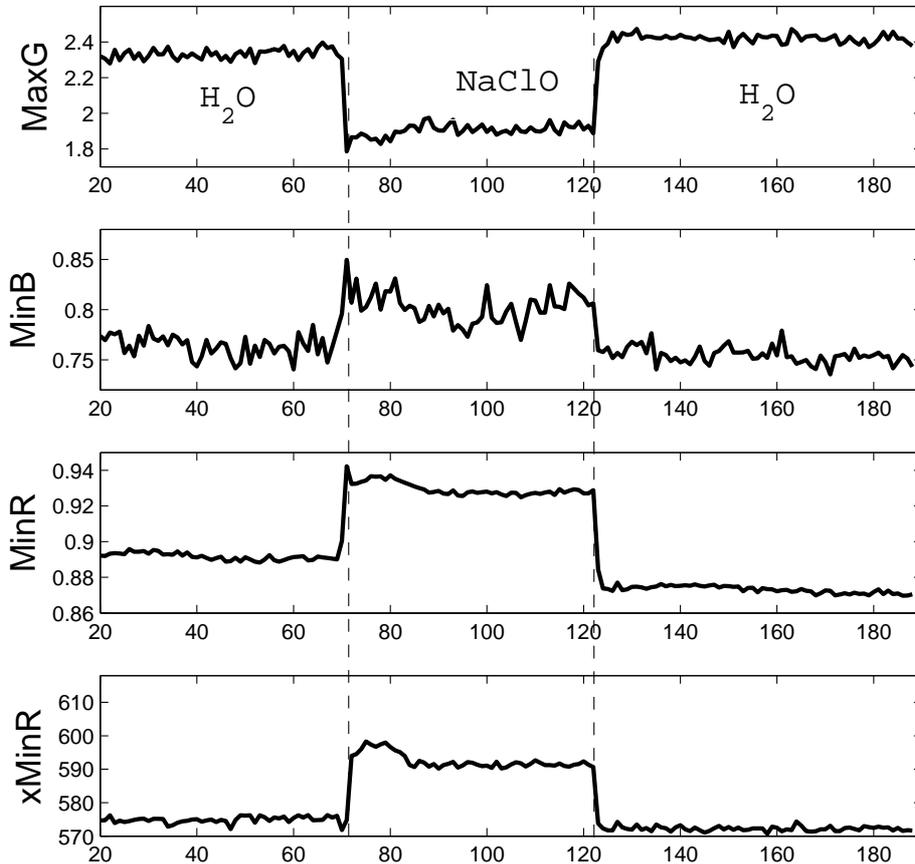


Figura 5.20: Valor máximo de intensidade para o canal G, valor de intensidade mínima da curva SPR para o canal B e R, posição do valor mínimo da curva para o canal R obtidos no ciclo de limpeza

Analisando a Figura 5.20, pode-se observar que o valor do *pixel* correspondente ao ângulo de ressonância para o canal R ( $xMinR$ ) aumenta com o acréscimo do índice de refração. O incremento no valor do índice de refração da substância analisada ocorre quando é inserido o NaClO. Este comportamento está de acordo com a medição convencional feita com excitação de uma luz vermelha exibido na Figura 3.22. Os valores do mínimo da curva para o canal R ( $MinR$ ) e canal B ( $MinB$ ) acompanham o comportamento do ângulo de ressonância. O valor máximo obtido da curva do canal G ( $MaxG$ ) tem comportamento com variação negativa em relação ao ângulo de ressonância, diminuindo seu valor com o aumento do índice de refração. Apesar de não visualizar-se a curva SPR no canal G é possível identificar a mudança de substâncias com o valor de  $MaxG$ .

A energia da curva SPR ( $E_x$  onde  $x= R,G,B$  para cada canal) foi aqui calculada basicamente com a soma das intensidades de todos os *pixels* do sinal de cada amostra. A evolução temporal para os valores de energia obtidos durante o ciclo de limpeza está ilustrada na Figura 5.21.

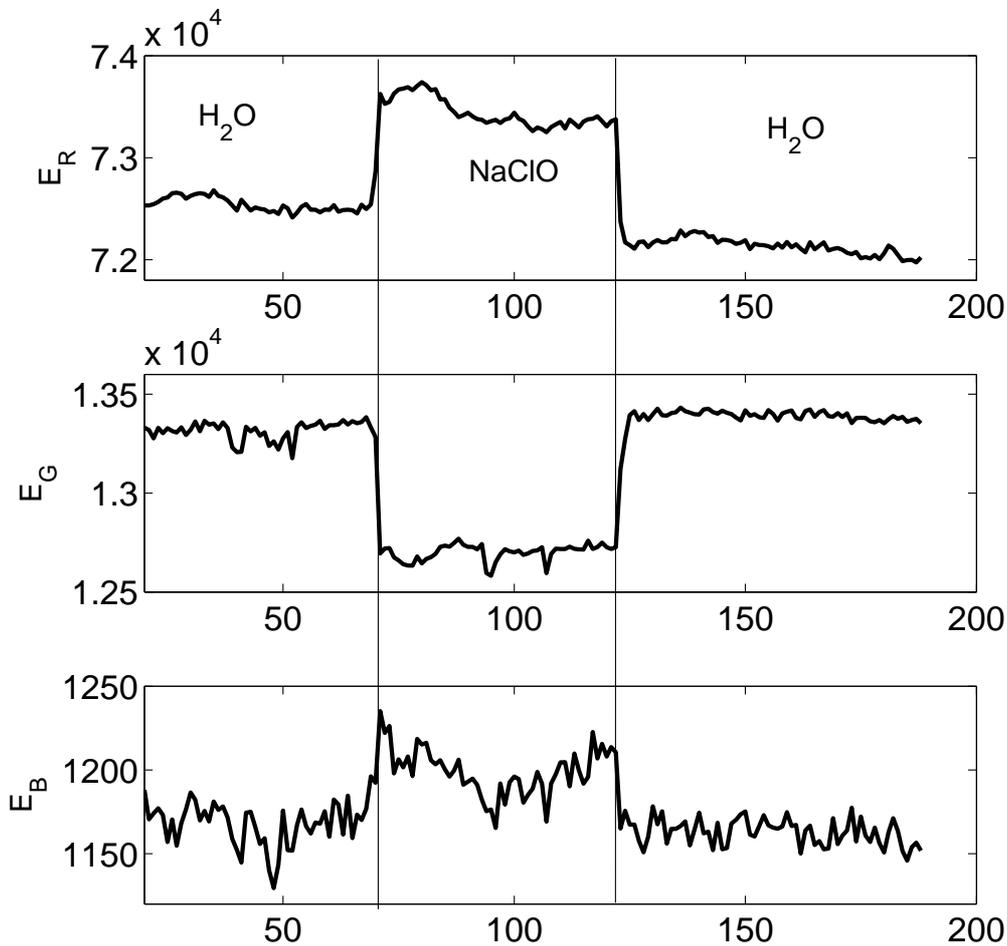


Figura 5.21: Evolução temporal dos valores de energia do sinal obtidas para o canal R,G e B durante o ciclo de limpeza

Para o canal R ( $E_R$ ) e canal B ( $E_B$ ) os valores da energia crescem com o aumento do índice de refração. Este comportamento já havia sido obtido anteriormente com excitação de luz vermelha na configuração convencional, como pode-se observar na Figura 3.19. Para o canal G, o valor da energia  $E_G$  diminui com o aumento do índice de refração, apresentando comportamento similar aos valores correspondentes à condição de ressonância ilustrados na Figura 5.20, quando no canal G observou-se um comportamento invertido em relação ao canal R e B.

### Adsorção de proteína

Para validar o sistema proposto foram realizados experimentos de adsorção e fixação de proteínas. Para estes experimentos foram utilizadas três substâncias: água degaseificada e deionizada ( $H_2O$ ), solução de BSA(Bovine Serum Albumin) a 10% e de hipoclorito de sódio ( $NaClO$ ). O sensorgrama para o ciclo de adsorção de BSA foi obtido através do seguinte procedimento:

1. Aquisição e armazenamento da referência
2. Inserção de  $H_2O$
3. Inserção de BSA
4. Inserção de HPC para remoção do BSA
5. Inserção de água para remover o HPC permitindo que a superfície do filme retorne ao estado inicial

O sinal de imagem da substância ( $YM(x,y)$ , matriz com  $x$  linhas e  $y$  colunas de pixels do sinal de imagem) foi obtido por meio da média de 16 imagens capturadas. O sinal de imagem  $YM(x,y)$  foi decomposto em suas componentes RGB ( $YM_k(x,y)$  onde  $k=R,G,B$ ). O sinal da substância ( $y_s(n)$ , onde  $n$  é o número de colunas  $y$ ) foi calculado através de um filtro espacial sobre  $YM_k(x,y)$ , realizado com a média de 50 linhas sobre o centro da região sensível. Para calcular a refletividade da curva SPR ( $y_{rs}(\theta)$ ) o valor de  $y_s$  é normalizado pelo sinal de referência. O ângulo de ressonância  $\theta_{res}$  foi calculado a partir da curva SPR ( $y_{rs}(\theta) \times \theta$ ), com a técnica de Ajuste Polinomial utilizando um polinômio de segunda ordem. O valor do índice de refração efetivo  $n_{eff}$  foi calculado utilizando o valor de  $\theta_{res}$  através da equação 2.5. O valor de  $n_{eff}$  foi analisado em função de sua variação com relação ao índice de refração da água( $\Delta n_{eff}$ ). Os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 5.22 e 5.23.

É possível identificar na Figura 5.22 as ligações reversíveis e irreversíveis de BSA. A água remove apenas as ligações reversíveis, o que pode ser observada pela diferença no índice de refração com a passagem de água após o BSA. As ligações irreversíveis são removidas após a passagem de HPC. A remoção de HPC com água faz com que o valor de  $\Delta n_{eff}$  retorne ao valor inicial. Estes resultados são similares aos obtidos anteriormente com a configuração de um biossensor tradicional ilustrados na Figura 3.19. O mesmo comportamento pode ser visualizado nos valores de  $I(\max_G)$  e  $I(\min_R)$ . O valor de  $I(\max_G)$  varia em direção oposta a de  $\Delta n_{eff}$ , similarmente aos resultados obtidos para o ciclo de limpeza ilustrados na Figura 5.20.

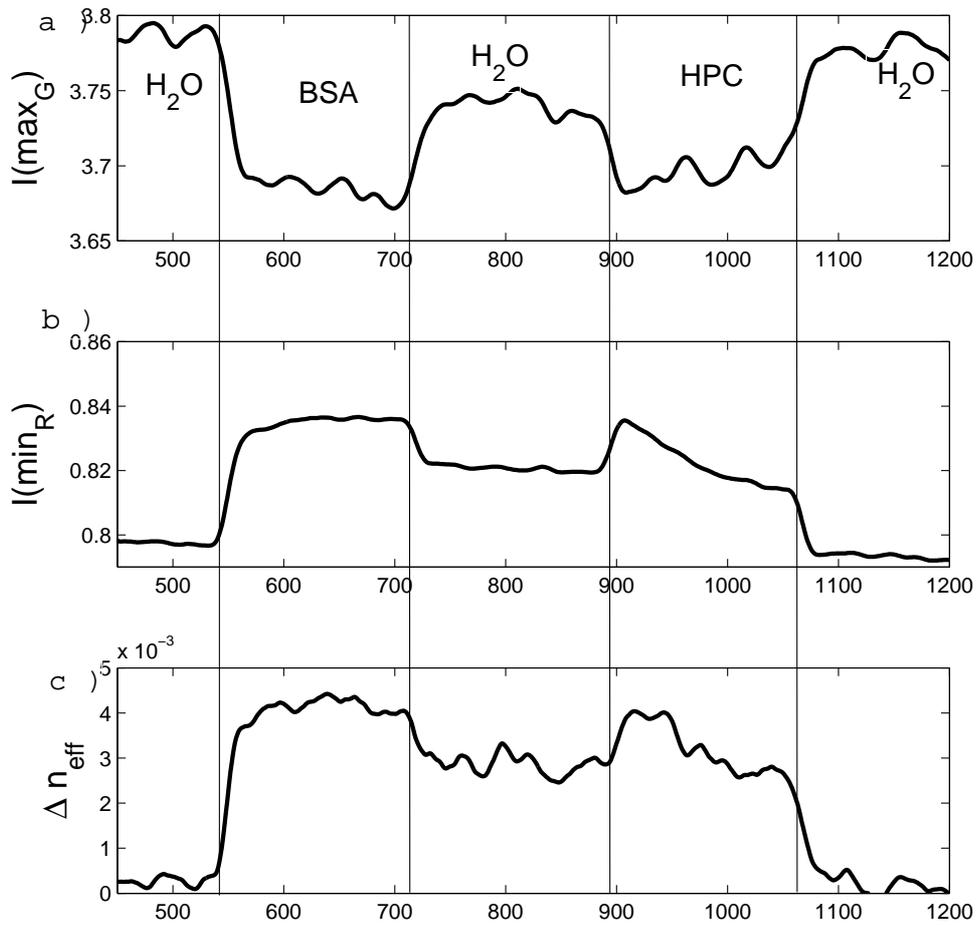


Figura 5.22: Valor máximo de intensidade para o canal G, valor de intensidade mínima da curva SPR para o canal R, variação do índice de refração ( $\Delta n_{eff}$ ) para o canal R obtidos no ciclo de adsorção de BSA

Os valores de energia para o ciclo de adsorção de BSA, ilustrado na Figura 5.23, exibem o mesmo comportamento aos obtidos para o ciclo de limpeza ilustrado na Figura 5.21. Os valores de  $E_R$  e  $E_B$  aumentam com o acréscimo do valor de  $\Delta n_{eff}$ , enquanto que  $E_G$  diminui apresentando comportamento invertido com o aumento do índice de refração.

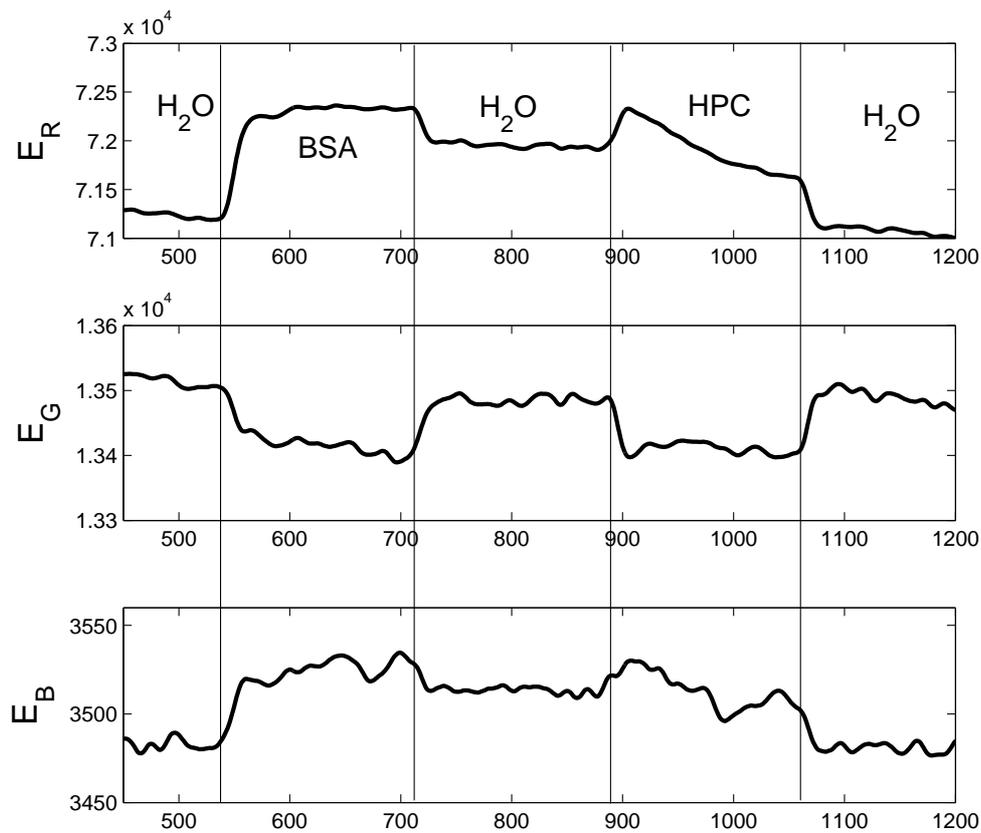


Figura 5.23: Evolução do valor da Energia do sinal obtidas para o canal R,G e B durante o ciclo de adsorção de BSA

#### 5.4.4 Análise do sinal de luminância

Para analisar a imagem adquirida com relação ao comprimento de onda, foi realizado o procedimento descrito em 6 etapas:

1. Obtenção do sinal de intensidade com a transformação dos valores dos pixels para tons de cinza;
2. Cálculo da média de 20 amostras do sinal;
3. Realização da média de 200 linhas da imagem;
4. Cálculo da energia do sinal;
5. Divisão pelo sinal de referência para obtenção da curva SPR;
6. Obtenção da condição de ressonância;

### 7. Determinação do valor de intensidade correspondente ao ponto da condição de ressonância.

Primeiramente obteve-se o sinal de referência com a realização das etapas 1 a 3 com as imagens referentes ao sinal obtido do sensor apenas com ar. Em seguida, foi realizado o procedimento descrito para analisar o sinal da substância. As substâncias utilizadas foram *Bovine Serum Albumin* (BSA), água destilada e deionizada e hipoclorito. As substâncias foram inseridas para reproduzir o ciclo de adsorção e remoção de BSA, com a inserção primeiramente de Água seguido BSA, Água, Hipoclorito e por último água novamente. A Figura 5.24 ilustra as curvas obtidas para as substâncias analisadas.

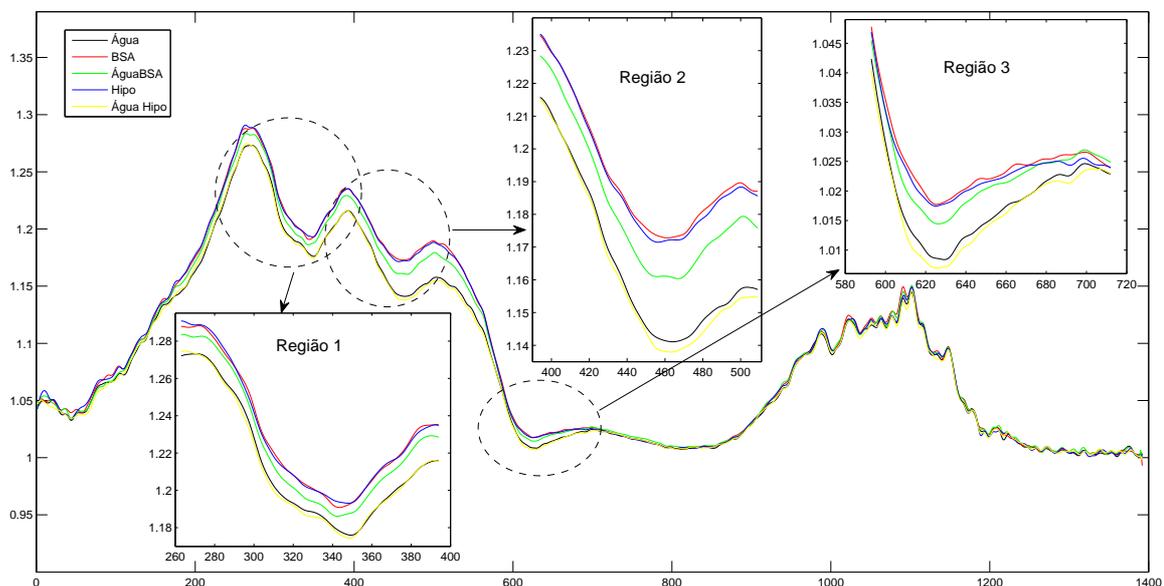


Figura 5.24: Curvas obtidas através do sinal de luminância da imagem adquirida

O resultado obtido demonstra que existem três regiões que indicam comportamento semelhante ao de curvas SPR. Os gráficos inseridos na Figura 5.24 apresentam uma ampliação da região indicada. É possível verificar a diferença entre as curvas geradas para cada substância analisada, com a mudança na posição e intensidade do mínimo da curva. Verifica-se que após a passagem de BSA (curva vermelha) existe uma variação evidente na intensidade do mínimo e um leve deslocamento na posição do mínimo. Após a passagem da água (curva verde), o valor da intensidade diminui um pouco porém não retorna ao valor original pois existiu uma fixação de BSA na camada de ouro. Com a passagem do hipoclorito (curva Azul), verifica-se novamente um acréscimo no valor da intensidade e deslocamento para esquerda do mínimo. A curva obtida para água (curva amarela) após a passagem do hipoclorito se assemelha à curva inicial, assim como esperado pois existiu a remoção do BSA retornando à condições próximas ao estado original.

A evolução do sensorgrama utilizando a análise proposta para os valores de energia está ilustrada na Figura 5.25.

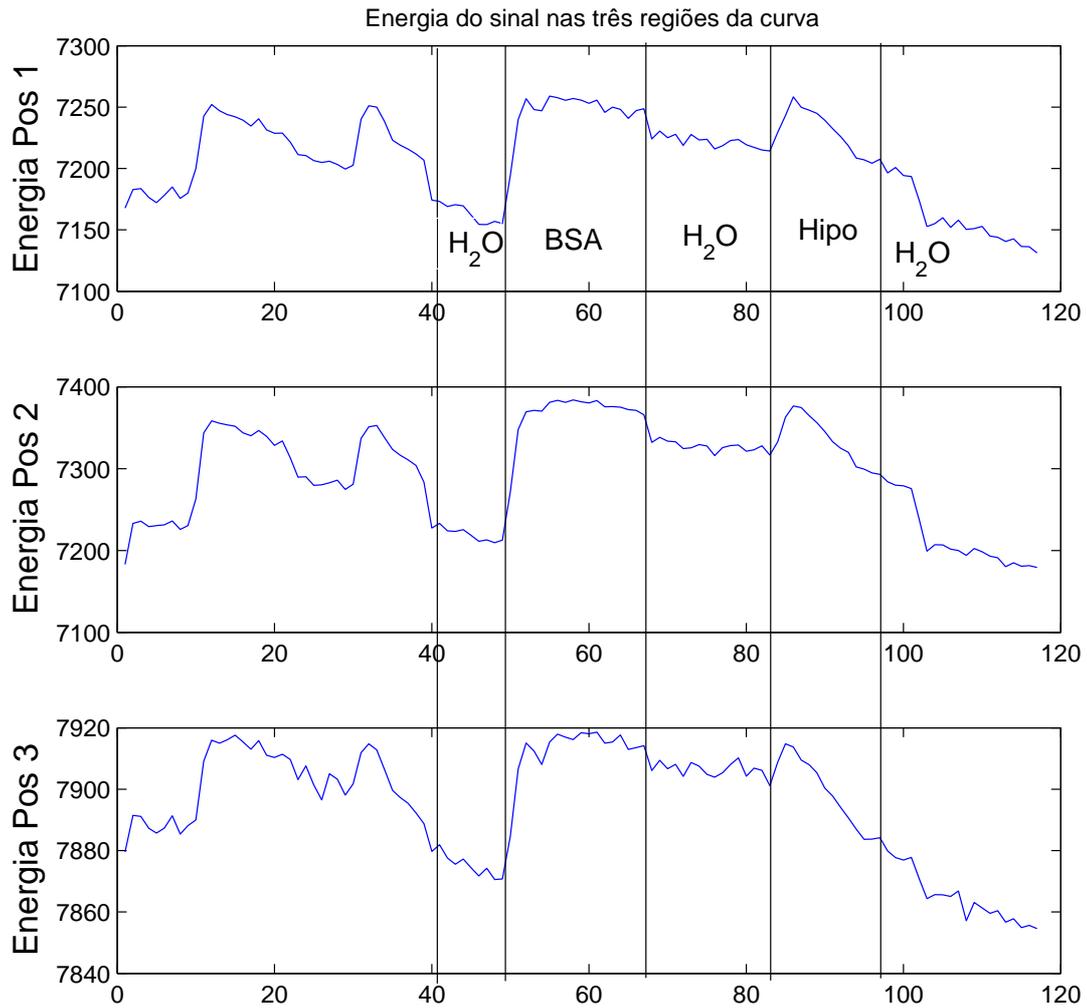


Figura 5.25: Variação da energia do Sinal de Luminância

Analisando-se a Figura 5.25 pode-se observar que o valor da energia aumenta com o índice de refração. O comportamento obtido para os três sinais está de acordo com o esperado, similar ao obtido na análise convencional com o modo de interrogação angular apenas para um comprimento de onda como ilustrado na Figura 5.23. O resultado obtido para o valor mínimo está ilustrado na Figura 5.26.

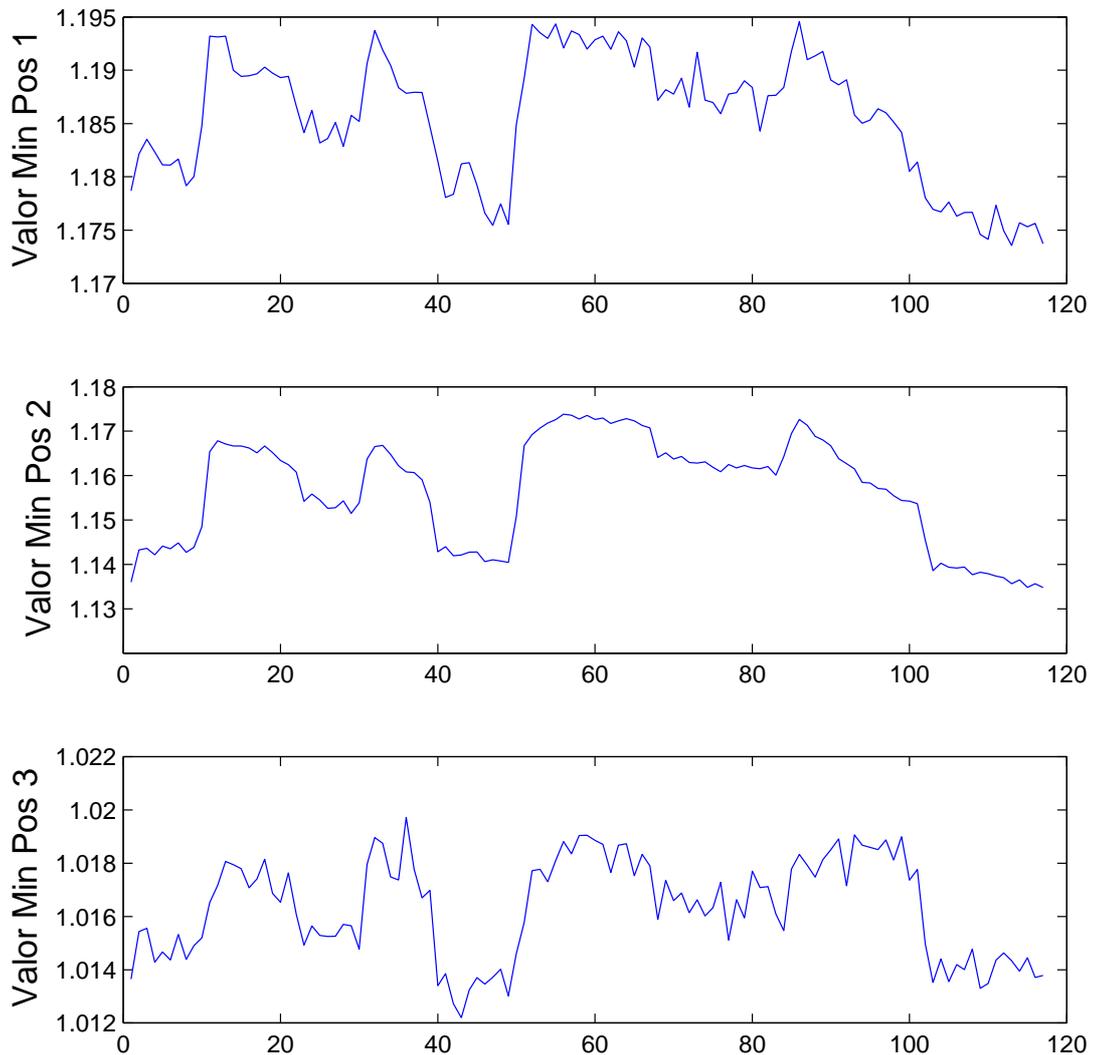


Figura 5.26: Variação do valor Mínimo da Curva em cada região para o Sinal de Luminância

Como pode-se observar na Figura 5.26, os valores mínimos calculados para as três regiões analisadas na curva apresentam uma variação positiva de acordo com a variação do índice de refração. O comportamento obtido é similar ao encontrado anteriormente para análise de apenas um comprimento de onda, ilustrado no gráfico da Figura 5.22. Os resultados obtidos para o valor correspondente à posição do mínimo da curva em cada região analisada estão ilustrados na Figura 5.27.

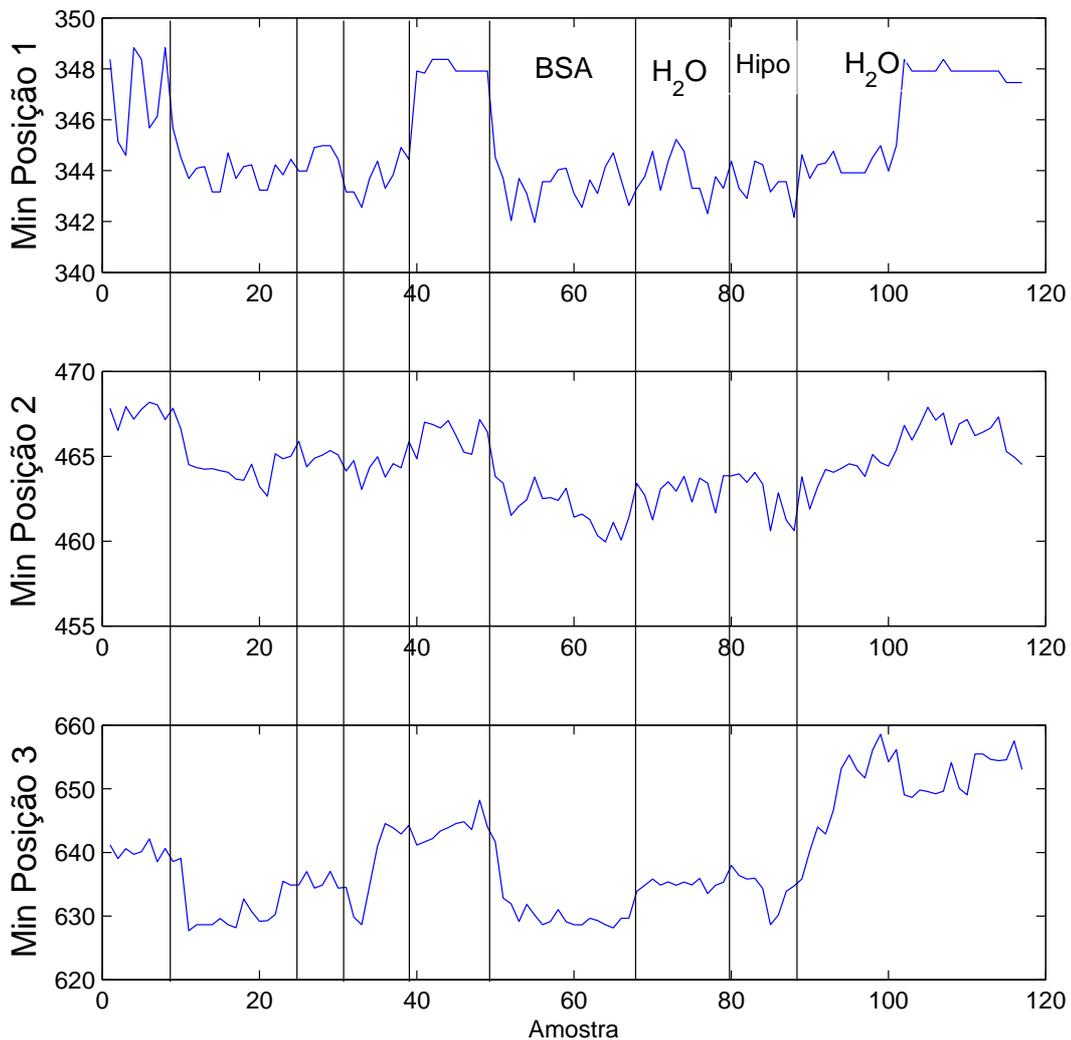


Figura 5.27: Variação da posição do valor Mínimo da Curva em cada região para o Sinal de Luminância

A condição de ressonância correspondente ao mínimo da curva, tanto no modo de interrogação angular ( $\theta_{res}$ ) quanto no modo de interrogação espectral ( $\lambda_{res}$ ), é modificada com alteração do índice de refração ou espessura da camada sensível. Analisando-se a Figura 5.27, pode-se verificar que nas três regiões selecionadas a posição do mínimo da curva foi alterada com a mudança da substância. O comportamento obtido foi de diminuição do valor do pixel correspondente com o aumento do índice de refração efetivo. Este comportamento está coerente com ao da variação da condição de ressonância de um biossensor convencional.

De acordo com o identificado pelos resultados de simulação do caminho ótico do feixe de luz, apresentados na seção 4.1.4, quando utiliza-se um luz branca o sinal captado pelo *pixel* da câmera pode ter a influência de mais de um comprimento de onda. As posições de saída do feixe indicavam que em cada região da imagem existiria o sinal correspondente a uma componente

de luz primária e que os ângulos de incidência do feixe seriam diferentes para cada  $\lambda$ . Logo, para diferentes comprimentos de onda poderia se obter a informação da variação da intensidade em função do ângulo de incidência analisando-se a região específica da imagem. Entretanto, em função da sobreposição de comprimentos de onda no mesmo *pixel* o que se tem é uma mistura entre informação de ângulo e comprimento de onda, dificultando a análise no modo de interrogação angular ou espectral.

#### 5.4.5 Resultados obtidos com a câmera posterior

Para validar a utilização do *flash* como fonte de luz e da câmera posterior na obtenção do sinal de imagem refletido pelo *biochip*, foi realizado o experimento com substâncias inorgânicas de acordo com o procedimento seguinte:

1. calibração do instrumento com aquisição e armazenamento da imagem de referência com célula de fluxo seca;
2. água degaseificada e deionizada ( $H_2O$ ) foi bombeada através da célula de fluxo para a superfície do filme de ouro no *Biochip*;
3. uma solução de 10% NaClO (HPC) foi bombeada;
4. insere-se água novamente para remover o HPC;
5. inserção de uma solução de 5% de etanol em água;
6. insere-se água novamente para remover o etanol.

Ao final do experimento as imagens armazenadas na memória do SIII, foram transferidas ao computador para análise. A imagem captada foi segmentada nos canais RGB para serem processados individualmente. O sinal da solução foi obtido após a realização da média de 10 colunas da imagem. Os resultados obtidos para os valores de energia estão ilustrados na Figura 5.28.

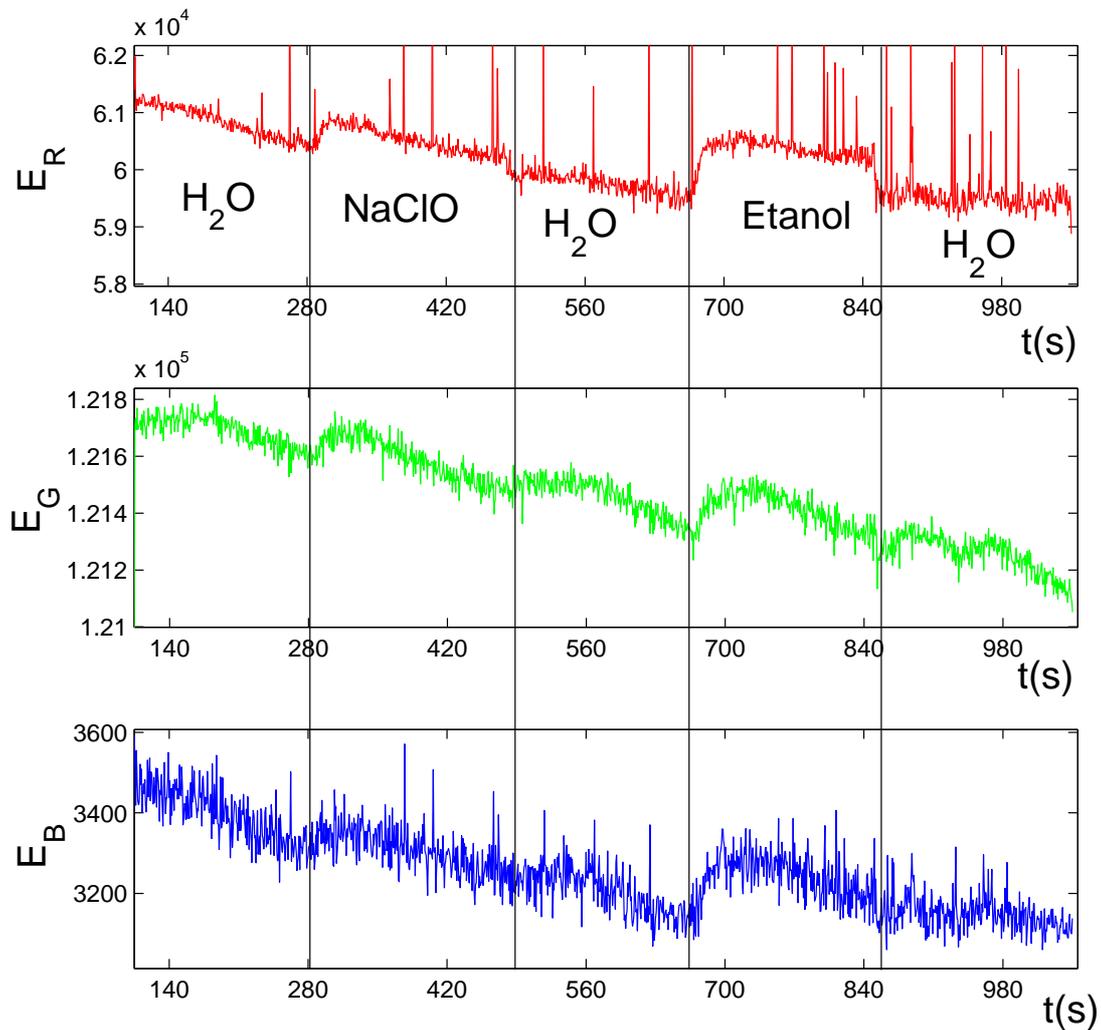


Figura 5.28: Evolução temporal dos valores de energia do sinal obtidas para o canal R,G e B com a câmera posterior

Pode-se verificar na Figura 5.28 que nos três canais analisados é possível monitorar a mudança das substâncias. Com o aumento do índice de refração efetivo verificado com a inserção da substância, observa-se o aumento no valor da energia para os canais R, G e B. Nos três canais analisados, o valor da energia foi diminuindo enquanto o experimento foi sendo realizado. Este fato fica mais evidente quando se analisa o valor da energia para a mesma substância, principalmente na presença de água no início e após a passagem de hipoclorito. A diminuição no valor da energia é atribuída ao aumento da temperatura no *biochip* o que está de acordo com os resultados obtidos por simulação ilustrados na Figura 3.13. Este aumento de temperatura foi causado pelo aquecimento proporcionado pela luz do *flash*, que possui intensidade muito forte o que gerou também uma saturação dos *pixels* localizados na região central da câmera .

## 5.5 Conclusões

Neste capítulo foi apresentada uma descrição do sistema proposto para transformar dispositivos computacionais portáteis em biossensores SPR. Optou-se por um projeto e construção de uma estrutura modular tornando-o flexível para diferentes configurações e trocas de componentes. A configuração permite o uso tanto da câmera frontal como da câmera posterior, além de possibilitar o uso de diferentes *biochips*. Com custo e tamanho reduzidos o sistema possibilita um usuário comum utilizar seu dispositivo (*smartphone, tablet ...*) para realizar análises de substâncias orgânicas e inorgânicas.

Foram propostas duas alternativas para estrutura mecânica, sendo a primeira em forma de suporte de mesa e a segunda como uma capa, o que facilita o transporte e portabilidade. A estrutura mecânica foi confeccionada em ABS na impressora 3D, porém, este material não demonstrou rigidez suficiente para fixação da célula de fluxo. Apesar da utilização da impressora 3D facilitar a construção de peças para o protótipo, será preciso confeccioná-las em material mais resistente, o que inviabiliza o uso desta impressora.

A utilização da tela do dispositivo para gerar a fonte de luz permite facilmente modificar o espectro do sinal através de *software*. Isto é possível alterando-se a imagem gerada na tela. A utilização do *flash* como fonte de luz gerou um aquecimento no *biochip* e substâncias analisadas, entretanto é possível que em versões futuras de *smartphones* seja implementado um controle de intensidade do *flash*. Além disto pode-se colocar um filtro ótico para diminuir a intensidade de luz.

O aplicativo foi desenvolvido em uma plataforma aberta, podendo facilmente ser utilizado em diferentes dispositivos. Atualmente o processamento do sinal é realizado em um computador pessoal com objetivo de facilitar a utilização de diferentes técnicas de processamento. Desta forma, será preciso otimizar o sistema e concluir o desenvolvimento do aplicativo final.

A possibilidade de medir substâncias inorgânicas e adsorção de proteínas foi demonstrada com a solução proposta, apresentando resultados similares aos obtidos experimentalmente com solução convencional. Os resultados obtidos comprovaram a possibilidade de obter o efeito SPR para vários comprimentos de onda através da excitação com luz branca, filtrando a imagem captada na componente de onda desejada. As informações podem ser obtidas pelo ângulo de ressonância ou por características da curva apenas com a decomposição nos três canais RGB.

Foi demonstrado que é possível estimar a mudança de substâncias, utilizando os valores da energia nos três canais de cor e o valor máximo da curva para o canal verde. Isto reduz a complexidade computacional da solução, o que é muito importante para sistemas embarcados.

# Capítulo 6

## Considerações Finais

Foi demonstrado que é possível transformar um dispositivo computacional portátil convencional como um *smartphone* em um biossensor baseado em SPR.

A estrutura modular desenvolvida para o equipamento torna possível a utilização de diferentes tipos de *biochips*. Neste trabalho os resultados apresentados foram obtidos com o *biochip* da VIR, porém, o suporte para o *biochip* trapezoidal já foi projetado e confeccionado.

A construção mecânica atual apresentou problemas de deformação sobre pressão e de inclinação. A deformação foi causada na fixação da célula de fluxo sobre o suporte do *biochip*, em função da rigidez insuficiente do ABS com pequenas espessuras. Isto tornou necessário a utilização de um suporte de alumínio em conjunto com o suporte de ABS, aumentando a distância entre o *biochip* e a tela e câmera do SIII. A inclinação existente foi entre o suporte do *biochip* e o anteparo do SIII, o que impacta em não uniformidade do sinal captado para diferentes linhas. Esta inclinação é em função de irregularidades nas peças confeccionadas por imprecisão da impressora 3D.

A primeira célula de fluxo foi desenvolvida manualmente com objetivo de permitir a realização dos experimentos. Encontrou-se dificuldades principalmente na vedação, o que fez com que as tentativas iniciais apresentassem vazamento da substância. A célula de fluxo para a estrutura tipo capa foi confeccionada em acrílico através de uma fresa CNC. O acrílico utilizado foi de 2mm de espessura, apresentando deformação na fixação da célula de fluxo ao suporte móvel.

Foi proposto duas configurações para a estrutura construída. A primeira configuração é um suporte de mesa adequado para utilização em bancada. A segunda solução apresenta uma estrutura em forma de capa para o *smartphone*, tornando o dispositivo mais prático de ser transportado. O projeto atual das soluções propostas não utilizou de refinamentos no formato, pois se trata de um protótipo.

A utilização da tela do dispositivo para gerar a fonte de luz permite facilmente modificar o espectro do sinal através de *software*. Isto é possível alterando-se a imagem gerada na tela. Até

o momento foram realizados experimentos com a luz branca e com luz vermelha.

O tempo necessário para armazenar a imagem completa no cartão de memória é elevado, limitando o tempo de amostragem para 700ms. O *software* atual realiza a captura da imagem e calcula o valor do sinal de energia, disponibilizando ao usuário a informação da evolução temporal através de um gráfico na tela do dispositivo. As imagens capturadas são armazenadas na memória o que permite que análises diferenciadas sejam realizadas posteriormente em um computador. A opção pela utilização do sinal de energia foi pela facilidade no processamento da informação, o que reduz o tempo necessário para processamento.

Foram realizados experimentos utilizando a tela do dispositivo como fonte de luz e a câmera frontal como fotodetector, assim como o led utilizado como *flash* e a câmera posterior. Na utilização da câmera posterior verificou-se que existiu uma saturação causada por intensidade forte da fonte de luz proveniente do *flash*. Esta intensidade forte também gerou o efeito de aquecimento do *biochip*.

Foi demonstrado que é possível obter a influência de comprimentos de ondas diferentes apenas decompondo a imagem captada nas componentes primárias RGB. Uma análise mais precisa pode ser realizada implementando-se um filtro de melhor qualidade, ou analisando a influência de cada componente no sinal final.

Foi demonstrado que quando utiliza-se a luz branca para excitar o efeito SPR no *biochip*, o sinal de imagem captado apresenta uma sobreposição de informação de ângulo de incidência e comprimento de onda para um mesmo *pixel*. Logo, existe um modo de interrogação misto entre interrogação angular e espectral para o mesmo sinal de imagem captado quando se analisa o sinal da intensidade. Este sinal pode ser facilmente obtido com a conversão da imagem para tons de cinza. Os resultados obtidos demonstram que existem curvas SPR em regiões distintas da imagem, das quais foi possível analisar a variação do índice de refração efetivo monitorando-se tanto os valores da energia do sinal quanto da variação da condição de ressonância.

Na execução deste projeto foi realizado um estudo e modelagem sobre as principais influências na alteração do sinal e do ruído em biossensores SPR com interrogação angular. Foram analisados os comportamentos de cada etapa desde a fonte de luz até a conversão para o sinal digital.

Com relação à influência da fonte de luz foi verificado o comportamento da potência ótica em função da corrente de injeção e temperatura. A variação do comprimento de onda em relação a temperatura e corrente também foi incluída no estudo. Este resultado foi obtido experimentalmente e observado que existe uma variação linear entre comprimento de onda e corrente e comprimento de onda e temperatura.

O *biochip* foi analisado em função do efeito da variação de temperatura sobre os índices de refração das camadas e alteração nas suas dimensões. Foi analisado o efeito da alteração do comprimento de onda da luz incidente na variação dos índices de refração das camadas do

*biochip*. Este efeito da variação do comprimento de onda se mostrou mais acentuado do que o da variação de temperatura para os valores dos índices de refração das camadas que formam o *biochip*.

O modelo matemático proposto para o sistema completo incluiu a dependência da corrente de injeção na fonte de luz, da temperatura e do tempo de integração da câmera. Com este modelo foi possível analisar o comportamento de todo sistema e identificar que é mais importante manter o comprimento de onda da fonte de luz fixo do que a intensidade. Diante das análises realizadas foram propostas duas alternativas para controle do comprimento de onda. Os resultados obtidos demonstraram que foi possível manter o comprimento de onda fixo, alternado o valor da corrente de injeção da fonte de luz quando existe uma variação no valor da temperatura.

Os resultados experimentais obtidos demonstraram a viabilidade da utilização dos parâmetros propostos na análise do sinal SPR. O estudo comparativo demonstrou que a Largura da curva foi o parâmetro com maior taxa de variação relativa, indicando que é capaz de detectar mais rapidamente modificações na camada sensível. Em contrapartida a largura também é mais sensível a variações de temperatura.

Para os parâmetros da morfologia da curva a técnica utilizada para obtenção do ângulo de ressonância é determinante na precisão do valor calculado, podendo modificar a dinâmica de comportamento do parâmetro. A escolha do valor da linha base é outro fator que influencia os valores de  $\Gamma$  e  $G$ .

A utilização da energia do sinal, descrita na seções 3.1.1, utiliza diretamente os valores obtidos do sinal de imagem captado para a substância, evitando a necessidade da normalização pelo sinal de referência. O cálculo pode ser inclusive realizado diretamente com os valores inteiros obtidos da conversão analógico digital para cada *pixel* da câmera, o que diminui consideravelmente o tempo de processamento.

Com os novos parâmetros é possível identificar mudanças no comportamento do sinal não observadas no monitoramento de  $\theta_{res}$  e de  $n_{eff}$ . Isto permite a discriminação de ligações reversíveis e irreversíveis de proteínas, com a possibilidade de identificar o ponto de formação e remoção da monocamada.

Os dados experimentais revelaram uma ampla variedade de características na forma da curva SPR. Foram indentificadas quatro contribuições diferentes e independentes no valor da largura da curva, sendo os efeitos térmicos dominantes na temperatura ambiente. Ao contrário do ângulo de ressonância, os parâmetros da morfologia da curva apresentaram uma sensibilidade elevada à transição da condição de superfície hidrofóbica ou hidrofílica.

Apesar das dificuldades encontradas os resultados obtidos demonstram a viabilidade da solução proposta, que transforma um dispositivo portátil em um biossensor SPR. Desta forma abre-se um conjunto de novas possibilidades de utilização de biossensores, pois, os torna possível de serem adquiridos e utilizados por quaisquer usuários. Com o aprimoramento deste

projeto, será possível por exemplo que um usuário, sem conhecimento técnico em equipamentos de análises laboratoriais, possa inserir uma solução com amostra de urina ou sangue no dispositivo e o mesmo apresente uma indicação da presença de uma doença.

## 6.1 Trabalhos Futuros

Para dar continuidade ao trabalho desenvolvido no doutorado, pretende-se realizar seguintes atividades:

- confeccionar a célula de fluxo para o *biochip* trapezoidal, o que permitirá a realização de experimentos que possam validar sua utilização.
- desenvolver um *biochip* específico para o *smartphone* a ser utilizado, otimizando dimensões de configuração para um melhor desempenho.
- aperfeiçoar o projeto da célula de fluxo para reduzir o tamanho, melhorar a vedação e facilitar sua troca;
- diante dos problemas mecânicos encontrados, será preciso utilizar outra alternativa na fabricação das peças do equipamento final, com utilização de materiais rígidos suficientes para as dimensões necessárias;
- melhorar o *design* da estrutura facilitando troca, manuseio das partes mecânicas e interação com o sistema;
- realizar experimentos utilizando como fonte de luz imagens com diferentes cores, o que permitirá um comparativo e análise da influência de cada uma. Desta forma espera-se ser possível estimar simultaneamente o índice de refração e espessura através da informação de dois comprimentos de onda diferentes;
- dividir a célula de fluxo em vários canais e analisar múltiplas substâncias simultaneamente. A modificação na célula de fluxo permitirá a inserção de um canal de referência para minimizar efeito da temperatura;
- modificar o *software* desenvolvido para realizar a média de imagens capturadas no próprio dispositivo. Isto permitirá uma melhoria na redução do ruído temporal;
- aprimorar o projeto para utilização de *smartphones* mais modernos que possuem recursos de *hardware* e *software* mais avançados, como obtenção do sinal bruto da imagem, maior liberdade na configuração da câmera e melhores resoluções de tela e sensores de imagem.

- analisar o efeito de aquecimento gerado pelo led do *flash*, propondo uma solução para compensação deste efeito;
- aprimorar o estudo e análise dos resultados obtidos para o sinal de luminância, refinando a modelagem matemática para identificar o real efeito do modo misto entre interrogação angular e espectral;
- adequar e validar o modelo proposto com experimentos realizados em *smartphone*;
- desenvolver uma plataforma experimental que possibilite controlar a temperatura de todo o biossensor e outra específica para controlar a temperatura da câmera. Desta forma será possível analisar o comportamento do ruído escuro que é dependente da temperatura, além de realizar os testes de acordo com o padrão EMVA 1288 para caracterizar a câmera do biossensor;
- analisar a variação da imagem obtida em função da temperatura do sistema e corrente do diodo *laser*. Em função destes resultados, pretende-se manter a corrente do diodo *laser* constante e tentar compensar a variação da temperatura por uma transformada na imagem captada do sinal de referência ou da substância analisada;
- analisar o efeito da dispersão da luz gerada pelo *pixel* da tela assim como da interferência causada pelos *pixel* vizinhos na propagação do feixe de luz.

# Referências Bibliográficas

ALLEYNE, C. J.; KIRK, A. G.; CHIEN, W.-Y.; CHARETTE, P. G. Numerical method for high accuracy index of refraction estimation for spectro-angular surface plasmon resonance systems. *Opt. Express*, OSA, v. 16, n. 24, p. 19493–19503, Nov 2008.

BALBINOT, A.; BRUSAMARELLO, V. *INSTRUMENTAÇÃO E FUNDAMENTOS DE MEDIDAS*. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2010. v. 1. ISBN 9788521617549.

BREMER, K.; ROTH, B. Fibre optic surface plasmon resonance sensor system designed for smartphones. *Opt. Express*, OSA, v. 23, n. 13, p. 17179–17184, Jun 2015.

BROWN, D. E.; GEORGE, S. M.; HUANG, C.; WONG, E. K. L.; RIDER, K. B.; SMITH, R. S.; KAY, B. D. H<sub>2</sub>O condensation coefficient and refractive index for vapor-deposited ice from molecular beam and optical interference measurements. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 100, n. 12, p. 4988–4995, 1996.

BYRNE, D.; KEATING, B. A laser diode model based on temperature dependent rate equations. *Photonics Technology Letters, IEEE*, v. 1, n. 11, p. 356–359, nov. 1989. ISSN 1041-1135.

CARVALHO, R. M. de; RATH, S.; KUBOTA, L. T. Spr- uma nova ferramenta para biosensores. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 97–104, 2003.

CHINOWSKY, T. M.; GROW, M. S.; JOHNSTON, K. S.; NELSON, K.; EDWARDS, T.; FU, E.; YAGER, P. Compact, high performance surface plasmon resonance imaging system. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 9-10, p. 2208–2215, April 2007.

CHINOWSKY, T. M.; JUNG, L. S.; YEE, S. S. Optimal linear data analysis for surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 54, n. 1-2, p. 89–97, September 1999. ISSN 0925-4005.

CHINOWSKY, T. M.; SOELBERG, S. D.; BAKER, P.; SWANSON, N. R.; KAUFFMAN, P.; MACTUTIS, A.; GROW, M. S.; ATMAR, R.; YEE, S. S.; FURLONG, C. E. Portable 24-analyte surface plasmon resonance instruments for rapid, versatile biodetection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 9-10, p. 2268 – 2275, 2007. ISSN 0956-5663.

CHINOWSKY, T. M.; STRONG, A. A.; BARTHOLOMEW, D. U.; JORGENSEN-SOELBERG, S.; NOTIDES, T.; FURLONG, C. E.; YEE, S. S. Improving surface plasmon resonance sensor performance using critical-angle compensation. In: *Chemical Microsensors and Applications II*. Boston, MA, USA: SPIE, 1999. v. 3857, n. 1, p. 104–113.

COSKUN, A. F.; NAGI, R.; SADEGHI, K.; PHILLIPS, S.; OZCAN, A. Albumin testing in urine using a smart-phone. *Lab Chip*, The Royal Society of Chemistry, v. 13, p. 4231–4238, 2013.

C.THISTRUP; ZONG, W.; BORRE, M.; NEFF, H.; PEDERSEN, H.; HOLZHUETER, G. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. *Sensors Actuators B:Chemical*, v. 100, n. 3, p. 298–308, May 2004.

CUESTA, A.; KOLB, D. The structure of bromide and chloride adlayers on au(100) electrodes: an in situ stm study. *Surface Science*, v. 465, n. 3, p. 310 – 316, 2000. ISSN 0039-6028.

DUTTA, S.; CHOUDHURY, A.; NATH, P. Evanescent wave coupled spectroscopic sensing using smartphone. *IEEE Photonics Technology Letters*, v. 26, n. 6, p. 568–570, March 2014. ISSN 1041-1135.

EMVA. *EMVA Standard 1288, Standard for Characterization of Image Sensors and Cameras*. 2012.

FERREIRA, M. *Óptica e Fotónica*. Portugal: LIDEL, 2003. ISBN 972757288X e 978-9727572885.

FONTANA, E.; PANTELL, R. H. Characterization of multilayer rough surfaces by use of surface-plasmon spectroscopy. *Phys. Rev. B*, American Physical Society, v. 37, p. 3164–3182, Mar 1988.

FRIEDT, J. M.; FRANCIS, L.; REEKMANS, G.; PALMA, R. D.; CAMPITELLI, A.; SLEYTR, U. B. Simultaneous surface acoustic wave and surface plasmon resonance measurements: electrodeposition and biological interactions monitoring. *Journal of Applied Physics*, v. 95, n. 4, p. 13, 2003.

GALLEGOS, D.; LONG, K. D.; YU, H.; CLARK, P. P.; LIN, Y.; GEORGE, S.; NATH, P.; CUNNINGHAM, B. T. Label-free biodetection using a smartphone. *Lab Chip*, The Royal Society of Chemistry, v. 13, p. 2124–2132, 2013.

GENG, J.; ZHANG, E.; YU, X. A scanning surface plasmon resonance sensor based on the phase shift algorithm. *Measurement Science and Technology*, v. 23, n. 4, p. 045105, 2012.

GNENNINGER, G.; PILIARIK, M.; HOMOLA, J. Data analysis for optical sensors based on spectroscopy of surface plasmons. *Meas. Sci. Technol.*, v. 13, n. 12, p. 2038–2046, November 2002.

HAMMOND, J. L.; BHALLA, N.; RAFIEE, S. D.; ESTRELA, P. Localized surface plasmon resonance as a biosensing platform for developing countries. *Biosensors*, v. 4, n. 2, p. 172–188, 2014. ISSN 2079-6374.

HANSEN, L. E.; JOHNSTON, M. M.; WILSON, D. M. System-on-chip surface plasmon resonance sensors using pulse-based interface circuits. *Sensors*, p. 4pp, November 2005.

HARVEY, A. H.; GALLAGHER, J. S.; SENGERS, J. M. H. L. Revised formulation for the refractive index of water and steam as a function of wavelength, temperature and density. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 27, n. 4, p. 761–774, 1998.

HL6724MG AlGaInP Laser Diode ODE2044-00(M). 0. ed, 2008.

HOA, X.; KIRK, A.; TABRIZIAN, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, n. 2, p. 151–160, September 2007.

- HOFFMANN, A.; LENKEFI, Z.; SZENTIRMAY, Z. Effect of roughness on surface plasmon scattering in gold films. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 10, n. 24, p. 5503, 1998.
- HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 54, n. 1-2, p. 3 – 15, 1999. ISSN 0925-4005.
- HSU, W.-L.; LEE, S.-S.; LEE, C.-K. Ellipsometric surface plasmon resonance. *Journal of Biomedical Optics*, SPIE, v. 14, n. 2, p. 024036, 2009.
- HU, J.; HU, J.; LUO, F.; LI, W.; JIANG, G.; LI, Z.; ZHANG, R. Design and validation of a low cost surface plasmon resonance bioanalyzer using microprocessors and a touch-screen monitor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 7, p. 1974 – 1978, 2009. ISSN 0956-5663.
- HU, J.; ZHAO, X. An improved centroid algorithm for a surface plasmon resonance bioanalyzer using microprocessors. In: *Photonics and Optoelectronics, 2009. SOPO 2009. Symposium on*. Wuhan, China: IEEE, 2009. p. 1–4. ISSN 2156-8464.
- IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology Gold Book*. 2nd. ed. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). ISBN 0-9678550-9-8.
- JOHANSEN, K.; STÅLBERG, R.; LUDSTRÖM, I.; LIEDBERG, B. Surface plasmon resonance: instrumental resolution using photo diode arrays. *Meas. Sci. Technol.*, v. 11, n. 11, p. 1630–1638, August 2000.
- JOHNSTON, K. S.; YEE, S. S.; BOOKSH, K. S. Calibration of surface plasmon resonance refractometers using locally weighted parametric regression. *Analytical Chemistry*, v. 69, n. 10, p. 1844–1851, 1997.
- KHANARIAN, G.; CELANESE, H. Optical properties of cyclic olefin copolymers. *Optical Engineering*, v. 40, n. 6, p. 1024–1029, 2001.
- KOUTSIUOBRAS, A. G.; SPILIOPOULOS, N.; ANASTASSOPOULOS, D. L.; VRADIS, A. A.; PRIFTIS, G. D. Surface plasmon resonance as tool for the estimation of adsorbed polymeric layer characteristics: Theoretical considerations and experiment. *Journal of polymer science. Part B. Polymer physics*, v. 45, p. 2060–2070, March 2007.
- KRETSCHMANN, E. Die bestimmung optischer konstanten von metallen durch anregung von oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, Springer Berlin / Heidelberg, v. 241, p. 313–324, 1971. ISSN 0939-7922. 10.1007/BF01395428.
- KURIHARA, K.; NAKAMURA, K.; SUZUKI, K. Asymmetric spr sensor response curve-fitting equation for the accurate determination of spr resonance angle. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 86, n. 1, p. 49–57, August 2002.
- LARSSON, E. M.; LANGHAMMER, C.; ZORIC, I.; KASEMO, B. Nanoplasmonic probes of catalytic reactions. *Science*, v. 326, n. 5956, p. 1091–1094, 2009.
- LIU, Y.; LIU, Q.; CHEN, S.; CHENG, F.; WANG, H.; PENG, W. Surface plasmon resonance biosensor based on smart phone platforms. *Scientific Reports*, v. 5, n. 12864, p. 761–774, 2015.
- LIU, Y.; XU, S.; TANG, B.; WANG, Y.; ZHOU, J.; ZHENG, X.; ZHAO, B.; XU, W. Note: Simultaneous measurement of surface plasmon resonance and surface-enhanced raman scattering. *Review of Scientific Instruments*, AIP, v. 81, n. 3, p. 036105, 2010.

LOUREIRO, F.; NETO, A. B.; MOREIRA, C.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. A method for determining the mutual diffusion coefficient of molecular solutes based on surface plasmon resonance sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, In Press, Corrected Proof, p. –, 2010. ISSN 0925-4005.

MARQUES, A. L. F.; SILVA, H. J. A. da. Circuito de comando para laser semiconductor-modulação fsk directa.

MENA, P.; KANG, S.-M. S.; DETEMPLE, T. Rate-equation-based laser models with a single solution regime. *Lightwave Technology, Journal of*, v. 15, n. 4, p. 717–730, Apr 1997. ISSN 0733-8724.

MEYER, S. A.; RU, E. C. L.; ETCHEGOIN, P. G. Combining surface plasmon resonance (spr) spectroscopy with surface-enhanced raman scattering (sers). *Anal. Chem*, v. 83, n. 6, p. 2337–2344, 2011.

MOREIRA, C.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H.; THIRSTRUP, C. Temperature-dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold-water interface. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 134, n. 2, p. 854 – 862, 2008.

MOREIRA, C.; NETO, A. G. B.; LIMA, A. M. N.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Exchangeable low cost polymer biosensor chip for surface plasmon resonance spectroscopy. In: . Lausanne, Switzerland: Elsevier, 2009. v. 1, n. 1, p. 1479 – 1482.

MUNECHIKA, K.; SMITH, J. M.; CHEN, Y.; GINGER, D. S. Plasmon line widths of single silver nanoprisms as a function of particle size and plasmon peak position. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 111, n. 51, p. 18906–18911, 2007.

NABOK, A.; TSARGORODSKAYA, A.; HASSAN, A.; STARODUB, N. Total internal reflection ellipsometry and spr detection of low molecular weight environmental toxins. *Applied Surface Science*, v. 246, n. 4, p. 381 – 386, 2005. ISSN 0169-4332. 9th European Conferences on Organised Films.

NAIMUSHIN, A. N.; SOELBERG, S. D.; BARTHOLOMEW, D. U.; ELKIND, J. L.; FURLONG, C. E. A portable surface plasmon resonance (spr) sensor system with temperature regulation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 96, p. 253–260, November 2003.

NAIMUSHIN, A. N.; SOELBERG, S. D.; BARTHOLOMEW, D. U.; ELKIND, J. L.; FURLONG, C. E. A portable surface plasmon resonance (spr) sensor system with temperature regulation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 96, n. 1-2, p. 253 – 260, 2003.

NAVRUZ, I.; COSKUN, A. F.; WONG, J.; MOHAMMAD, S.; TSENG, D.; NAGI, R.; PHILLIPS, S.; OZCAN, A. Smart-phone based computational microscopy using multi-frame contact imaging on a fiber-optic array. *Lab Chip*, The Royal Society of Chemistry, v. 13, p. 4015–4023, 2013.

NEFF, H.; LIMA, A. M. N.; LOUREIRO, F.; ALMEIDA, L. de. Transient response analysis and modeling of near wall flow conditions in a micro channel: evidence of slip flow. *Microfluidics and Nanofluidics*, Springer Berlin / Heidelberg, v. 3, p. 591–602, 2007. ISSN 1613-4982. 10.1007/s10404-007-0148-5.

NEFF, H.; ZONG, W.; LIMA, A. M. N.; BORRE, M.; HOLZHUETER, 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.

OPTICS, O. *USB4000 Fiber Optic Spectrometer Installation and Operation Manual*. 2008.

OWEGA, S.; POITRAS, D. Local similarity matching algorithm for determining spr angle in surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 123, n. 1, p. 35 – 41, 2007. ISSN 0925-4005.

OZDEMIR, 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, March 2003. ISSN 0733-8724.

PEREIRA, E.; OLIVEIRA, L.; MORAIS, M.; LIMA, A. M. N. L.; NEFF, H. Improved data extraction algorithm for biosensors utilizing surface plasmon resonance sensing. In: *Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC) Proceedings, 2014 IEEE International*. Montevideo, Uruguay: IEEE, 2014. p. 1105–1110.

PERNER, M.; KLAR, T.; GROSSE, S.; LEMMER, U.; PLESSSEN, G. von; SPIRKL, W.; FELDMANN, J. Homogeneous line widths of surface plasmons in gold nanoparticles measured by femtosecond pump-and-probe and near-field optical spectroscopy. *Journal of Luminescence*, v. 76-77, p. 181 – 184, 1998. ISSN 0022-2313. Proceedings of the Eleventh International Conference on Dynamical Processes in Excited States of Solids.

PILIARIK, M.; HOMOLA, J. Surface plasmon resonance (spr) sensors: approaching their limits? *Optics Express*, v. 17, n. 19, p. 16505–16517, September 2009.

PILIARIK, M.; VALA, M.; TICHÝ, I.; HOMOLA, J. Compact and low-cost biosensor based on novel approach to spectroscopy of surface plasmons. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 12, p. 3430 – 3435, 2009. ISSN 0956-5663.

PREECHABURANA, P.; GONZALEZ, M. C.; SUSKA, A.; FILIPPINI, D. Surface plasmon resonance chemical sensing on cell phones. *Angewandte Chemie International Edition*, WILEY-VCH Verlag, v. 51, n. 46, p. 11585–11588, 2012. ISSN 1521-3773.

QIU, L.; LARSON, T. A.; SMITH, D.; VITKIN, E.; MODELL, M. D.; KORGEL, B. A.; SOKOLOV, K. V.; HANLON, E. B.; ITZKAN, I.; PERELMAN, L. T. Observation of plasmon line broadening in single gold nanorods. *Applied Physics Letters*, AIP, v. 93, n. 15, p. 153106, 2008.

RAETHER, H. *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. v. 111.

REIMHULT, E.; LARSSON, C.; KASEMO, B.; HÄLLK, F. Simultaneous surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water. *Analytical Chemistry*, v. 76, n. 24, p. 7211–7220, 2004.

SCHOTT. *TIE-19: Temperature Coefficient of the Refractive Index*. 2008.

- SHARMA, A. K.; GUPTA, B. Theoretical model of a fiber optic remote sensor based on surface plasmon resonance for temperature detection. *Optical Fiber Technology*, v. 12, n. 1, p. 87 – 100, 2006. ISSN 1068-5200.
- SHEIKH, S.; BLASZYKOWSKI, C.; THOMPSON, M. Acoustic wave-based detection in bioanalytical chemistry: Competition for surface plasmon resonance? *Analytical Letters*, v. 41, n. 14, p. 2525–2538, 2008.
- SILIN, V.; BALCHYTIS, G.; YAKOVLEV, V. Study on surface plasmon line broadening due to protein adsorption on a modified silver surface. *Optics Communications*, v. 97, n. 1-2, p. 19 – 24, 1993. ISSN 0030-4018.
- SOUZA FILHO, C. A.; LIMA, A. M. N.; MOREIRA, C. S.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Line shape analysis and extended instrumental operation of surface plasmon resonance sensors. *Plasmonics*, v. 5, n. 3, p. 259–266, 2010. ISSN 1557-1963.
- SOUZA FILHO, C. A.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Modeling and temperature drift compensation for surface plasmon resonance based sensors. Submitted. 2017.
- SOUZA FILHO, C. A. de. *Desenvolvimento de um Sistema Eletrônico de Aquisição e Processamento para Biosensores*. Dissertação (Dissertação de Mestrado) — UFCG, Campina Grande, Paraíba, Brasil, Novembro 2006.
- SOUZA FILHO, C. A. de; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Sistema de aquisição e processamento portátil para biosensores. *XVII Congresso Brasileiro de Automatica*, September 2008.
- SOUZA FILHO, C. A. de; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Técnicas alternativas para análise do sinal de biosensores baseados em ressonância de plasma de superfície. *XVIII Congresso Brasileiro de Automatica*, Setembro 2010.
- SOUZA FILHO, C. A. de; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Smartphone based, portable optical biosensor utilizing surface plasmon resonance. In: *2014 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC) Proceedings*. Montevideo, Uruguai: IEEE, 2014. p. 890–895. ISSN 1091-5281.
- THIRSTRUP, C.; ZONG, W. Data analysis for surface plasmon resonance sensors using dynamic baseline algorithm. *Sensors Actuators B:Chemical*, v. 106, n. 2, p. 796–802, March 2005. ISSN 0925-4005.
- THORLABS. *Operation Manual Thorlabs Instrumentation OEM Laser Diode Controller ITC1xx*. 2.15. ed. 2006.
- TOBISKA, P.; HOMOLA, J. Advanced data processing for spr biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 107, n. 1, p. 162 – 169, 2005. ISSN 0925-4005. Proceedings of the 7th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors - EUROPT(R)ODE VII.
- VASHIST, S. K.; OORDT, T. van; SCHNEIDER, E. M.; ZENGERLE, R.; STETTEN, F. von; LUONG, J. H. A smartphone-based colorimetric reader for bioanalytical applications using the screen-based bottom illumination provided by gadgets. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 67, p. 248 – 255, 2015. ISSN 0956-5663. Special Issue: {BIOSENSORS} 2014.

- WAGNER, W.; PRUSS, A. The iapws formulation 1995 for the thermodynamic properties of ordinary water substance for general and scientific use. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 31, n. 2, p. 387–535, 2002.
- WEI, Q.; QI, H.; LUO, W.; TSENG, D.; KI, S. J.; WAN, Z.; GÄRRÄCS, Z.; BENTOLILA, L. A.; WU, T.-T.; SUN, R.; OZCAN, A. Fluorescent imaging of single nanoparticles and viruses on a smart phone. *ACS Nano*, v. 7, n. 10, p. 9147–9155, 2013.
- T. Vo-Dinh, Z. Gryczynski, & J. R. Lakowicz (Ed.). *A compact surface plasmon resonance and surface-enhanced Raman scattering sensing device*, v. 5327. San Jose, California, USA: SPIE, 2004. 5-9 p.
- YUAN, Z.; GAO, S. Landau damping and lifetime oscillation of surface plasmons in metallic thin films studied in a jellium slab model. *Surface Science*, v. 602, n. 2, p. 460 – 464, 2008. ISSN 0039-6028.
- ZHANG, D.; JIANG, J.; CHEN, J.; ZHANG, Q.; LU, Y.; YAO, Y.; LI, S.; LIU, G. L.; LIU, Q. Smartphone-based portable biosensing system using impedance measurement with printed electrodes for 2,4,6-trinitrotoluene (tnt) detection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 70, p. 81 – 88, 2015. ISSN 0956-5663.
- ZHAO, R.; ZHAI, T.; WANG, Z.; WANG, Y.; LIU, D. Simultaneous excitation of cavity resonance and surface plasmon resonance in ag / al<sub>2</sub>o<sub>3</sub>/ ag layer structure. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, Springer Berlin / Heidelberg, v. 92, p. 585–588, 2008. ISSN 0946-2171.
- ZUREK, E.; MORENO, W.; GARCIA-RUBIO, L. A numerical approach to simplify the diffraction grating model. In: . Victoria, BC, Canada: IEEE, 2008. p. 2108 –2113. ISSN 1091-5281.