



ALESSANDRO FALQUETO

**Estudo e implementação de um biossensor de
Ressonância de Plásmons de Superfície baseado
em *smartphone***

**João Pessoa - PB
Junho de 2019**



Alessandro Falqueto

Estudo e implementação de um biossensor de Ressonância de Plásmons de Superfície baseado em *smartphone*

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica do Instituto Federal da Paraíba, como requisito necessário à obtenção do grau de Mestre em Ciências no Domínio da Engenharia Elétrica.

Área de Concentração: Processamento Digital de Sinais

Cleumar da Silva Moreira, Dr - IFPB

Orientador

Carlos Alberto de Souza Filho, Dr - UFPB

Coorientador

Rossana Moreno Santa Cruz, Dra - IFPB

Coorientadora

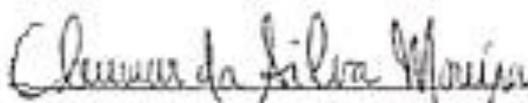
João Pessoa – PB, junho de 2019
©Alessandro Falqueto – alefalqueto@gmail.com

Alessandro Falqueto

**Estudo e implementação de um biossensor de
Ressonância de Plásmons de Superfície baseado
em *smartphone***

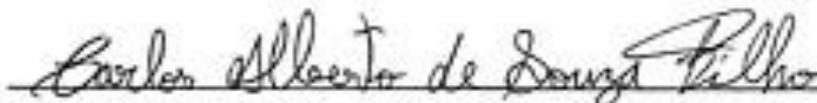
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 19/06/2019

BANCA EXAMINADORA



Cleumar da Silva Moreira, Dr., IFPB

Orientador



Carlos Alberto de Souza Filho, Dr., UFPB

Coorientador



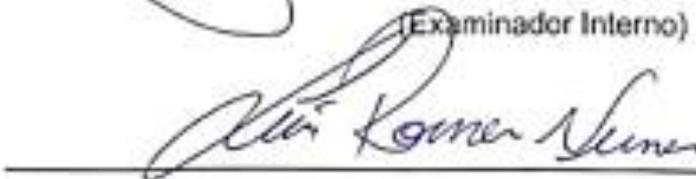
Rossana Moreno Santa Cruz, Dra., IFPB

Coorientadora



Joabson Nogueira de Carvalho, Dr. IFPB

(Examinador Interno)



Luis Romeu Nunes, Dr. IFPB

(Examinador Externo)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP
Biblioteca Nilo Peçanha – IFPB, *Campus João Pessoa*

F196e	Falqueto, Alessandro Estudo e implementação de um biossensor de Ressonância de Plásmons de Superfície baseado em smartphone / Alessandro Falqueto. – 2019. 81 f. : il. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Instituto Federal da Paraíba – IFPB / Coordenação de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, 2019. Orientador : Prof.º Cleumar da Silva Moreira Coorientadora : Prof.ª Rossana Moreno Santa Cruz Coorientador : Prof.º Carlos Alberto de Souza Filho 1. Engenharia Eletrica. 2. Biossensor. 3. Ressonância de Plásmons de Superfície. I. Título. CDU 621.3(043)
-------	--

Ivanise Andrade M. de Almeida
Bibliotecária-Documentalista
CRB-15/0096

LISTA DE SIGLAS

ABS	<i>Acrylonitrile Butadiene Styrene</i> (Acrilonitrila Butadieno Estireno)
AIM	<i>Angular Interrogation Mode</i> (Modo de Interrogação Angular)
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> (Reflexão Total Atenuada)
BFL	<i>Back Focal Length</i> (Distância Focal Posterior)
BSA	<i>Bovin Sorum Albumin</i> (Albumina Soro Bovina)
CD	<i>Compact Disk</i> (Disco Compacto)
CCD	<i>Charge Couple Device</i> (Dispositivo de Carga Acoplada)
CMOS	<i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i> (Semicondutor Complementar de Óxido Metálico)
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DOCE	<i>Diffraction Optic Couplin Elements</i> (Elemento de Acoplamento Óptico de Difração)
EFL	<i>Effective Focal Length</i> (Distância Focal Efetiva)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
IIM	<i>Intensity Interrogation Mode</i> (Modo de Interrogação de Intensidade)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
PIM	<i>Phase Interrogation Mode</i> (Modo de Interrogação de Fase)
PPBIO	Prisma Polimérico para Aplicações Biológicas
RNA	<i>Ribo Nucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Ressonância de Plásmon de Superfície)
SPW	<i>Surface Plasmons Wave</i> (Ondas de Plásmons de Superfície)
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
VIR	Biossensor desenvolvido pela empresa dinamarquesa VIR e doado a UFCG
WIM	<i>Wavelength Interrogation Mode</i> (Modo de Interrogação Espectral)

Resumo

Os biossensores têm se mostrado uma opção viável na obtenção de um equipamento que seja relativamente simples de se usar, com análise em tempo real, sem uso de marcadores, portátil, de baixo custo. Em 2017 Souza Filho criou um sistema biossensor óptico baseado em ressonância de plásmons de Superfície tendo um smartphone como plataforma. Esse sistema usa um *biochip* criado pela empresa dinamarquesa VIR que foi doado a Universidade Federal de Campina Grande. Nesse *biochip* o feixe de luz que entra perpendicularmente a superfície é direcionado para a região sensora através de técnicas holográficas. Em 2010 o *biochip* PPBIO (Prisma Polimérico para Aplicações Biológicas) foi criado e moldado usando técnicas de injeção com polímero Topas COC tendo sido testado apenas em condições ideais de laboratório. O presente trabalho tem como foco criar um sistema biossensor com tecnologia brasileira incorporando o PPBIO ao smartphone. A ideia é fundir as duas tecnologias, mas são necessárias adaptações de estrutura física e de *software*, pois o *biochip* da empresa VIR dispensa o uso de lentes externas, o *biochip* PPBIO que possui estrutura mais econômica necessita de elementos complementares externamente. O uso de lentes externas traz dificuldade quanto a necessidade do perfeito alinhamento entre os componentes do sistema, mas por outro lado, ganha-se em flexibilidade, pois, pode ser configurado para trabalhar no modo de interrogação angular ou no modo de interrogação espectral. Como resultado ter-se-á um biossensor portátil, de baixo custo, fácil de operar que pode ser utilizado nos mais diversos ambientes.

ABSTRACT

Biosensors have proven to be a viable option in obtaining equipment that is relatively simple to use, with real-time, low-cost, portable, non-markers analysis. In 2017 Souza Filho created an optical biosensor system based on resonance of Surface Plasmas having a smartphone as a platform. This system uses a *biochip* created by the Danish company VIR that was donated to the Federal University of Campina Grande. In this *biochip* the light beam that enters perpendicularly the surface is directed towards the sensor region through holographic techniques. In 2010 the PPBIO (Polymeric Prism for Biological Applications) *biochip* was created and molded using injection techniques with Topas COC polymer having been tested only under ideal laboratory conditions. The present work focuses on creating a biosensor system with Brazilian technology incorporating PPBIO to the smartphone. The idea is to merge the two technologies, but adaptations of physical structure and software are necessary, since the *biochip* of the VIR company does not require the use of external lenses, the PPBIO *biochip* that has a more economical structure needs complementary elements externally. The use of external lenses makes it difficult to perfectly align the components of the system, but on the other hand, you gain flexibility because it can be configured to work in angular interrogation mode or in spectral interrogation mode. As a result, a low-cost, easy-to-operate portable biosensor can be used in a variety of environments.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	4
1.2.1 Objetivo Geral	4
1.2.1 Objetivos Específicos	4
1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	5
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
2.1 BIOUSSENSORES	6
2.2 RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE	8
2.3 BIOUSSENSORES BASEADOS EM RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE	11
2.4 SOLUÇÃO EMBARCADA AO BIOUSSENSOR VIR	18
2.5 CONHECENDO O <i>BIOCHIP</i> PPBIO	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 PLATAFORMA PARA O MODO DE INTERROGAÇÃO ANGULAR	25
3.2 PLATAFORMA PARA O MODO DE INTERROGAÇÃO ESPECTRAL	29
3.3 METODOLOGIA DO TRABALHO	33
4. RESULTADOS	35
4.1 SIMULAÇÕES DAS CURVAS SPR	35
4.2 SIMULAÇÕES PARA OBTENÇÃO DA DISTÂNCIA DA LENTE CILÍNDRICA PARA O MODO AIM	40
4.3 CONSTRUÇÃO DA ESTRUTURA MODULAR	53
4.4 RESULTADOS OBTIDOS COM A CONFIGURAÇÃO AIM	56
4.5 RESULTADOS OBTIDOS NA CONFIGURAÇÃO WIM	61
5. CONCLUSÕES	69
6. TRABALHOS FUTUROS	73
7. PUBLICAÇÕES DURANTE O MESTRADO	74
8. REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

Movido pela busca incessante de melhores condições de vida, o ser humano vem evoluindo à medida que desenvolve e incorpora novas tecnologias ao seu dia a dia. Esse processo de incorporação não é simples, não envolve apenas a disponibilidade de recursos financeiros. O desafio é levar tecnologia até as diversas localidades do planeta, por mais remota que seja. Sob este aspecto, ganha relevância o desenvolvimento de sistemas capazes analisar a qualidade da água, contaminação do solo, da presença de agrotóxicos em alimentos e existência de enfermidades nas pessoas nos mais diversos locais. Neste último caso, o local pode ser desde um simples consultório médico de um bairro de periferia a pontos isolados do planeta. Para isso, a tecnologia tem que ser simples, com resultados em curto espaço de tempo e a um custo relativamente baixo.

Nas últimas décadas, vem recebendo significativa atenção dos cientistas o desenvolvimento de biossensores, os quais são dispositivos capazes de medir, em tempo real, a presença de determinada substância no sangue, na urina, em medicamentos, em alimentos, na água de um rio, no solo com aplicações nas mais diversas áreas: segurança interna, aplicações militares, agricultura, segurança alimentar, monitoramento ambiental, medicina, farmacologia, indústria (KIRSCH et al., 2013; KUBOTA, 2003). A IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada), define um biossensor 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 (MCNAUGHT; WILKINSON, 1997).

Estima-se que haja 300 milhões de pessoas com diabetes em todo o mundo, no Brasil, são aproximadamente 11 milhões de portadores (TERRA, 2018). Um dos usos de biossensor mais conhecido é o de detecção do nível de glicose no sangue, essencial no controle da diabetes. Impulsionados pelas necessidades da medicina e das ciências biológicas, uma série de novos equipamentos de pronto atendimento baseado em *smartphones* tem sido investigados, na busca do controle dessa doença e de outras (BREMER et al.).

Em maio de 2018, realizou-se uma conferência médica sobre biossensores no Cambridge Healthtech Institute, em Boston MA, onde foram examinados os mais recentes avanços em pesquisa e integração de sensores para aplicações médicas. Registrou-se um crescimento exponencial do uso de biossensores pelo mercado, devido às técnicas de microfabricação. Nesta conferência estimou-se que até o final de 2018 os investimentos cheguem a U\$ 18 bilhões (“Biosensors Conference”, 2018).

Nos últimos anos inúmeras pesquisas (BREMER et al., 2017; CALABRIA et al., 2017; GENG et al., 2017; LIU et al., 2015; SOUZA FILHO; LIMA; NEFF, 2014; WANG et al., 2017; ZHANG; LIU, 2016) entre outras tem relatado o uso de *smartphone* com sensores baseados em ressonância de plásmons de superfície – SPR.

Em especial, Bremer conseguiu obter medidas com precisão das variações do índice de refração induzidas em amostras sob análise em uma fibra óptica. O equipamento foi incorporado a uma estrutura de forma a simplificar o manuseio do sistema sensor e dar versatilidade, podendo ser adaptado a diferentes tipos de *smartphones*. Souza Filho (2017), conseguiu resultados similares usando um *biochip* da empresa VIR. Sua solução embarcada transforma dispositivos computacionais portáteis em biossensores SPR, ou seja, um equipamento portátil (*smartphone, tablet, notebook, etc*) associado a uma estrutura modular com um *biochip* é capaz de realizar análises de substâncias orgânicas e inorgânicas.

Esses biossensores ópticos baseados em ressonância de plásmons de superfície poderão ser uma alternativa potencialmente robusta e econômica para aplicações em campo em um futuro próximo para a identificação rápida e segura de substâncias químicas (metais pesados, moléculas, proteínas, DNA, RNA, agrotóxicos, etc), patógenos (vírus, bactérias, células, protozoários, etc), nas mais diversas áreas: medicina, biologia, química, segurança, meio ambiente (CENNAMO et al., 2016).

Os métodos convencionais de análise bioquímica (espectroscopia, gravimetria, titulometria, etc) apresentam como desvantagem o fato de serem realizados em laboratórios (MOREIRA, 2010). A logística envolvida no transporte da

amostra até o laboratório resulta na demora de dias para se ter o resultado. Além do custo envolvido nessa logística, há um custo considerável associado à necessidade de profissionais qualificados para a operação, manutenção dos equipamentos laboratoriais envolvidos na análise das substâncias coletadas.

O Poder Público com o apoio do Ministério da saúde, vem fomentando pesquisas na busca de alternativas para solução de problemas como: dificuldades de tempo, logística (locais afastados) e custo. Têm sido desenvolvidas, técnicas mais precisas e rápidas para diagnósticos de doenças epidêmicas que exigem um diagnóstico rápido. Entre estas técnicas, destacam-se os imunoenaios, que se baseiam na ligação sensível e específica que ocorre entre o anticorpo e o seu correspondente antígeno. Apesar de representar uma melhoria das técnicas de análise, o imunoenasão tem suas desvantagens, incluindo, a existência de um marcador que pode interferir nas interações moleculares gerando falsos resultados (MOREIRA, 2010). Este estudo visa chegar a um equipamento que seja relativamente simples de se usar, com análise em tempo real, sem uso de marcadores, portátil, de baixo custo.

O Grupo de Sensores e Biossensores Ópticos criado no IFPB e registrado no CNPq, é parte de uma variada rede de pesquisas, que se constitui em uma instância estratégica para o desenvolvimento e consolidação do conhecimento científico e tecnológico brasileiro. O presente trabalho visa contribuir para a continuidade das pesquisas realizadas (desenvolver para consolidar) por Moreira e Souza Filho (MOREIRA, 2010; SOUZA FILHO, 2017).

Para tanto, pretende-se: unificar as duas tecnologias (*Biochip* PPBIO + dispositivo computacional portátil) obtendo uma solução tecnológica pequena, rápida e estável, sendo necessário um conhecimento técnico mínimo para operá-la. Essas características lhe dão flexibilidade para ser empregado nos mais variados locais, seja num simples consultório, seja em locais de difícil acesso. Além desta justificativa, o presente trabalho também busca uma solução à dificuldade inerente de um país que tem limites fronteiriços continentais com enormes distâncias envolvidas. Se confirmado o efetivo funcionamento do *biochip* trapezoidal criado por Moreira com a ferramenta smartphone desenvolvida pelos autores citados acima, talvez possa-se materializá-lo em uma ferramenta genuinamente brasileira, um

equipamento portátil, de uso simples, com análise em tempo real, para aplicações remotas, de baixo custo, sem uso de marcadores (MOREIRA, 2010; SOUZA FILHO, 2017).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Incorporar o *biochip* trapezoidal, PPBIO (Prisma Polimérico para aplicações Biológicas), à solução embarcada *smartphone* e realizar testes experimentais com substâncias conhecidas como hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio, na busca de validar os resultados. Esses testes terão como foco a identificação de substâncias biológicas e químicas visando o diagnóstico de doenças, patógenos em alimentos e contaminantes no meio ambiente no futuro.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Realizar um levantamento bibliográfico com vistas a contextualizar os biossensores, sua estrutura, funcionamento e aplicações práticas;
- Dar continuidade aos estudos sobre o funcionamento do *smartphone* com *biochip* da empresa VIR na busca de possíveis modificações para uso de outros *biochips*;
- Investigar o *biochip* PPBio, como é composto, modo e estrutura de funcionamento e utilização de célula de fluxo com espectrômetro;
- Fabricar uma estrutura para abrigar a célula de fluxo e o *biochip* trapezoidal, para uso no *smartphone*, atentando-se para minimizar os efeitos da variação de temperatura ambiente sobre a mesma.

1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido em 4 capítulos os quais descrevem as etapas e os procedimentos aplicados para alcançar os objetivos propostos.

Capítulo 1 – Introdução: aborda os aspectos gerais que motivam o desenvolvimento do trabalho e sua contribuição para melhorar a qualidade de vida das pessoas. Em seguida, é apresentada a formulação do problema a ser solucionado, a justificativa e os objetivos gerais e específicos pertinentes ao estudo.

Capítulo 2 – Fundamentação Teórica: apresenta uma revisão bibliográfica acerca das teorias que formaram a base de estudo, explanando conceitos fundamentais sobre biossensores, em especial o biossensor óptico baseado em ressonância de plásmons de superfície, os modelos de montagem, aplicações, além do estudo da solução embarcada *smartphone* com biossensor da Empresa VIR, e do *biochip PPBIO*.

Capítulo 3 – Metodologia: Tratando-se de um projeto que visa a aplicação de tecnologias em desenvolvimento, aprimorando soluções de baixo custo e eficiente, pretende-se otimizar uma estrutura modular para possibilitar o uso tanto do *biochip* da empresa VIR quanto o PPBIO no *smartphone*, dando maior flexibilidade ao sistema embarcado.

Capítulo 4 – Resultados e conclusão: neste Capítulo, serão apresentados os resultados obtidos para a caracterização e validação de um sistema embarcado de baixo custo relativo, flexível, portátil, sem necessidade de mão de obra especializada, a partir de testes realizados com substâncias conhecidas que possam servir de comparação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

No presente Capítulo será descrita a revisão bibliográfica realizada, abordando os principais temas de interesse: biossensores; ressonância de plásmons de superfície; biossensores ópticos baseados em ressonância de plásmons de superfície; solução embarcada de um *smartphone* usando o biossensor da VIR; funcionamento do *biochip* PPBIO.

2.1 BIOSSENSORES

Os biossensores são dispositivos, analíticos que utilizam reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, anticorpo, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar hormônios, drogas, vírus, bactérias, pesticidas, micróbios, antígenos, ácidos nucleicos, DNA, entre outros, que normalmente dispensam o uso de marcadores (CALIL; SILVA, [s.d.]; MOREIRA, 2010; SOUZA FILHO, 2017).

Um biossensor é composto basicamente por uma biocamada, um transdutor, elementos de condicionamento e processamento do sinal. A interação que ocorre entre a biocamada e a substância a ser identificada (analito) é percebida pelo transdutor, que gera um sinal proporcional à concentração da substância biorreconhecida (CALIL; SILVA, [s.d.]; MOREIRA et al., 2010a).

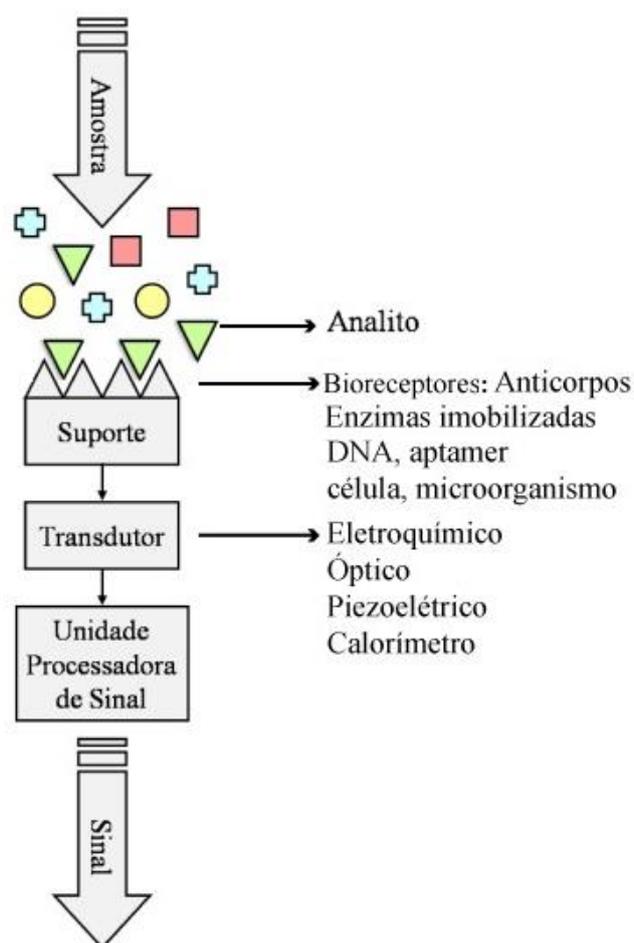
Na Figura 1, é mostrado um diagrama representativo de um biossensor: a biocamada é o bloco formado pelo suporte e o biorreceptor, que reconhecerá o analito caso esteja presente na amostra analisada. Uma classificação dos biossensores é quanto a biocamada, sendo classificados em biossensores enzimáticos, imunobiossensores e biossensores celulares. Da mesma forma, dependendo dos vários tipos de transdutores, são classificados em biossensores: eletroquímico, óptico, acústico (piezelétrico), calorimétrico (MOREIRA, 2010).

Os biossensores são capazes de detectar substâncias orgânicas e inorgânicas com alto grau de seletividade e sensibilidade. Têm ainda a vantagem de

ser relativamente fáceis em termos de desenvolvimento, acessíveis e prontos para uso, podendo ser utilizados em diversas aplicações como em análises laboratoriais, aplicações médicas, agrícolas e monitoramento ambiental. Há estudos para detecção de influenza, tuberculose, colesterol e alguns tipos de câncer (CALIL; SILVA, [s.d.]; SOUZA FILHO, 2017).

Este trabalho aborda um dos tipos de biossensor, no caso o óptico. Entre as vantagens dos biossensores ópticos, em relação aos demais, está o seu tamanho reduzido, a velocidade de resposta, a facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético, a biocompatibilidade e não-necessidade de elementos ativos na biocamada (MOREIRA et al., 2010a).

Figura 1. Diagrama representativo de um biossensor.



Fonte: Adaptada de (OLIVEIRA, A E F; PEREIRA, 2016).

Destacam-se duas limitações operacionais dos biossensores ópticos: sua sensibilidade à variação de temperatura ambiente, afetando seu desempenho e a adsorção não-específica (MOREIRA; LIMA; NEFF, 2008a, 2008b; MOREIRA et al., 2008).

A seguir, serão abordados os biossensores ópticos baseados em ressonância de plásmons de superfície. Inicialmente, faz-se um levantamento histórico, suas configurações, modelamento matemático e respectivas simulações.

2.2 RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE

Para contextualizar foi demonstrada a evolução do conhecimento sobre o fenômeno da ressonância de plásmons de superfície, nesta Seção é descrito um breve histórico sobre a complexidade da tecnologia.

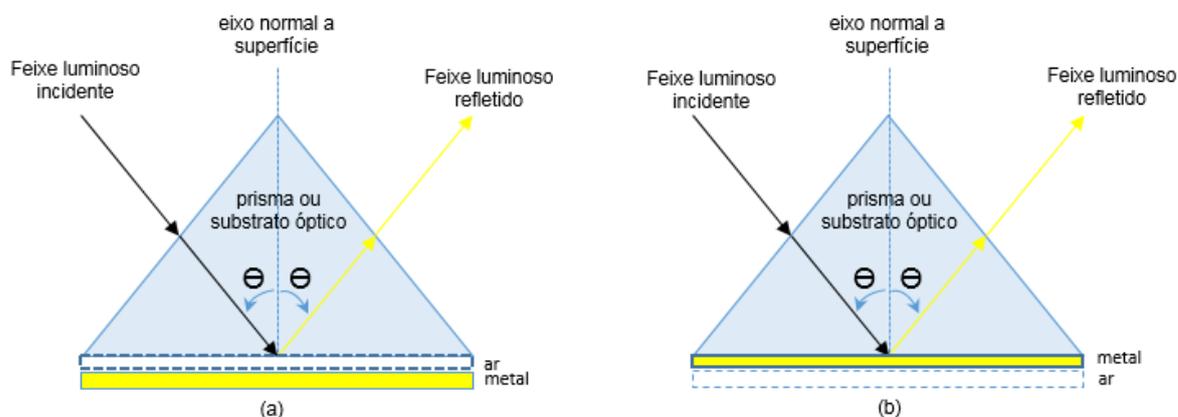
A primeira citação científica do que hoje é chamado de fenômeno SPR - *Surface Plasmon Resonance*, (Ressonância de Plásmons de superfície), data de 1902 quando Robert Willians Wood em seu trabalho publicado na Sociedade de Física de Londres relatou ter observado que, ao iluminar uma grade de difração metálica com um feixe de luz policromático (luz branca), à medida que variava o ângulo de incidência deste feixe, eram observadas faixas escuras (WOOD, 1902). À época, devido aos recursos tecnológicos incipientes, não tendo maiores possibilidades de investigação, limitou-se a registrar como “anomalias”. Alguns anos depois, 1907, Zenneck observou a existência de ondas eletromagnéticas na superfície de fronteira entre um metal e um dielétrico (SHARMA; JHA; GUPTA, 2007). Passados meio século, em 1957, quando Ritchie confirmou as pesquisas de Zenneck e chamou essas ondas eletromagnéticas de “excitação de plásmons de superfície” (RITCHIE, 1957). No ano seguinte, Thurbadar (TURBADAR, 1959) observou, acidentalmente, que incidindo feixes luminosos polarizados na fronteira entre um filme metálico e um substrato óptico, ocorria uma queda acentuada na refletividade (refletância) conforme se variava o ângulo de incidência para um

determinado comprimento de onda; o efeito também era observado quando mantendo fixo o ângulo de incidência variava-se o comprimento de onda da luz incidente. No entanto, àquela época não foi feita associação de tal efeito aos plásmons de superfície citados por Ritchie.

O fenômeno SPR começa a ser desvendado, adquirindo as feições que se conhece hoje, em 1968, quando Otto (RAETHER, 1988) demonstrou que a redução da refletância (“anomalias” citadas por Wood), para uma interface metal-dielétrico, eram interações entre os fótons da luz incidente e as oscilações longitudinais dos elétrons livres existentes na superfície do metal; essas oscilações foram denominadas de plásmons de superfície e o fenômeno como um todo denominado de ressonância de plásmons de superfície (HOMOLA, 2006; RAETHER, 1988; RITCHIE, 1957). Otto (RAETHER, 1988) desenvolveu um sistema com a configuração apresentada na Figura 2 (a), que consiste na justaposição de um prisma óptico, camada de ar e uma fina lâmina metálica. O prisma tem a função de fazer o acoplamento da luz incidente, o ar é um isolante, um dielétrico. Essa configuração mostrou-se de difícil execução pois essa estreita camada de ar, é difícil de ser mantida constante, é afetada pelas imperfeições, rugosidades da superfície do prisma e/ou lâmina metálica. No mesmo ano, Kretschmann e Raether (RAETHER, 1988) propuseram uma configuração equivalente, Figura 2(b). A diferença está na inversão de posição das camadas do metal e do dielétrico. Essa configuração com execução mais simples acabou se consolidando como padrão, tendo sido denominada como estrutura de reflexão total atenuada, (*Attenuated Total Reflection* - ATR).

Em resumo, Otto-Kretschmann-Raether conseguiram comprovar a relação de causa e efeito entre as ondas de plásmons de superfície (*Surface Plasmons Wave - SPW*) na interface metal-dielétrico e as faixas escuras visualizadas no espectro de refletância, ou seja, que a redução de refletância para uma interface metal-dielétrico era devida à interação entre os fótons incidentes e as oscilações longitudinais existentes na superfície do metal, que foram denominadas plásmons de superfície (HOMOLA, 2006).

Figura 2. Configuração de excitação dos plásmons de superfície, propostas por (a) Otto e (b) Kretschmann-Raether.



Fonte: Adaptada de (MOREIRA, 2010).

Em 1983, pesquisadores como Liedberg *et al* (SCHASFOORT, R. B. M.; TUDOS, 2008), da universidade de Linköping (Suécia), propuseram o primeiro biossensor SPR demonstrando aplicações experimentais para detecção química e biológica, baseando-se no acoplamento da luz no prisma (LIEDBERG, B; NYLANDER, C; LUNSTROM, 1983). No início da década de 90, o biossensor passou a ser produzido em escala comercial com a marca BIACORE e, atualmente, a General Electrics é quem os comercializa (MOREIRA, 2010). Este biossensor tem como pontos negativos: o custo do sistema BIACORE é acima de 100 mil dólares; cada *biochip* que é descartável custa próximo de 200 dólares; suas dimensões inviabilizam o uso portátil ou *online*, além de precisar de pessoal técnico especializado para operação e manutenção (MOREIRA et al., 2010a).

Em 1996, a Texas Instruments propôs o biossensor SPREETA como alternativa ao BIACORE, com dimensões menores, portátil e com aplicações *online*. O custo do *biochip* é em torno de 100 dólares. Mas, segundo estudos, a temperatura ambiente afeta seu ponto de operação o que pode gerar dificuldades na obtenção dos resultados.

Em 2003, a empresa dinamarquesa VIR propôs um biossensor descartável, adequado para aplicações em testes laboratoriais remotos, associado à fabricação em massa e de baixo custo, propiciado pelo processo de

moldagem por injeção (NEFF, H.; ZONG, W.; BORRE, A. M. N. L. M.; HOLZHÜTER, 2006; THIRSTRUP et al., 2004). Segundo (MOREIRA, 2010; MOREIRA et al., 2010a), embora o valor de cada *biochip* fique em torno de U\$1,00, o valor do molde de injeção é caro (acima de U\$20.000) por que usa nanotecnologia holográfica, mas pode moldar em torno de 10 mil *biochips*. O equipamento com o único biossensor construído foi doado ao laboratório de biossensores da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, juntamente com todos os componentes; isso resultou na construção de outro *biochip* (SOUZA FILHO, 2006) que é foco do presente trabalho, o *biochip* PPBIO.

Atualmente, há centenas de dispositivos comerciais, com diferentes estruturas de medição e processamento (SCHASFOORT, R. B. M.; TUDOS, 2008). A tecnologia sobre o fenômeno SPR tem crescido a passos largos nas últimas duas décadas, resultando em equipamentos menores e mais leves (portáteis), com menores custos, eficientes, de fácil operação, dispensando a necessidade de pessoas especializadas. A seguir, são descritos os biossensores SPR.

2.3 BIOSSENSORES BASEADOS EM RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE

Na presente Seção, é abordado o fenômeno conhecido como ressonância de plásmons de superfície para, em seguida, aplicá-lo em biossensores.

Apresenta-se resumidamente o modelamento matemático do funcionamento do fenômeno SPR, pois o foco está na aplicação de um dispositivo que usa a técnica SPR. Foram tomados como referência bibliográfica trabalhos científicos, artigos, teses, dissertações, entre outros (HOMOLA, 2006), (TUMOLO, 2008), (MAXIMINO, 2011; MOREIRA, 2016; SANTIAGO, 2018; SILVA, 2017), (THIRSTRUP et al., 2004), (DOST, 2008; HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999; PILIARIK; HOMOLA, 2006), que abordam o tema.

Para a obtenção da excitação dos plásmons de superfície são necessárias algumas condições (SILVA, 2017):

1. O feixe luminoso deve estar p -polarizado (onda transversal magnética - TM, campo magnético paralelo à face do prisma);
2. A espessura do filme metálico tem que ser ligeiramente menor que o comprimento de onda do feixe incidente;
3. Faz-se necessário um substrato óptico (um prisma óptico, um guia de onda, uma fibra óptica, uma grade de difração) para a elevação da magnitude do vetor de onda dos fótons incidente, a fim de garantir a igualdade com o vetor de onda de plásmons de superfície;
4. O feixe luminoso tem que incidir em ângulo tal que sofra a reflexão interna total.

Sob as condições supracitadas, parte da radiação do feixe de luz incidente excita os elétrons livres do filme metálico criando uma onda de plásmons de superfície que se propaga pela interface metal-dielétrico. Nesse processo a maior parte da energia da onda incidente é absorvida, dessa forma, há um decaimento na intensidade luz refletida pelo filme metálico gerando a faixa escura (decaimento da refletância citado na seção 2.2). Essa excitação de elétrons é provocada pelo campo elétrico evanescente criado pelo feixe de luz incidente. É considerado evanescente porque a amplitude dele decai exponencialmente com sua penetração na interface metal-dielétrico (SOUZA FILHO, 2017);

Um diagrama básico de um biossensor SPR é apresentado na Figura 3. A fonte luminosa pode ser monocromática ou policromática, dependendo da configuração.

O polarizador deve ser do tipo “P” ou “T” (campo magnético paralelo à superfície do substrato), ou seja, tem a função de deixar onda incidente p -polarizada.

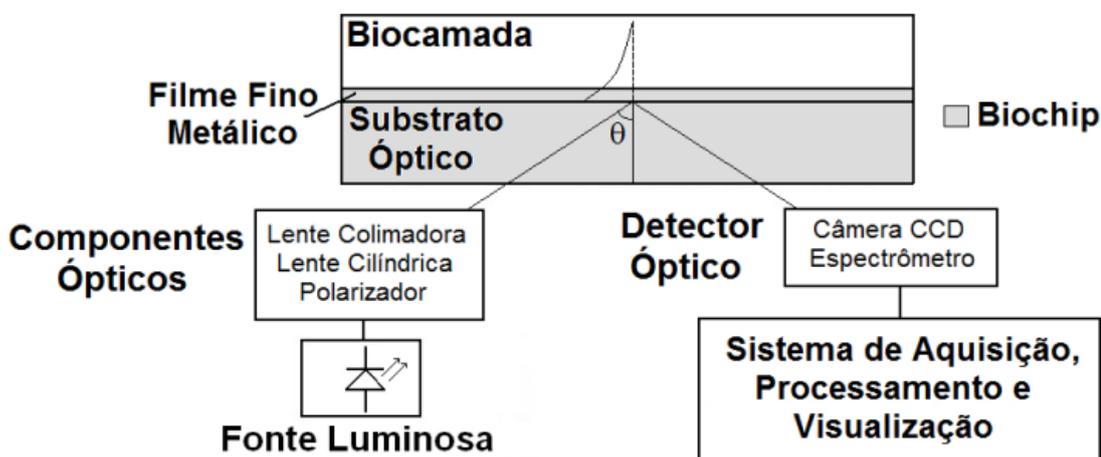
A lente colimadora funciona como um diafragma delimitando o campo de atuação do feixe de luz incidente e tornando os raios divergentes da saída do diodo laser paralelos entre si.

A lente esférica é convergente e tem o objetivo de concentrar, convergir o feixe de luz par um ponto focal.

O substrato ou prisma óptico tem a função de promover o acoplamento dos fótons do feixe luz incidente com o vetor de onda de plásmons de superfície, K_{sp} (ilustrado na Figura 5); como dito na condição 3, acima, para ocorrer a excitação dos plásmons de superfície, o vetor de onda K_x , (ilustrado na Figura 5), que é a projeção paralela ao plano de interface metal-dielétrico do vetor de onda do feixe incidente, deve ser igual a K_{sp} ; o índice de refração do substrato deve ser maior do que o do filme metálico para garantir que a partir de certo ângulo limite ocorra a reflexão interna total.

O filme fino metálico deve ter espessura inferior ao comprimento de onda da luz incidente. O metal mais utilizado é o ouro. Porém, na literatura, outros metais nobres e o grafeno são citados (MAXIMINO, 2011; MAZULQUIM, 2016).

Figura 3. Diagrama de blocos de um biossensor SPR: fonte luminosa, componentes ópticos externos, *biochip* (substrato óptico e filme fino metálico), sistema de aquisição e processamento de sinais.



Fonte: (MOREIRA et al., 2010a).

A camada sensível que se deseja identificar, constitui-se de substância geralmente líquida, mas pode ser gás ou sólido, além de confirmar a sua existência pode-se calcular a sua concentração.

Normalmente, a célula de fluxo conduz a amostra que se pretende analisar de um ambiente externo à biocamada e desta a outro ambiente externo.

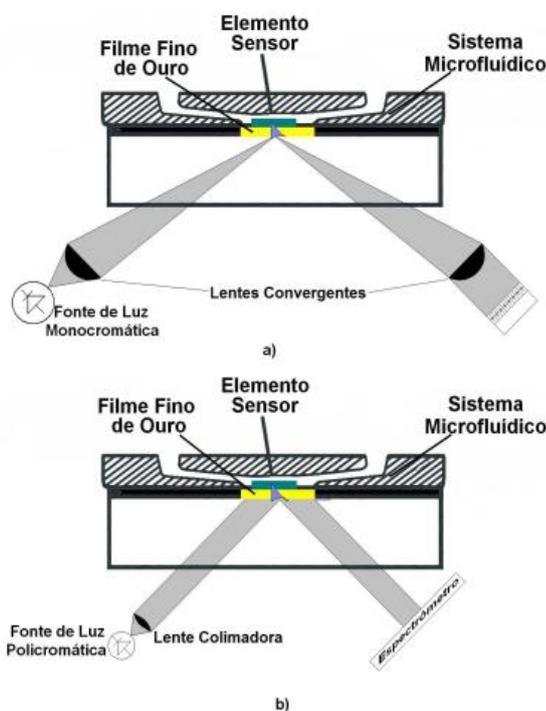
A câmera digital (CCD ou CMOS dependendo da tecnologia), ou o espectrômetro, têm a função de capturar o sinal refletido pelo *biochip* e repassar para o sistema de aquisição para o processamento e visualização. Este sistema atua filtrando, regenerando, amplificando o sinal e calcula a concentração da substância a identificar.

Há quatro modos de interrogação que podem ser utilizados para obter a ressonância: 1. Modo de interrogação angular (*Angular Interrogation Mode* - AIM); 2. Modo de interrogação espectral (*Wavelength Interrogation Mode* - WIM); 3. Modo de interrogação de fase (*Phase Interrogation Mode* - PIM) e 4. Modo de interrogação de intensidade (*Intensity Interrogation Mode* - IIM).

No AIM, o comprimento de onda do feixe de luz de entrada é mantido constante e o ângulo de incidência é variado, a fonte luminosa é monocromática (diodo laser) e o elemento fotodetector é uma câmera CCD ou CMOS. No WIM, o ângulo de incidência é mantido constante e varia-se o comprimento de onda, ou seja, a luz incidente é policromática, luz branca, uma fonte alógena, para se fazer a detecção do sinal refletido usa-se um espectrômetro (MOREIRA, 2010).

Os modos AIM e WIM são os mais utilizados e serão abordados no presente trabalho. Na Figura 4, é apresentada a estrutura de um biossensor SPR e seus elementos de geração e detecção luminosa. Atente-se, na Figura 4, com relação ao traçado ideal de feixes ópticos; na Figura 4(a), há uma fonte de luz monocromática com uma lente convergente, cilíndrica; na Figura 4(b), a fonte de luz é policromática com uma lente colimadora.

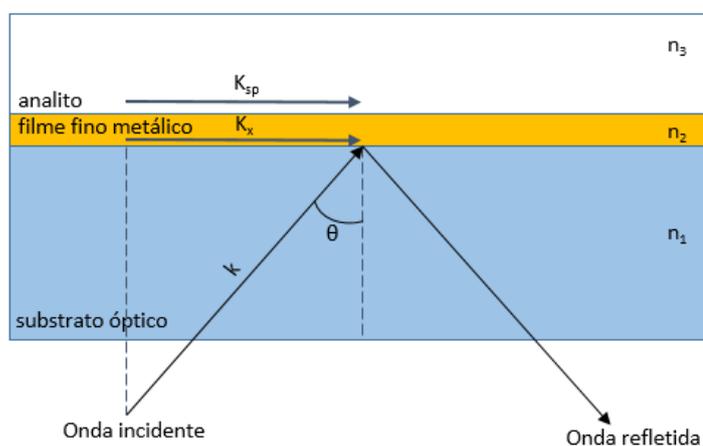
Figura 4. Estrutura de um biossensor nos modos (a) AIM e (b) WIM.



Fonte: (MOREIRA, 2010).

Na Figura 5, é ilustrado o modelo de três camadas representativo da configuração Kretschmann-Raether (RAETHER, 1988). No modo AIM, o ângulo em que ocorre a ressonância de plásmons de superfície é conhecido como ângulo de ressonância, θ_{res} , n_1 é o índice de refração da camada 1 (substrato óptico), n_2 é o índice de refração da camada 2 (filme fino metálico), n_3 é o índice de refração da camada 3 (analito); ϵ_{mr} é a parte real da função dielétrica do metal.

Figura 5. Modelo de três camadas sobrepostas, conforme configuração Kretschmann-Raether.



Fonte: adaptada de (SILVA, 2017).

Para a configuração mostrada na Figura 5, conforme a literatura científica, o índice de refração, n_3 , e o ângulo de ressonância, θ_{res} são dados por (SOUZA FILHO, 2017):

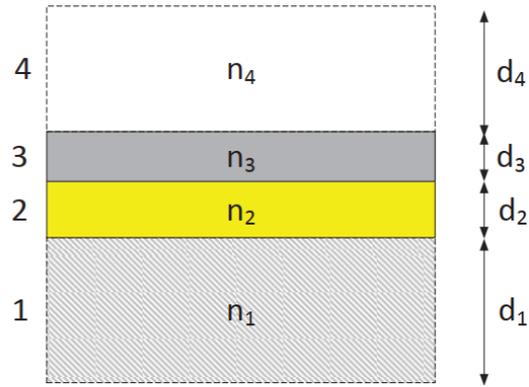
$$n_3 = \sqrt{\frac{\varepsilon_{mr}(n_1 \sin(\theta_{res}))^2}{\varepsilon_{mr} - (n_1 \sin(\theta_{res}))^2}} \quad (1)$$

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

Analisando-se as Equações (1) e (2), percebe-se que o ângulo de ressonância depende do índice de refração n_3 (analito), tendo em vista que para uma dada temperatura e um comprimento de onda constante, o índice de refração n_1 (substrato óptico) e a parte real da função dielétrica do metal, ε_{mr} , são constantes, ou seja, qualquer variação de n_3 afeta o ângulo de ressonância. Dessa forma, pode-se confirmar a presença ou não de determinada substância na camada de analito (camada sensível), bem como sua concentração, proporcionalmente ao desvio do ângulo de ressonância.

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, n_3 , o modelo deve levar em consideração pelo menos mais uma camada, n_4 , o que pode ser generalizado para uma configuração com n camadas de materiais diferentes, com índices de refração n_i e espessura d_i . A Figura 6 ilustra a disposição física de um *biochip* de quatro camadas.

Figura 6. Modelo de 4 camadas para o *biochip*.



Fonte:(SOUZA FILHO, 2017)

Para o *biochip* composto de n camadas, o coeficiente de reflexão, R , é obtido através das equações de Fresnel que estão representadas na forma matricial pelas Equações (3) a (7) (SOUZA FILHO, 2017), nas quais, β_j é a admitância, q_j o deslocamento de fase, a variável n_j refere-se aos índices de refração dos meios 1, 2 e 3, que dependem do comprimento de onda aplicado e θ_1 representa o ângulo crítico (limite), d_j é a espessura das camadas em estudo e $\lambda(nm)$ representa o comprimento de onda do feixe de luz incidente; M_j é a matriz de transferência que descreve a propagação da onda do meio j para o meio $j+1$, M_{tot} é a matriz total de transferência, que é calculada em função das matrizes individuais das interfaces do metal e do dielétrico (SILVA, 2017):

$$\beta_j = \frac{2\pi d_j \sqrt{n_j^2 - [n_1 \sin(\theta_1)]^2}}{\lambda} \quad (3)$$

$$q_j = \frac{\sqrt{n_j^2 - [n_1 \sin(\theta_1)]^2}}{n_j^2} \quad (4)$$

$$M_j = \begin{pmatrix} \cos(\beta_j) & -i \sin(\beta_j)/q_j \\ -i q_j \sin(\beta_j) & \cos(\beta_j) \end{pmatrix} \quad (5)$$

$$M_{tot} = \prod_{j=2}^{m-1} M_j = \begin{matrix} m_{11} & m_{12} \\ m_{21} & m_{22} \end{matrix} \quad (6)$$

$$R = \frac{(m_{11} + m_{12}qm)q_1 - (m_{21} + m_{22})qm}{(m_{11} + m_{12}qm)q_1 + (m_{21} + m_{22})qm} \quad (7)$$

A intensidade de luz refletida, I_r , pelo *biochip* pode ser obtida pelo produto da intensidade de luz incidente, I_{inc} pelo coeficiente de reflexão, R , através da Equação (8).

$$I_r(\theta) = I_{inc}(\theta) \cdot R \quad (8)$$

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 intensidade do sinal da luz refletida para a substância, I_{rs} , pela intensidade de luz refletida do sinal de referência, I_{rref} , obtendo-se, então, o sinal de intensidade normalizado, I_{rn} , de acordo com a Equação (9) (SOUZA FILHO, 2017).

$$I_{rn}(\theta) = \frac{I_{rs}(\theta)}{I_{rref}(\theta)} \quad (9)$$

2.4 SOLUÇÃO EMBARCADA AO BIOSSENSOR VIR

Nesta seção é apresentado o protótipo do sistema embarcado em um *smartphone*. O projeto desenvolvido e implementado como parte de tese de doutorado na Universidade Federal de Campina Grande (SOUZA FILHO, 2017) tem como objetivo de transformar o *smartphone* em um biossensor SPR. O protótipo foi construído em estrutura modular, tendo custo e tamanho reduzidos, possibilitando adaptação para vários *biochips* (por exemplo, VIR, PPBIO) e pode ser usado na

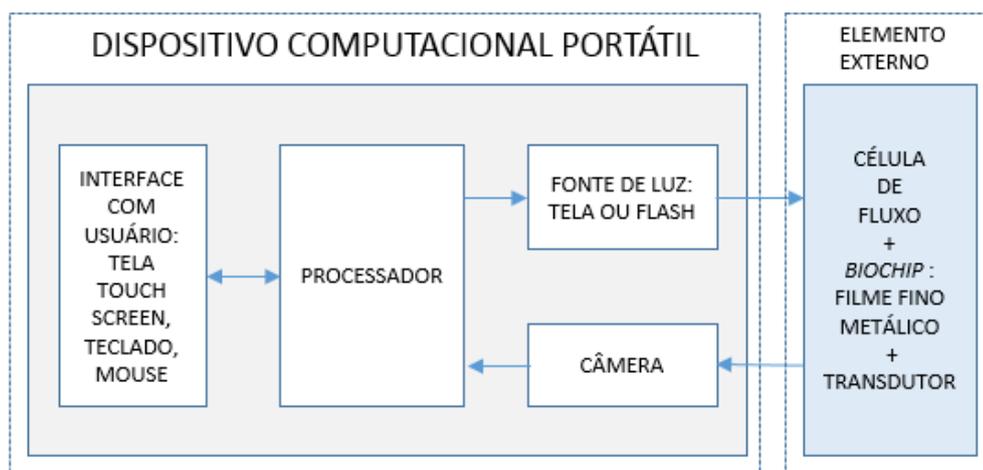
detecção de diversas substâncias, dependendo apenas da funcionalização do filme metálico. O *software* foi desenvolvido em uma plataforma aberta podendo ser facilmente adaptado a um dado dispositivo (celular, *tablet*, *notebook*).

Os testes experimentais realizados por (SOUZA FILHO, 2017) apresentaram resultados equivalentes aos registrados na literatura. Foram testadas as substâncias inorgânicas (hipoclorito de sódio e água destilada) usadas no ciclo de limpeza do filme e a proteína albumina soro bovina (*Bovin Sorum Albumin* - BSA) usada como ligante na formação da monocamada.

São utilizados para os cálculos os valores de energia bruta captada pela câmera do celular, o que simplifica o processo de tratamento do sinal; facilitando o diagnóstico final quanto à presença ou não da substância desejada, assim como sua concentração.

De modo sucinto, é apresentada a arquitetura e a estrutura para adaptação, fixação do biossensor ao celular e recursos de controle via interface. Na solução proposta, foi usado como dispositivo portátil um celular da marca Samsung, modelo Galaxy SIII. Em relação às necessidades do biossensor, tem-se como fonte de luz a tela do celular ou *flash* de sua câmera traseira, o fotodetector é a câmera frontal ou a traseira, conforme a da fonte de luz usada. Nesse aspecto, o sistema é versátil, podendo usar uma ou outra conforme o caso, porém, nunca as duas ao mesmo tempo, como mostrado adiante. A interface com o usuário e o processamento do sinal são feitos no próprio celular, havendo a possibilidade de armazenamento dos sinais (imagens) em casos de necessidade de tratamento com mais recursos computacionais. Salienta-se que na interface com o usuário estão disponíveis todos os recursos do *smartphone* podendo-se facilmente alternar o uso como biossensor SPR ou celular (SOUZA FILHO, 2017). A Figura 7 serve de ilustração.

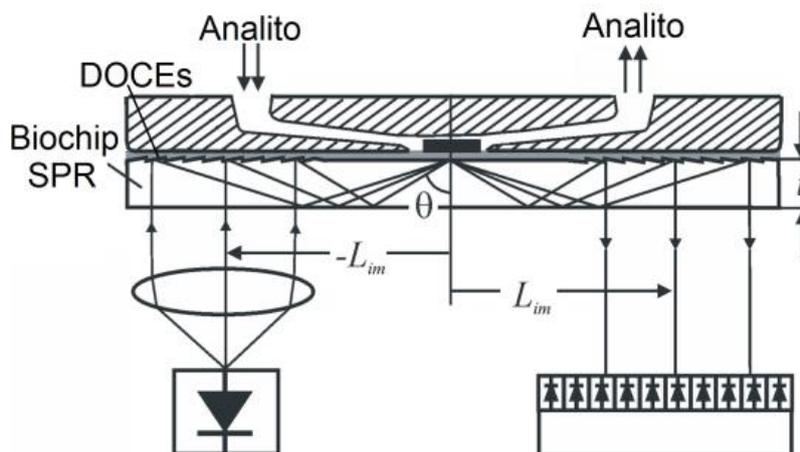
Figura 7. Arquitetura do *hardware* proposto. O dispositivo portátil pode ser um *smartphone*, *notebook*, *tablet*.



Fonte: Adaptada (SOUZA FILHO, 2017).

O sistema foi montado com o *biochip* da empresa VIR que usa acoplamento óptico para os feixes luminosos de entrada. Esses feixes atingem a superfície do *biochip* perpendicularmente, devido à presença de elementos de acoplamento ópticos difrativos ou DOCE (*Diffractive Optical Coupling Elements*), cujas dimensões são nanométricas e utilizam técnicas holográficas em sua construção sob a camada metálica (MOREIRA et al., 2010a). A Figura 8 ilustra a montagem desse *biochip*. Pode-se observar seus vários componentes: a célula de fluxo que é o canal que transporta a solução a ser analisada, a região com o filme metálico onde ficam os bioreceptores, o DOCE que tem a função de direcionar os feixes luminosos:

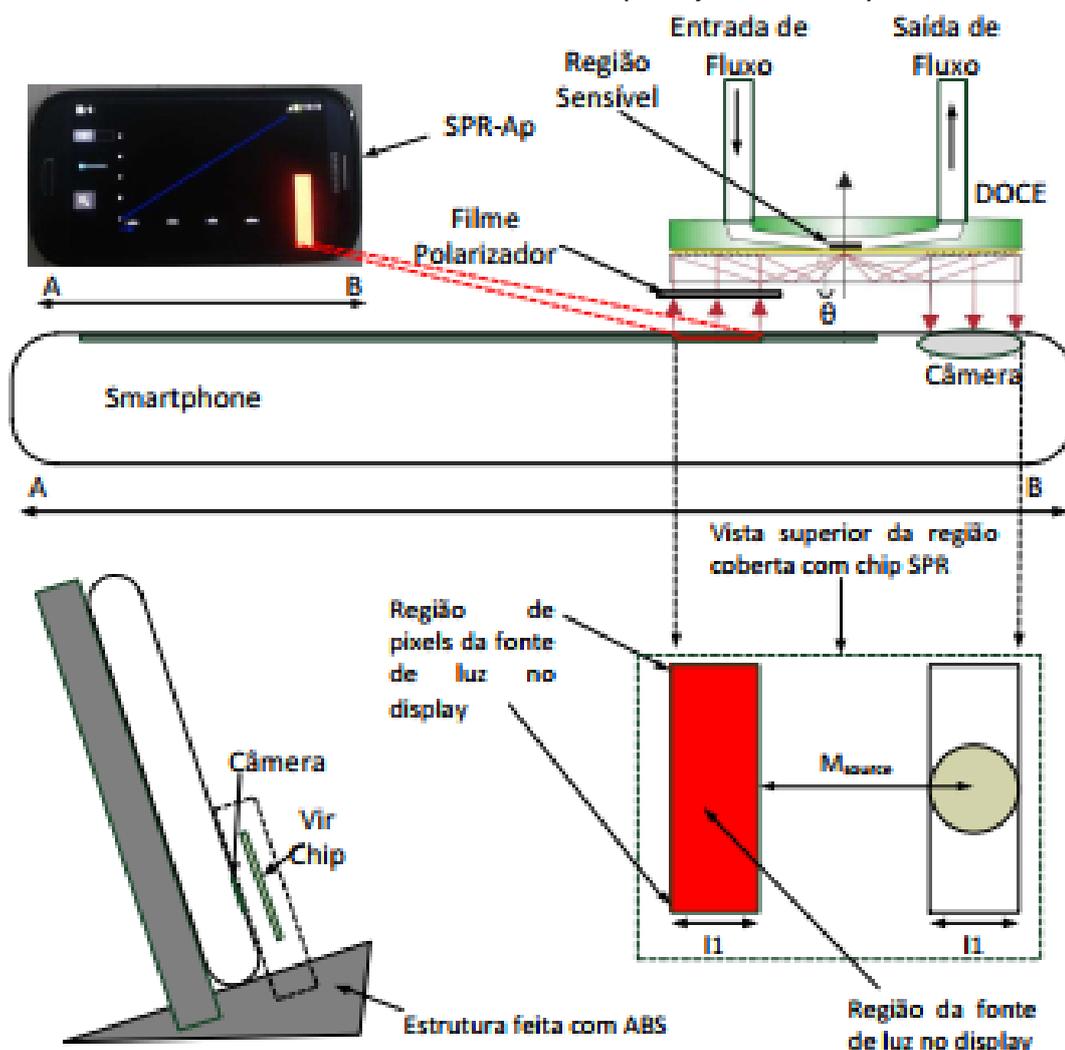
Figura 8. Estrutura do Biossensor SPR da VIR.



Fonte: (MOREIRA et al., 2010a).

Na sequência, a Figura 9 apresenta uma visão completa do sistema, com perspectiva superior e lateral: tela do *smartphone*, biossensor, região com fonte de luz e a câmera, estrutura feita em ABS (*Acrylonitrile Butadiene Styrene*) com uso de impressora 3D para dar corpo ao sistema *smartphone* e biossensor.

Figura 9. Vista superior e lateral do sistema: tela do *smartphone*, biossensor, região com fonte e câmera, estrutura feita em ABS para juntar *smartphone* e *biochip*.

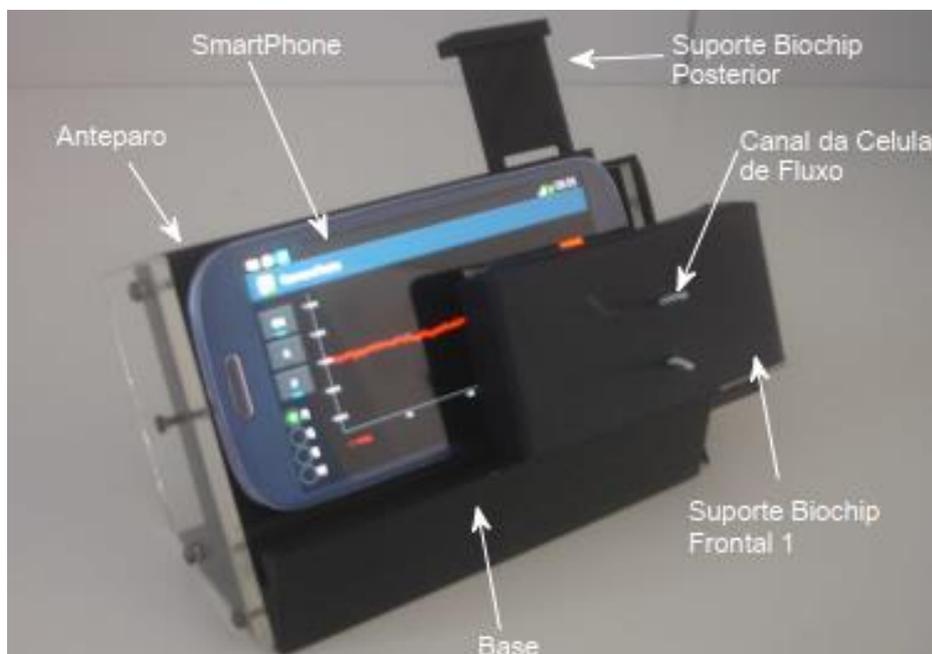


Fonte:(SOUZA FILHO, 2017).

Na fotografia do sistema embarcado da Figura 10, pode-se observar o *biochip* no suporte frontal e/ou posterior. Na tela do celular, são mostrados controles de configuração do sistema além de um espaço reservado para apresentação dos resultados (gráfico) em tempo real. Pode-se controlar: a aquisição da imagem refletida pelo transdutor, o armazenamento e processamento das informações;

quando a tela do *smartphone* é usada como fonte de luz, esta pode ser controlada dando ao usuário a oportunidade de definições de cores.

Figura 10. Visão em perspectiva do sistema embarcado.



Fonte: (SOUZA FILHO, 2017).

Apesar de estar em um suporte de mesa na presente fotografia, há também uma versão como capa para facilitar o transporte e a portabilidade.

2.5 CONHECENDO O *BIOCHIP* PPBIO

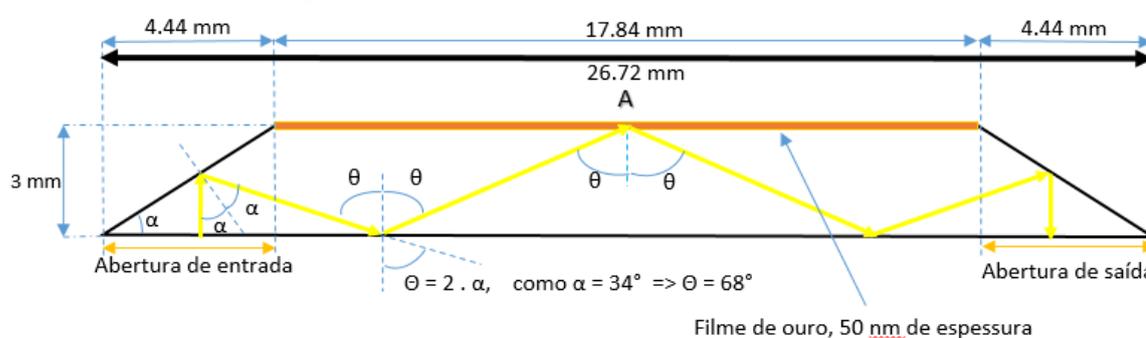
O *biochip* PPBIO (Prisma Polimérico para aplicações Biológicas) foi o primeiro *biochip* SPR de fabricação nacional utilizando prisma óptico como substrato. De formato trapezoidal, foi moldado usando técnicas de injeção com polímero, inspirado no biossensor óptico SPR patenteado por Thirstrup, Zong e Neff (THIRSTRUP, C.; ZONG, W.; NEFF, 2005). Essa patente foi publicada em 2005, cujos objetivos eram reduzir custos de projeto e fabricação além de aumentar a simplicidade em relação

ao biossensor óptico SPR da Empresa VIR proposto em 2004 (MOREIRA, 2010; MOREIRA et al., 2010a).

Enquanto o biossensor patenteado tem lentes cilíndricas integradas na entrada e na saída do prisma, a versão brasileira não as tem, dessa forma, sendo ainda mais simples o que resultou em menores custos, no entanto, o seu correto funcionamento exigiu o uso dessas lentes externamente. O fato de usar as lentes externas deu mais versatilidade, pois, a configuração do biossensor patenteado só permite o modo AIM. Com o PPBIO, pode-se alternar entre os dois modos AIM e WIM apenas usando ou não a lente cilíndrica que teve a função de variar o ângulo de incidência do raio de luz de entrada. Em resumo, no modo AIM foram utilizadas lentes de colimação e cilíndrica, sendo que seu ângulo de incidência foi variado e o comprimento de onda da luz incidente foi mantida constante (monocromática); já para o modo WIM, bastou remover a lente cilíndrica, com isso a luz incide no prisma em um mesmo ângulo, mas a luz neste caso teve seu comprimento de onda variado (policromática). Dessa forma o PPBIO, além do baixo custo, estimado em U\$ 1,00, possui essa versatilidade (MOREIRA, 2010).

A Figura 11 ilustra os detalhes do prisma óptico trapezoidal, as dimensões e o traçado ideal dos feixes de entrada e saída, para a condição de reflexão interna total. A altura de 3 mm foi para garantir que haja apenas uma reflexão dos feixes luminosos na região sensível evitando erros de captura pela câmera, isso para um comprimento de onda de ressonância escolhido de 670 nm.

Figura 11. Estrutura do prisma PPBIO SPR.



Fonte: Adaptada de (MOREIRA, 2010).

Os testes realizados por (MOREIRA, 2010) confirmaram a excitação dos plásmons de superfície para os valores de projeto, tanto no modo AIM como WIM, usando como analito a água, o cloreto de sódio e o etanol. Os resultados encontrados comprovaram que o prisma óptico de baixo custo, descartável e com fabricação nacional pode ser adequado para aplicações de diagnóstico (BARRETO NETO et al., 2009; MOREIRA et al., 2009, 2010b).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo é apresentado todo o desenvolvimento teórico necessário a execução do projeto. Como já dito na seção 2.5, o PPBIO possibilita a aplicação de duas configurações a AIM e WIM, conseqüentemente cada uma exige um correspondente arranjo de componentes externos. Nos testes laboratoriais realizados por (MOREIRA, 2010), quando da construção, foram montadas duas plataformas, uma para o modo WIM e outra para o modo AIM.

Além da implementação da estrutura modular que acondicionará o PPBIO, é preciso definir a estrutura externa que o *biochip* PPBIO exige, ou seja, os elementos ópticos de acoplamento, como as lentes externas. O prisma polimérico PPBIO possui geometria simples, não tendo elementos eletro-ópticos integrados o que leva à necessidade da utilização daqueles componentes externamente. Opostamente, na seção 2.4, a solução embarcada *smartphone* com o *biochip* VIR possui internamente nanocomponentes (grátulas de difração holográficas) que dispensam o uso de componentes externos. Dessa forma são necessárias adaptações da plataforma usando *smartphone* às necessidades do PPBIO.

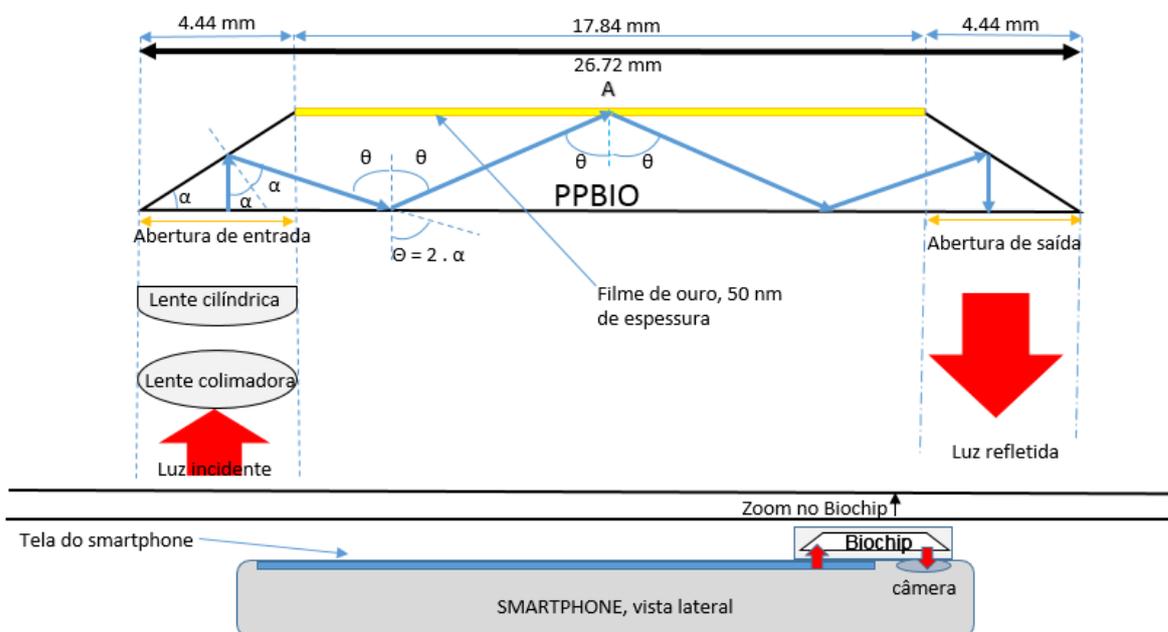
A seguir serão apresentadas essas plataformas para os modos AIM, WIM levando-se em consideração a fusão das duas tecnologias: solução *Smartphone* e o PPBIO com seus os componentes ópticos externos. Na seção seguinte apresenta-se as rotinas de procedimentos para se alcançar os resultados pretendidos.

3.1 PLATAFORMA PARA O MODO DE INTERROGAÇÃO ANGULAR

No presente trabalho apresenta-se como solução a fusão das duas tecnologias (*biochip* PPBIO com o *smartphone*) a estrutura da Figura 12, ressaltando-se que essa configuração é usada para o modo AIM. A imagem do *biochip* foi ampliada de forma a possibilitar a verificação dos detalhes: lentes externas. Vislumbra-se inicialmente não ser necessário utilizar a lente colimadora

tendo em vista que a fonte de luz é a própria tela do celular que está relativamente próxima ao *Biochip*.

Figura 12 Estrutura com as respectivas adaptações entre o *smartphone* e o PPBIO no modo AIM.

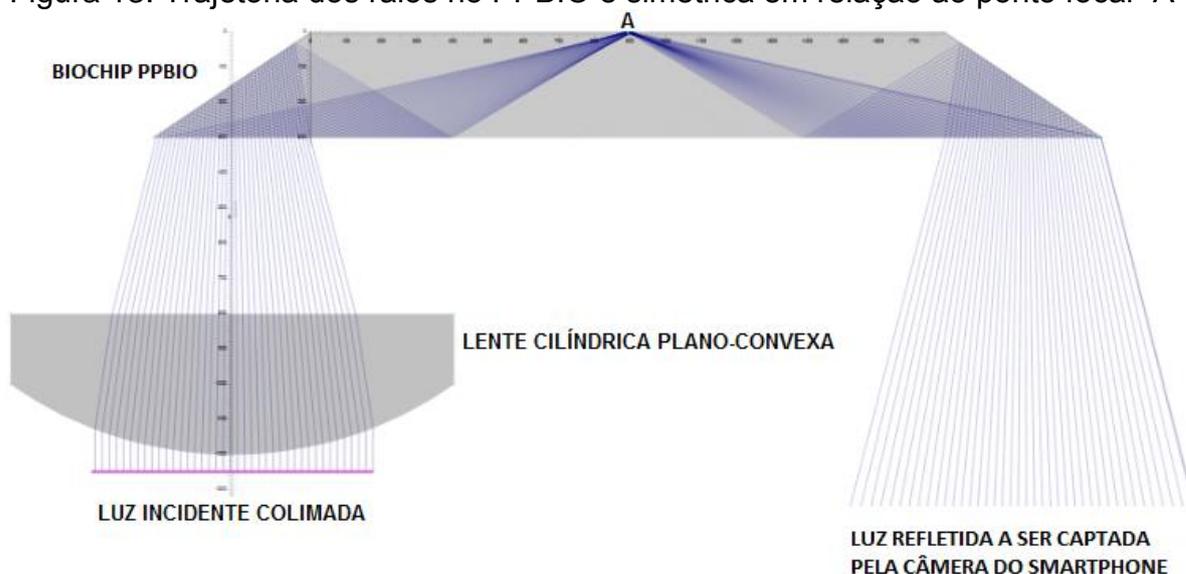


Fonte: Adaptada de (MOREIRA, 2010; SOUZA FILHO, 2017).

Com a ajuda de um simulador (“Ray Optics Simulation”, 2018) apresenta-se na Figura 13 a trajetória ideal dos raios no PPBIO. Os raios incidentes paralelos saídos do colimador entram na lente cilíndrica, desta saem em trajetória convergente, entram no prisma e são refletidos na superfície inclinada, estes refletem mais uma vez até o ponto “A” onde ocorre a excitação dos plásmons de superfície. Simetricamente esse feixe de luz sai pela extremidade oposta do PPBIO com a mesma angulação de entrada onde será captado pela câmera do *smartphone*.

Na seção 4.2 é apresentada como resultado uma série de simulações usando a teoria de óptica geométrica apontando a importância de se definir a posição otimizada da lente cilíndrica em relação ao *Biochip*.

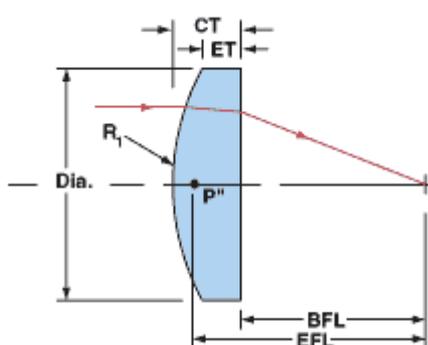
Figura 13. Trajetória dos raios no PPBIO é simétrica em relação ao ponto focal "A".



Fonte: Adaptada de ("Ray Optics Simulation", 2018).

A lente cilíndrica plano-convexa modelo LJ1638L1 (THORLABS.COM, 2015) utilizada tem uma distância focal posterior (*Back Focal Length* - BFL) de 19,70 mm, estando, ilustrada na Figura 14.

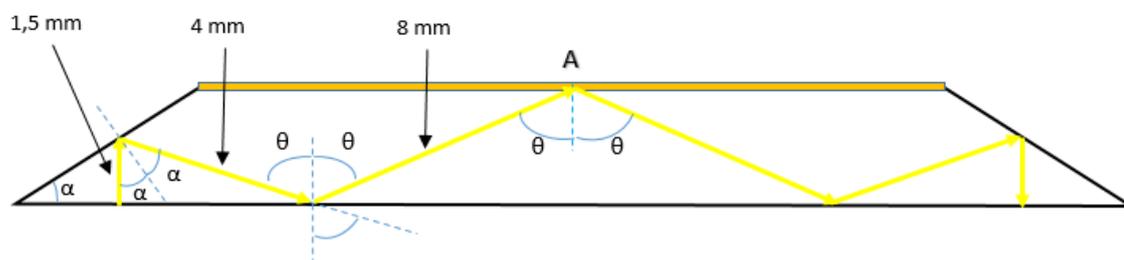
Figura 14. Ilustração do ponto focal posterior (BFL) e ponto focal efetivo (Effective Focal Length - EFL) da lente cilíndrica (plano-convexa).



Fonte: ("EO Edmund Optics Worldwide", 2019).

A distância interna percorrida pelo raio central (dentro do *biochip*, em amarelo) é obtida pela soma dos seguimentos, conforme Figura 15, ou seja, $1,5 + 4 + 8 = 13,5$ mm.

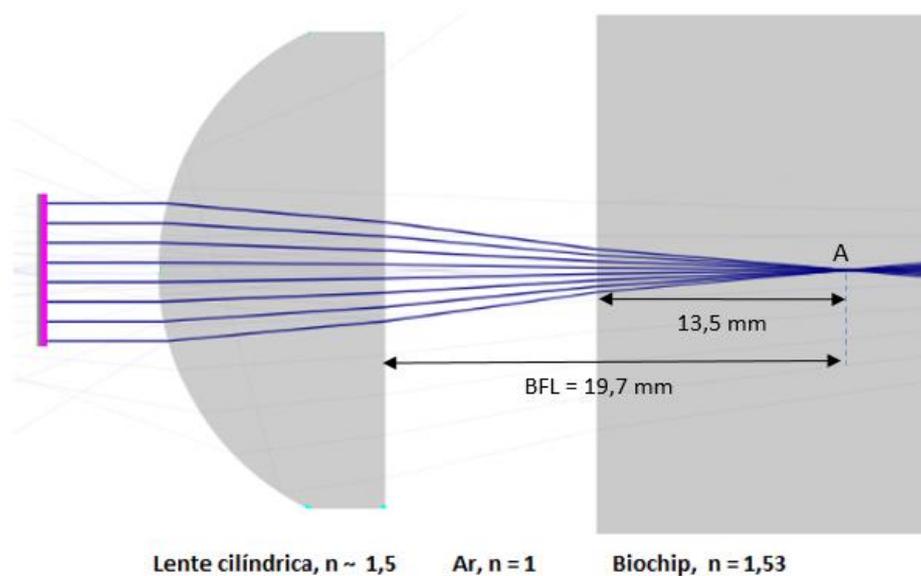
Figura 15. Prisma PPBIO, cálculo da distância percorrida pelo raio central até o ponto "A".



Fonte: própria.

Na Figura 16 observa-se as trajetórias dos raios colimados que atravessam a lente cilíndrica, a camada de ar (distância entre lente e *biochip*) e penetram no *biochip*. Para facilitar a visualização a estrutura do *biochip* é apresentada como uma simples camada com o seu respectivo índice de refração, $n = 1,53$. Dessa forma verifica-se que a distância entre a lente cilíndrica e o *biochip* PPBIO é 6,2 mm. Ela é obtida pela diferença entre a distância focal posterior-BFL, informada pelo fabricante (THORLABS.COM, 2015), 19,7 mm e a distância percorrida internamente pelo raio central, 13,5 mm (Figura 15).

Figura 16. Simulação da trajetória dos raios.



Fonte: própria.

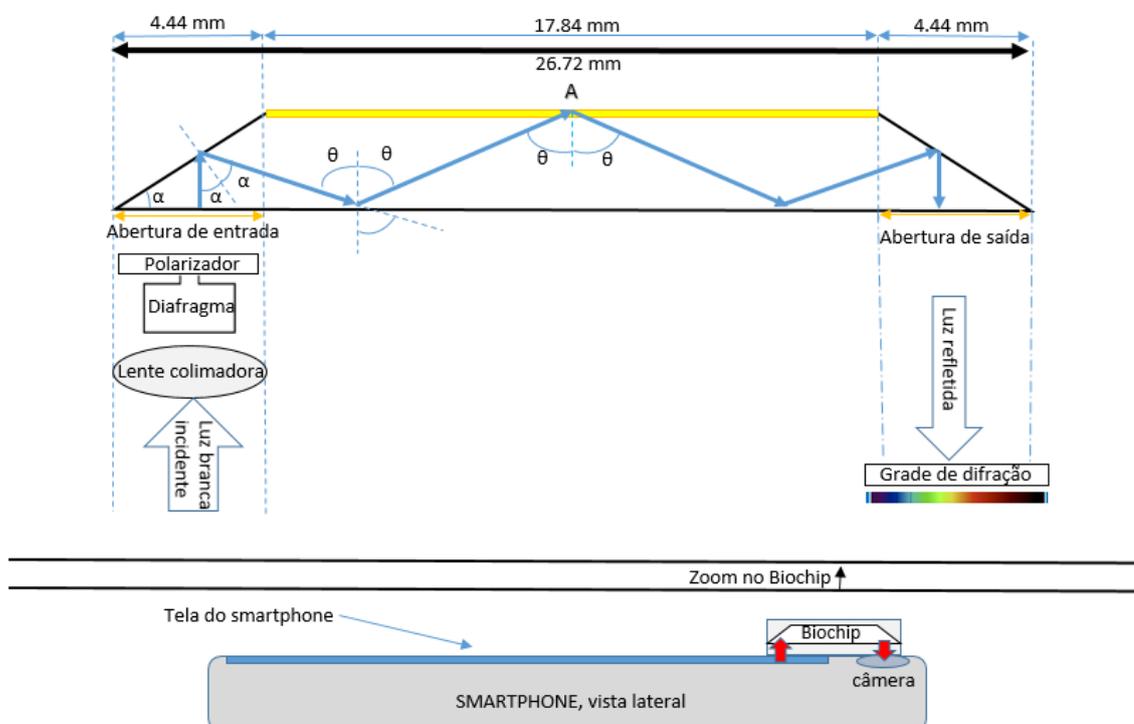
A distância da lente cilíndrica ao prisma é muito importante para o cálculo do caminho óptico e, conseqüentemente, à focalização dos feixes luminosos incidentes. A lente que será utilizada é a mesma quando do desenvolvimento do PPBIO, em suas simulações, Moreira, obteve a distância de 5 mm, já quando da realização dos testes experimentais, otimizou-se em aproximadamente 4 mm (MOREIRA, 2010).

Diante das imprecisões 6,2 mm, 4 mm, 5 mm, como essa distância que é essencial para o correto resultado do experimento não está completamente definida, o valor terá que ser obtido experimentalmente por meio de tentativas.

3.2 PLATAFORMA PARA O MODO DE INTERROGAÇÃO ESPECTRAL

Na Figura 17, apresenta-se a arquitetura do PPBIO no modo WIM. Saliente-se que, no presente trabalho, a fonte de luz branca é a própria tela do *smartphone*.

Figura 17. Diagrama com as respectivas adaptações entre o *smartphone* e o PPBIO no modo WIM.

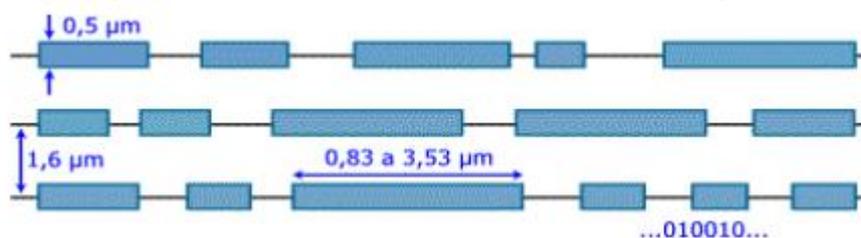


Fonte: Adaptada de (MOREIRA, 2010; SOUZA FILHO, 2017).

Nessa configuração, o sinal de saída pode ser captado através de um espectrômetro ou espectrofotômetro. Registre-se que normalmente para se decompor a luz em suas frequências constituintes se utiliza de redes de difração ou prismas. No presente trabalho pretende-se obter o efeito equivalente ao espectrômetro com o uso de uma grade ou rede de difração, a câmera frontal do *smartphone* captará o sinal espectral. Será usado como rede de difração uma seção de um Compact Disk-CD, sem a sua película reflexiva sendo, dessa forma, relativamente transparente, correspondendo a uma solução econômica.

A Figura 18 ilustra de forma ampliada a estrutura de um CD. Um CD contém 625 ranhuras ou trilhas por milímetro, ou seja, cada trilha tem cerca de 1600 nanômetros e destes, 500 nanômetros são utilizados para armazenar informação. Um CD virgem tem todas as suas trilhas transparentes enquanto que um usado (gravado) pode ou não os ter conforme a informação. Essas trilhas e fendas são da mesma ordem de grandeza do comprimento de luz visível (de 400 a 700 nm), condição necessária para se observar visualmente o espalhamento espectral (dispersão ou decomposição da luz).

Figura 18. Ilustração da distância entre duas trilhas e da largura de cada fenda.

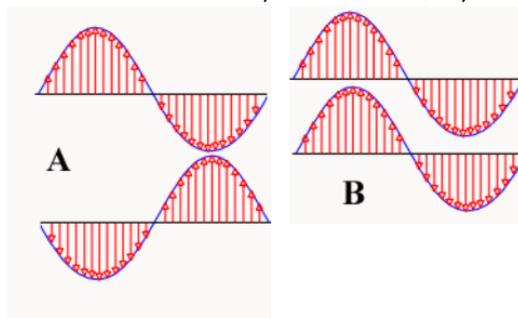


Fonte: (GOVÊA, 2004).

Pretende-se apresentar um breve resumo do modelamento teórico envolvido na difração por dupla fenda que é aplicado ao caso em estudo.

Inicialmente é apresentado na Figura 19, o que é uma interferência construtiva e destrutiva, ou seja, quando duas ondas estão casadas (mesma frequência, amplitude, em fase) elas se somam (maior luminosidade, Figura 19 B), mas quando estão em fases opostas elas se anulam (Figura 19 A).

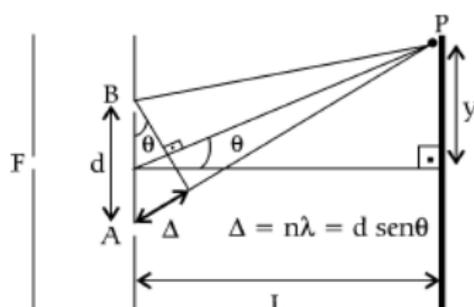
Figura 19 Interferência: A) destrutiva, B) construtiva.



Fonte: (GOVÊA, 2004).

Na Figura 20, observa-se uma fonte “F” de luz (por exemplo vermelha), uma rede de difração com duas fendas “A” e “B” separadas por uma distância “d” e um anteparo a distância “L” da rede de difração. A luz por espalhamento atinge um ponto “P” sobre o anteparo através de dois caminhos, um passando pela fenda “A” outro passando pela fenda “B”. O caminho percorrido pela luz que passa pela fenda “A” é mais longo; seja essa diferença representada por “ Δ ”; para haver uma interferência construtiva no ponto “P” e ser conseqüentemente visível, criando uma franja de luz vermelha, “ Δ ” deve ser múltiplo inteira de λ (comprimento de onda da luz), isto é, $\Delta = n\lambda$, onde $n = 0,1,2,3\dots$

Figura 20. Difração por dupla fenda.



Fonte: (GOVÊA, 2004).

Quando $n = 0$, a franja de luz criada é máxima e está exatamente no eixo de incidência da luz, na direção do ponto médio entre as duas fendas, nesse caso, as duas ondas luminosas caminham a mesma distância. Chama-se essa franja de máximo central.

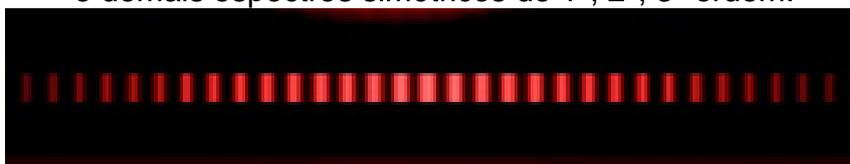
Sendo o ângulo θ correspondente ao ângulo do triângulo retângulo formado pelos catetos “L”, “y” e a hipotenusa formada pelo ponto médio entre as duas fendas ao ponto “P”, considerando ainda que é semelhante ao triângulo retângulo menor

formado por “d” e “Δ”, percebe-se que a distância “y” varia com o comprimento de onda, λ, pois,

$$\sin(\theta) = n \cdot \lambda / d = y / (L^2 + y^2)^{1/2} \quad (10)$$

Na Figura 21 é mostrada a sequência de franjas, interferência construtiva, criada pela luz vermelha ao passar pela rede de Difração (CD). A partir da franja central, para cada valor de n, ter-se-á franjas de interferência construtiva em pontos opostos no anteparo (simétricos), pois para cada valor de n, existe um ângulo θ de desvio em relação ao máximo. O “n” é a ordem do espectro, ou seja, é chamado de espectro de 1ª ordem, 2ª ordem, etc.

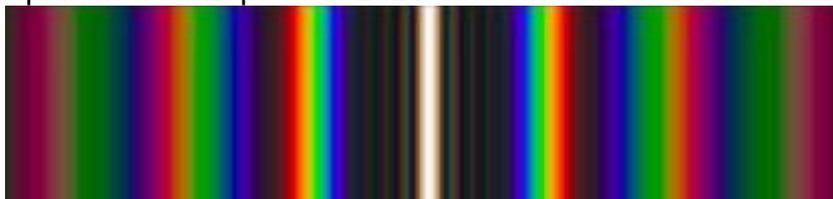
Figura 21. Máximos de interferência construtiva para a luz vermelha: máximo central e demais espectros simétricos de 1ª, 2ª, 3ª ordem.



Fonte: (“E-DISCIPLINAS” DA USP, 2019).

Por analogia, como cada cor tem um comprimento de onda, se a luz for policromática, para cada comprimento de onda ter-se-á a correspondente distância “y” formando o espectro de cores como mostrado na Figura 22. Nota-se que nesse caso a franja central tem a cor branca que é a soma de todas as cores.

Figura 22. Espalhamento Espectral: Luz branca incidindo sobre a rede de difração.



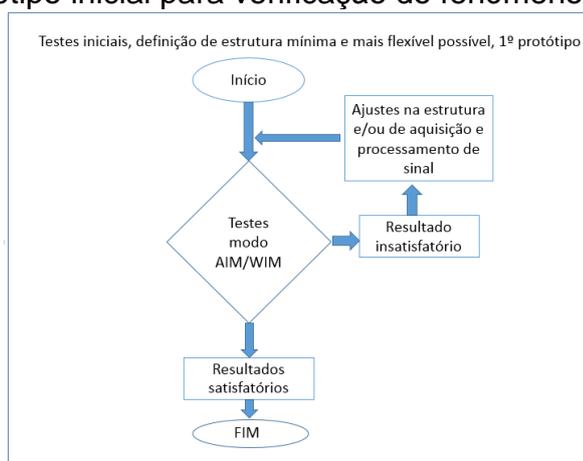
Fonte: (ROCHA; SANTOS, 2013).

3.3 METODOLOGIA DO TRABALHO

Uma vez apresentadas as duas configurações AIM e WIM que usam componentes externos diferentes, deve-se atentar para a necessidade de implementação de uma estrutura mais flexível possível porque se pretende utilizar as duas configurações.

A estrutura deve ser o mais simples possível de modo a facilitar o uso dos dois modos WIM e AIM, são necessários testes prévios com objetivo de se obter resultados sem preocupação com precisão, buscando-se apenas a confirmação da ocorrência do fenômeno SPR. Essa estrutura deve possibilitar a adição ou subtração dos componentes externos além de seu deslocamento. Em ambos os modos se prevê o uso de lente colimadora, mas acreditasse que ela pode ser suprimida, pois o feixe de luz produzido pela tela do smartphone é relativamente colimado. O modo WIM não usa a lente cilíndrica, mas exige um polarizador e um diafragma que reduz a luminosidade de entrada no *biochip*. O polarizador é um filme de consistência plástica sendo facilmente colado a estrutura e o diafragma acredita-se seja desnecessário nessa primeira fase que busca resultados que apenas confirmem o fenômeno SPR.

Figura 23. Fluxograma com a descrição dos testes prévios para obtenção do protótipo inicial para verificação do fenômeno SPR.

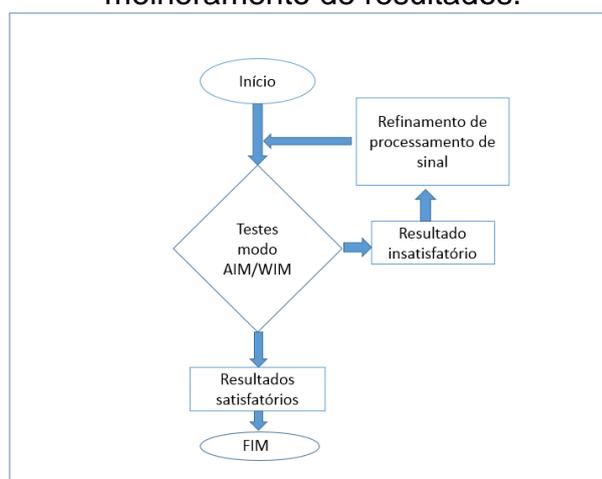


Fonte: Própria.

Uma vez definida a estrutura mínima parte-se para a confecção de um segundo protótipo com estrutura completamente definida. Nessa fase pretende-se

repetir os experimentos realizados no desenvolvimento do *biochip* PPBIO (MOREIRA, 2010) e com a solução embarcada utilizando *smartphone* desenvolvida (SOUZA FILHO, 2017) com a intenção de se ter um primeiro resultado comparativo, Figura 24. Nessa fase acredita-se que serão necessários apenas ajustes de *software* no processamento do sinal para fins de melhorar a repetitividade e exatidão de resultados.

Figura 24. Conforme fluxograma, com estrutura definida, o 2º protótipo visa o melhoramento de resultados.



Fonte: Própria.

Quando dos testes de desenvolvimento do PPBIO por Moreira, utilizou-se a água destilada, etanol a 10% e hidróxido de sódio (NaOH) a 0,2 Molar.

De forma similar a solução com *smartphone* de Souza Filho, obteve resultados satisfatórios para as soluções com água destilada, hipoclorito de sódio (NaClO a 10%) e a proteína BSA. Na verdade, essas substâncias são utilizadas em dois processos, o primeiro consiste em um ciclo de limpeza com a solução de hipoclorito de sódio; o segundo processo de testes a ser realizado é conhecido como ciclo de adsorção da proteína BSA, que pode ser utilizada na formação da monocamada, considerada um dos possíveis ligantes do filme metálico ao anticorpo que fixará o antígeno (SOUZA FILHO, 2017; SOUZA FILHO; LIMA; NEFF, 2014).

De forma complementar pretende-se construir a célula de fluxo para permitir que fluidos (água) levem o analito até o elemento sensor. Essa célula de fluxo poderá estar acoplada ou não, a um sistema de micro bombeamento.

4. RESULTADOS

Este capítulo é dividido em cinco partes, inicialmente são apresentadas simulações descrevendo as curvas SPR suas variações com o índice de refração e a espessura da camada de analito (n_3). Na segunda parte apresenta-se simulações que descrevem a trajetória dos raios sobre o sistema biossensor sob o enfoque da óptica geométrica. Na terceira seção apresenta-se os protótipos desenvolvidos com o *software* Inventor. Na quarta parte são apresentados os testes na configuração AIM e na seguinte os testes com a configuração WIM.

4.1 SIMULAÇÕES DAS CURVAS SPR

Normalmente, as simulações usam recursos computacionais que visam o modelamento de um sistema, em que são identificadas as variáveis de entrada e como elas influenciam um determinado resultado, ou seja, são gerados cenários diferentes conforme se modifica parâmetros de entrada. No capítulo 2, referente a fundamentação teórica, foi abordado o biossensor baseado em ressonância de plásmons de superfície onde percebeu-se que envolve conhecimento e técnicas de várias áreas do conhecimento, isso traz relativa dificuldade de entendimento de sua essência. A presente seção dedica-se a simulações não apenas com o objetivo de se prever resultados, mas como uma ferramenta didática, de treinamento, onde pretende-se esclarecer e consolidar o entendimento de como funciona o fenômeno SPR e como será utilizado para detectar substâncias.

A seguir, são apresentadas simulações usando o MATLAB para confirmação do modelamento matemático da curva de ressonância de plásmons de superfície. Adotou-se um sistema com quatro camadas, Figura 6 (p. 19): a camada 1 é o prisma ou substrato com a substância N-BK7 (com índice de refração n_1 e espessura d_1); a camada 2 é o filme metálico de ouro de 50 nm de espessura (d_2) e índice de refração (n_2); a camada 3 é a camada sensível que se quer identificar (com índice de refração n_3 e espessura d_3) e a quarta camada é o solvente (com espessura d_4 e índice de refração n_4), adotou-se a água.

Usou-se o modo AIM, com comprimento de onda fixo em 670 nm e, inicialmente, a espessura da camada sensível fixada em 8 nm. Os valores das demais camadas são tabelados e foram extraídos de (REFRACTIVE INDEX DATABASE, [s.d.]), e estão mencionados em cada gráfico.

Na Figura 25 observa-se que com valores do índice de refração muito baixo ($n_3 = 0,29$, curva azul clara) e muito alto ($n_3 = 3,77$, curva dourada e $n_3 = 4,06$, curva preta), praticamente não se visualiza a ressonância, isso para uma camada sensível de espessura d_3 de 8 nm. O ponto marcado $x = 60,89^\circ$ corresponde ao ângulo limite onde ocorre a reflexão total. Com objetivo ilustrativo estão também assinalados alguns dos pontos correspondente ao ângulo de ressonância, $x = 63,31^\circ$, $82,1^\circ$, $86,35^\circ$ que é o ângulo onde ocorre o fenômeno SPR, acompanhando-se a legenda identifica-se esses ângulos com as curvas SPR com índice de refração $n_3 = 0,87$, $3,19$ e $3,48$ respectivamente.

Figura 25. Curva SPR simulada no MATLAB, usando a solução matricial de Fresnel com 4 camadas, modo AIM, com espessura fixa d_3 em 8 nm.

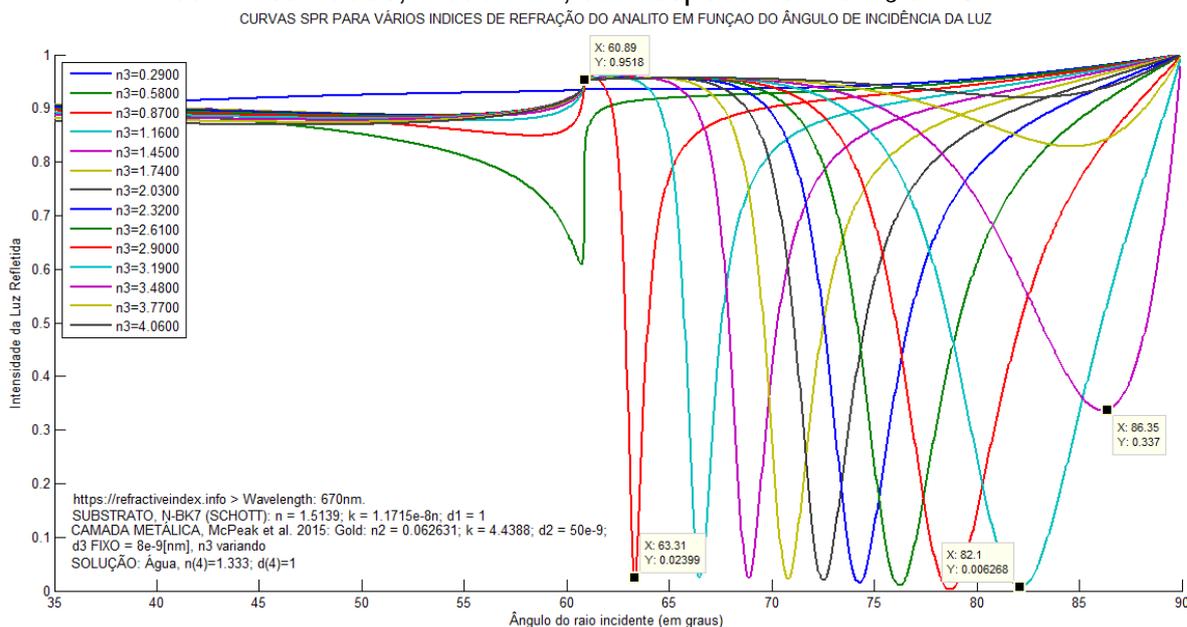
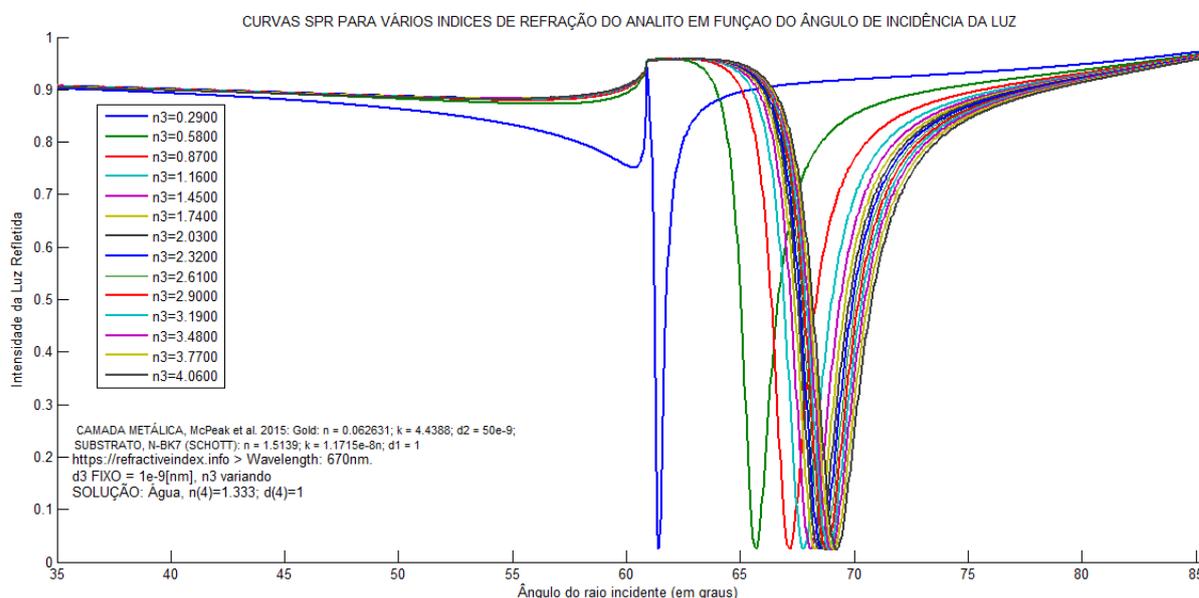


Figura 26. Curva SPR simulada no MATLAB, usando a solução matricial de Fresnel com 4 camadas, modo AIM, com espessura, d_3 , fixa em 1 nm.



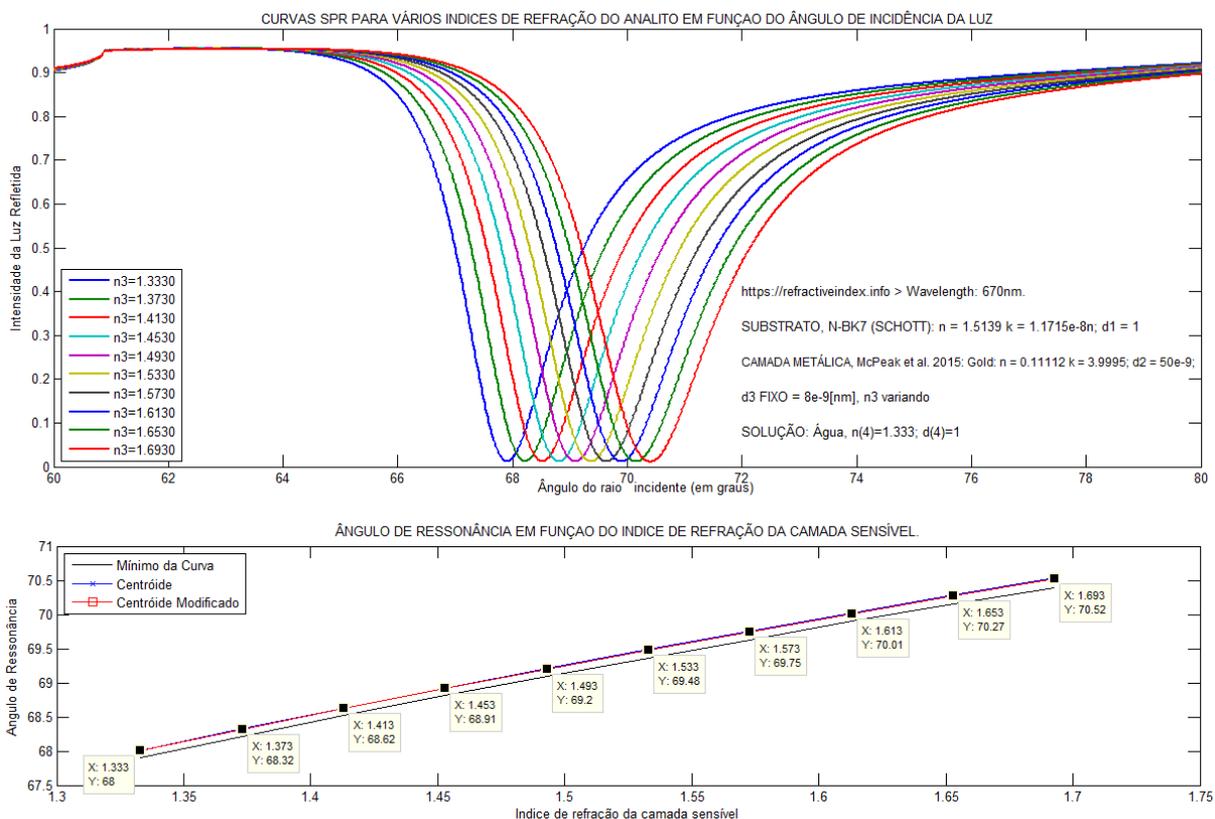
Na Figura 26, observa-se que mesmo com valores muito baixos ($n_3 = 0,29$, curva azul) e muito altos ($n_3 = 3,77$, curva dourada e $n_3 = 4,06$, curva preta) da camada sensível ocorre a ressonância, isso para uma camada sensível de espessura d_3 de 1 nm; isso não ocorreu com o gráfico da Figura 25, em que a espessura é $d_3 = 8$ nm. No entanto, os valores do ângulo de ressonância ficam muito mais próximos, exigindo-se, em casos práticos, equipamentos muito mais precisos.

Na Figura 27 são observados dois gráficos: o primeiro apresenta várias curvas SPR em função de um índice de refração específico, n_3 , (conforme a legenda varia de 1,333 a 1,693), a espessura, d_3 , é mantida fixa em 8 nm, percebe-se nitidamente que para cada curva há o correspondente ângulo de ressonância.

O segundo gráfico trabalha com esses mesmos valores, mas tem um enfoque diferente, é apresentado com precisão o ângulo de ressonância em função do índice de refração, n_3 . Constata-se a linearidade do gráfico, como desejado, com o ângulo variando de 68° a $70,52^\circ$, são apresentadas três retas: a reta em preto é extraída diretamente da simulação, as outras duas são obtidas por algoritmos de aproximação usadas para minimizar o efeito de ruídos que ocorrem em casos

práticos; no caso foi utilizado o método do centroide e do centroide modificado, (HU; ZHAO, 2009).

Figura 27. Várias curvas SPR simuladas no MATLAB, usando a solução matricial de Fresnel com 4 camadas, modo AIM, com espessura, d_3 , fixa em 8 nm. O segundo gráfico demonstra respectivo ângulo de ressonância destas curvas.

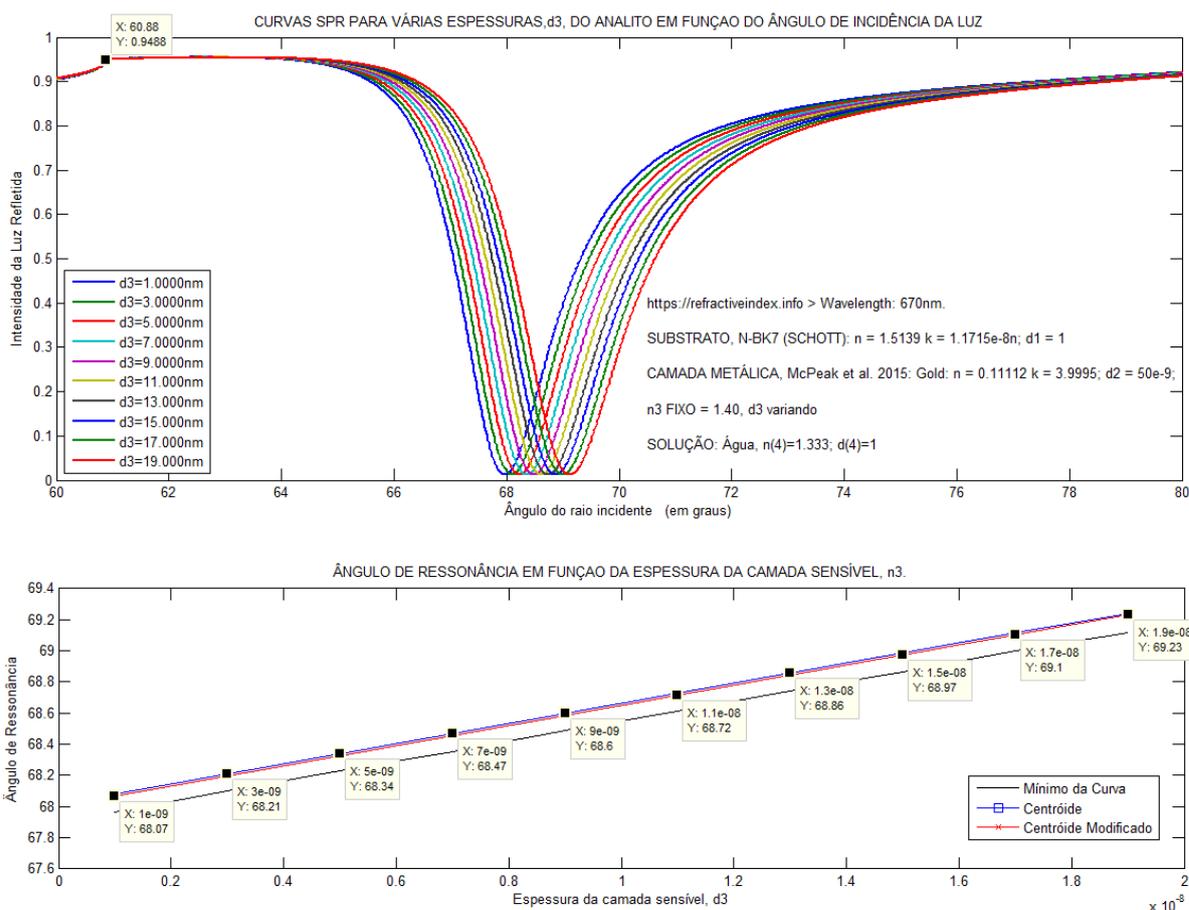


Na Figura 28 são observados dois gráficos: o primeiro apresenta várias curvas SPR, cada uma associada a uma espessura específica (conforme a legenda varia de 1 nm a 19 nm), o índice de refração, n_3 , está fixo em 1,40, percebe-se nitidamente que para cada curva há o correspondente ângulo de ressonância.

O segundo gráfico é uma outra forma de apresentação em relação ao primeiro, enquanto este apresenta a evolução dos valores aproximados do ângulo de ressonância em função da espessura da camada sensível (analito) através da curva de SPR, o segundo gráfico apresenta os valores de cada ângulo de ressonância em função da respectiva espessura, d_3 . Assim como na Figura 27 também se verifica a linearidade do gráfico, são apresentadas três retas em que o ângulo de ressonância varia de $68,07^\circ$ a $69,23^\circ$: a reta em preto é extraída

diretamente da simulação, as outras duas são obtidas por algoritmos de aproximação usadas para minimizar o efeito de ruídos que ocorrem em casos práticos, no caso foi utilizado o método do centroide e do centroide modificado (HU; ZHAO, 2009).

Figura 28. Várias curvas SPR simuladas no MATLAB, usando a solução matricial de Fresnel com 4 camadas, modo AIM, com índice refração fixo, $n_3 = 1,40$. O segundo gráfico corresponde ao ângulo de ressonância para cada uma destas curvas.



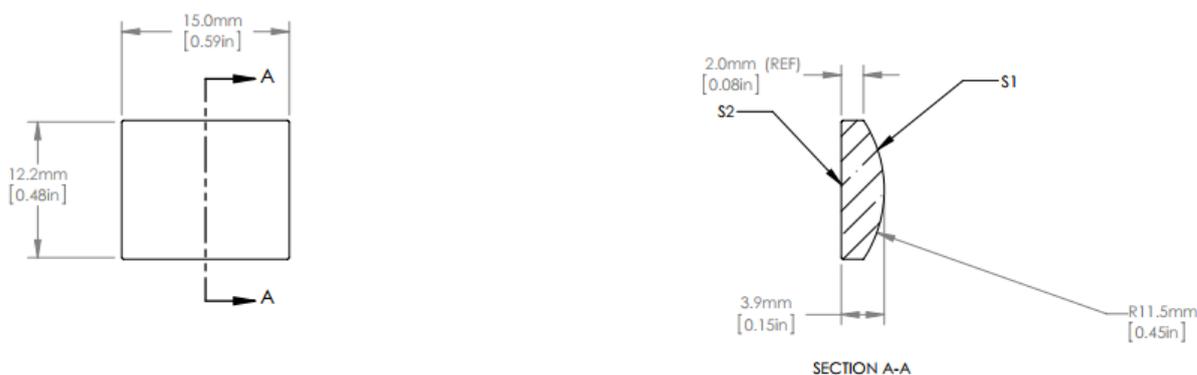
Em resumo, realizadas simulações com variação da camada sensível (camada 3 da Figura 6) percebe-se a adequação do modelamento matemático com a teoria, verificando-se que o ângulo de ressonância é dependente de duas variáveis: índice de refração, n_3 , e da espessura da camada sensível, d_3 , lembrando que esta corresponde a substância que se pretende identificar, também chamada de analito. Observou-se ainda que para índices de refração mais elevados, Figura 25, o efeito SPR é minimizado; já para espessuras muito finas, Figura 26, a precisão dos equipamentos deve ser muito maior.

4.2 SIMULAÇÕES PARA OBTENÇÃO DA DISTÂNCIA DA LENTE CILÍNDRICA PARA O MODO AIM

As simulações apresentadas nesta seção foram feitas no *site* (“Ray Optics Simulation”, 2018) que é um aplicativo da *web* de código aberto para simular a reflexão e a refração da luz, escrito em HTML, CSS e Java Script.

Inicialmente, fez-se a simulação dos raios colimados que atravessam uma lente plano-convexa (cilíndrica) com as dimensões do modelo LJ1638L1 utilizado experimentalmente. Na Figura 29, são apresentadas as dimensões da lente.

Figura 29. Especificação da lente plano-convexa fabricada pelo laboratório Thorlabs.

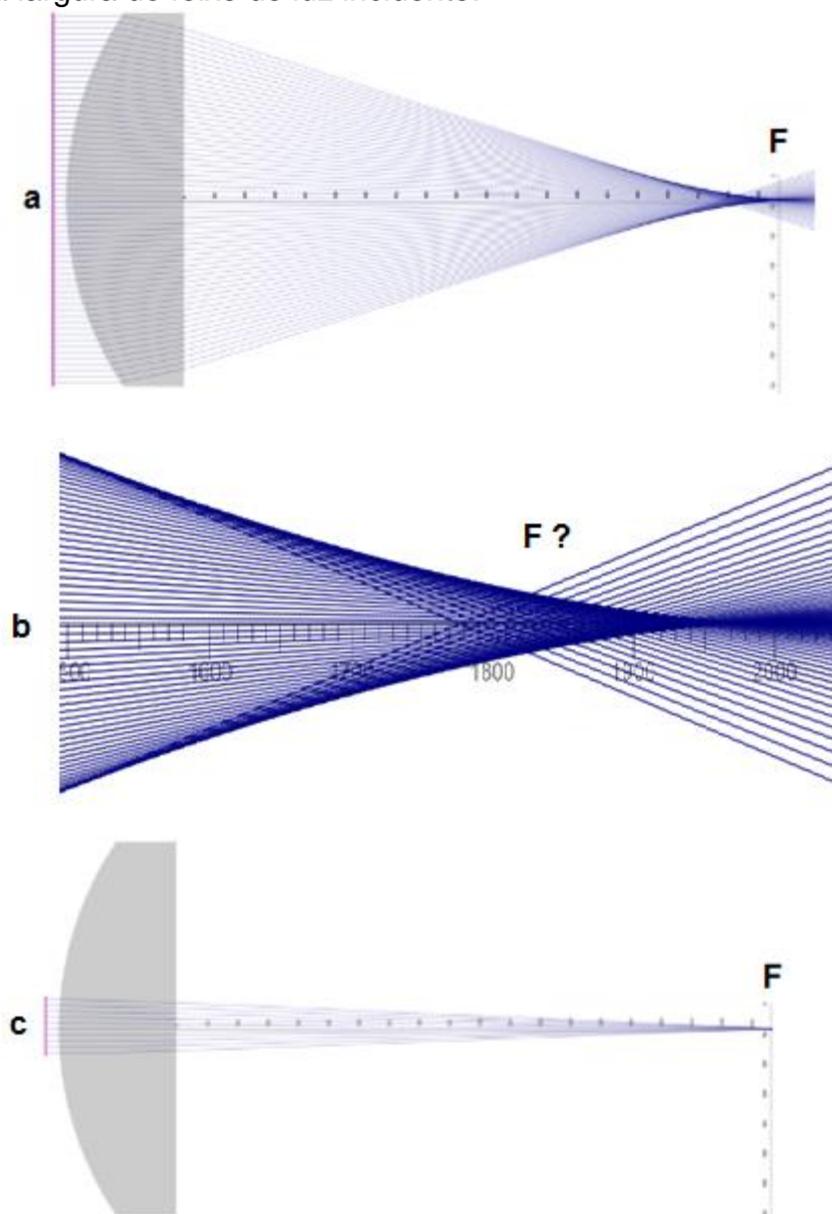


Fonte: (THORLABS.COM, 2015).

Na simulação da lente plano-convexa que direciona os raios colimados para um ponto focal “F”, apresentado na Figura 30, como o fabricante informa que a lente é feita de material N-BK7, adotou-se como índice de refração de 1,50, conforme (REFRACTIVE INDEX DATABASE, [s.d.]). Na Figura 30a) observa-se o fenômeno da ótica geométrica conhecido como aberração esférica em que os raios incidentes próximos à borda da lente são muito mais refratados do que os raios que incidem próximos ao eixo principal. Como consequência, os raios mais distantes do eixo principal formam foco em locais diferentes em relação aos raios mais próximos ao eixo principal. Na Figura 30b) a imagem é ampliada na região próxima ao ponto focal “F” (zoom sobre a região focal), percebe-se que esse ponto focal não está bem determinado conforme dito. Na Figura 30c) observa-se o efeito da aberração minimizado reduzindo-se a largura do feixe incidente. Dessa forma, é possível

constatar que a distância focal posterior da lente simulada é equivalente ao da especificada pelo fabricante, 19,7 mm. Nesse sentido constata-se a adequação das simulações, dessa forma, podendo ser utilizada como parâmetro (referência) para a simulação da trajetória dos raios.

Figura 30. Simulação da lente cilíndrica (plano-convexa) conforme especificações do fabricante. a) efeito da aberração esférica; b) imagem “a” com zoom que demonstra a imprecisão do ponto focal “F”; c) redução dos efeitos da aberração esférica estreitando a largura do feixe de luz incidente.

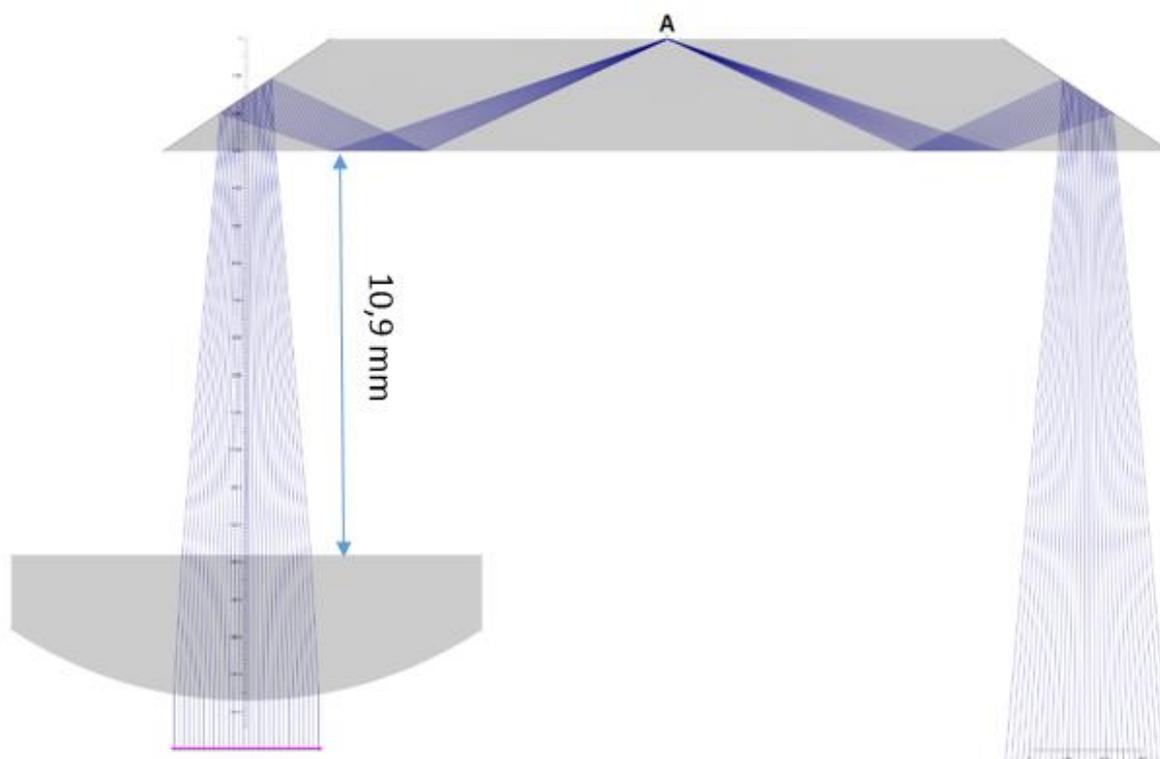


Fonte: Própria.

Uma vez obtida a otimização do ponto focal acrescenta-se ao processo de simulação a estrutura correspondente ao *Biochip* PPBIO. Registre-se que suas dimensões foram estabelecidas respeitando-se as dimensões da lente; após primeiras simulações observou-se a necessidade de acrescentar espelhos em suas paredes inclinadas para minimizar as perdas por refração e amplificar a reflexão dentro do PPBIO, isto está em acordo com o PPBIO, pois, este com o mesmo objetivo também tem suas paredes inclinadas espelhadas.

Na Figura 31 apresenta-se a simulação obtida, verifica-se que as trajetórias dos raios convergem exatamente para o ponto central A onde deve ocorrer a reflexão. Diferentemente do que havia sido previsto na seção 3.1, nesta simulação encontrou-se como distância entre o PPBIO e a lente cilíndrica, o valor de 10,9 mm. Saliente-se que naquela seção havia dúvidas sobre qual das distâncias: 4 mm, 5 mm e 6.2 mm seria efetivamente implementada.

Figura 31. Alinhamento ideal, foco exatamente sobre o ponto central “A” onde pretende-se que ocorra o fenômeno SPR.

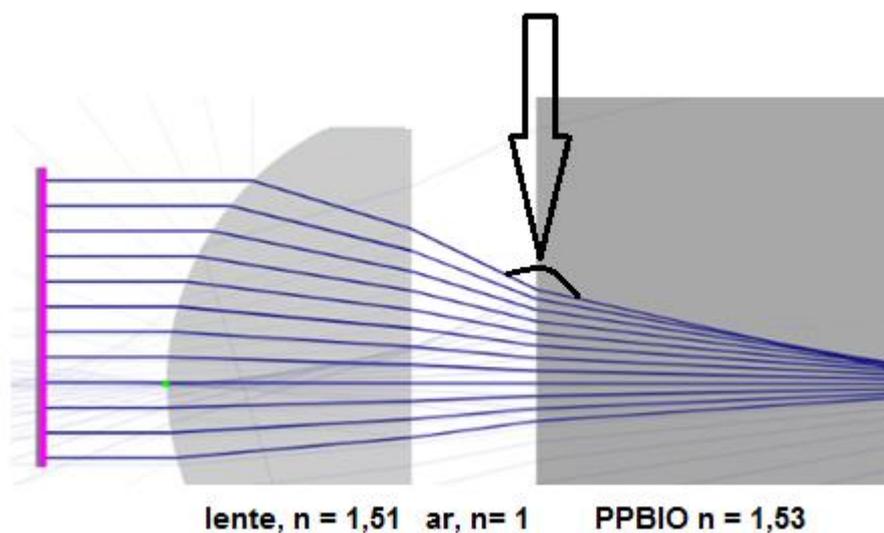


Fonte: Própria

Fazendo-se uma análise mais detalhada percebe-se que a trajetória dos raios ao penetrarem no PPBIO sofrem um desvio de maneira a diminuir o grau de

convergência para o ponto focal, desta maneira é de se esperar que seja necessária uma maior distância entre a lente cilíndrica e o *biochip* para se obter o ponto de convergência exatamente sobre o ponto central A. Como essa atenuação não ficou tão evidente nas Figura 16 e 31, é apresentado na Figura 32 de forma ilustrativa a atenuação da inclinação dos raios ao entrarem no *biochip*.

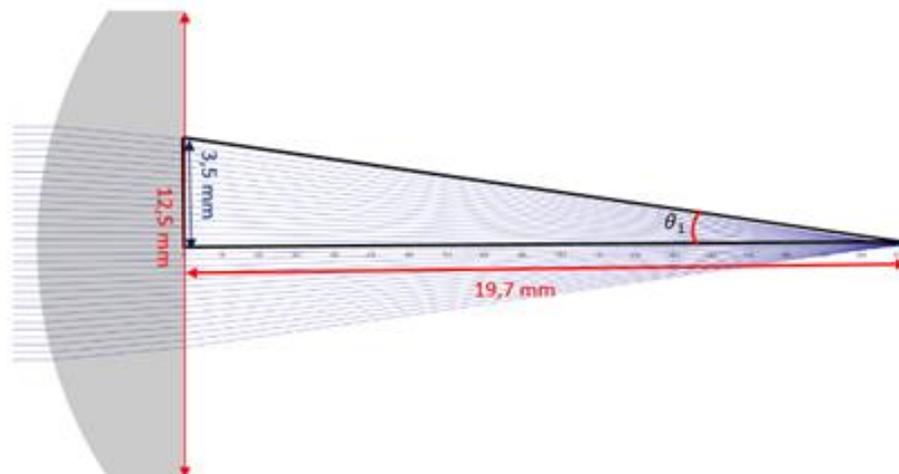
Figura 32. Ilustra-se de forma ampliada (para ficar mais evidente) o desvio que ocorre na trajetória dos raios ao atravessarem do ar para o PPBIO.



Fonte: Própria

Ante as divergências procedeu-se a análise matemática. Na Figura 33 é apresentada um feixe de luz de largura estreita, 3,5 mm, para minimizar o efeito da aberração esférica que atravessa a lente e converge para o ponto focal. Conforme especificação do fabricante da lente a ser usada é obtida a distância de 19,7 mm.

Figura 33. Largura do feixe incidente reduzida para minimizar a aberração esférica.



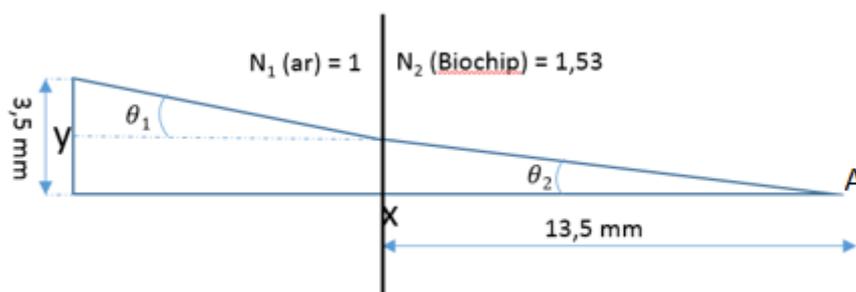
Fonte: Própria

Aplicando-se as relações trigonométricas para o triângulo retângulo obtêm-se o valor do ângulo θ_1 .

$$\tan\theta_1 = 3,5/19,5 = 0,1776 \Rightarrow \theta_1 = 10,07^\circ$$

Como se observa na Figura 34 que é baseada na Figura 16 (seção 3.1), para que o ponto focal ocorra exatamente no ponto central A o raio central (que entra perpendicular à superfície) deve percorrer 13,5 mm no interior do PPBIO. Essa distância fixa, é uma característica física do *biochip*, os demais raios por serem inclinados em relação a superfície do *biochip* sofrem refração, ocorrendo atenuação da inclinação ao passarem para o interior do PPBIO, com isso é preciso fazer uma compensação. Isso é feito afastando-se a lente cilíndrica do PPBIO, esse valor na Figura 34 é apresentado como x.

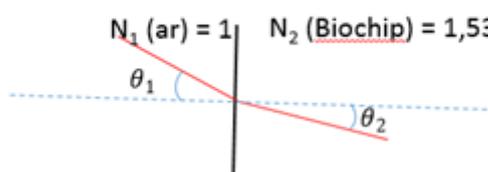
Figura 34. Desenho representando efeito da refração dos raios de luz ao penetrarem no *Biochip* PPBIO, baseado na Figura 16.



Fonte: Própria

Como já dito, os raios incidentes ao penetrarem no *biochip* PPBIO sofrem refração, esse processo pode ser modelado pela Lei de Snell-Descartes conforme apresentado na Figura 35, obtendo-se, θ_2 .

Figura 35. Aplicação da Lei de Snell-Descartes
Snell-Descartes



Fonte: Própria.

$$N_1 \cdot \text{sen}(\theta_1) = N_2 \cdot \text{sen}(\theta_2) \Rightarrow \theta_2 = 6,56^\circ$$

Na Figura 34 de posse θ_2 , aplicando-se as relações trigonométricas encontra-se a largura, y , do feixe ao penetrar no *biochip*.

$$\tan\theta_2 = y / 13.5 \Rightarrow y = 1,55$$

De posse do valor, y , obtêm-se a distância entre a lente cilíndrica e o *biochip* PPBIO, $x = 10,96$ mm. Esse valor é compatível ao obtida na simulação da trajetória de raios, 10,9 mm, Figura 31.

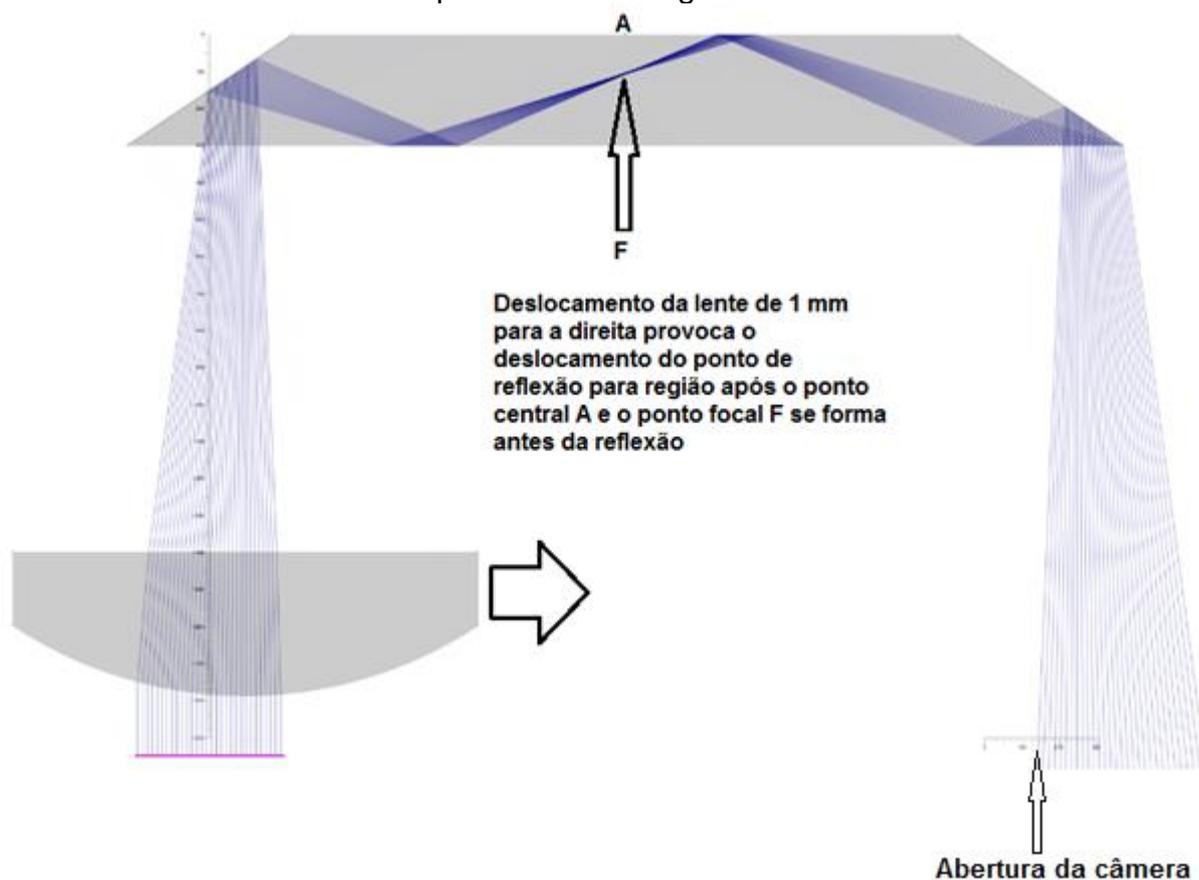
$$\tan\theta_1 = (3,5 - y) / x \Rightarrow x = 10,96 \text{ mm}$$

A partir da simulação ideal da Figura 31 foram feitas novas simulações com pequenas variações com objetivo de se antever a possíveis imprecisões. Nas Figura 36, Figura 37, Figura 38, Figura 39 são apresentados os efeitos de pequenas variações na distância da lente cilíndrica em relação ao *biochip*. Nas Figura 36 e Figura 37 é feito deslocamento da lente em relação ao PPBIO no eixo horizontal no valor de um milímetro para a direita e esquerda respectivamente. Lembrando que o

ponto ideal da lente no eixo horizontal corresponde ao ponto em que o eixo central da lente está exatamente na metade da região de entrada do *biochip*, ou seja, $4,44 / 2 = 2,22$ mm.

Verifica-se na Figura 36 que o deslocamento de 1 mm da lente cilíndrica em relação ao PPBIO para a direita provoca um descasamento entre a região que ocorre a formação do ponto focal F e a região de reflexão na superfície do *biochip*. Esta reflexão ocorre mais à direita do ponto central A. Esse processo resulta em um desalinhamento entre o sinal de saída e a abertura da câmera afetando a qualidade do sinal captado. Como se vê na figura o sinal de saída é assimétrico, mas não tem como mensurar.

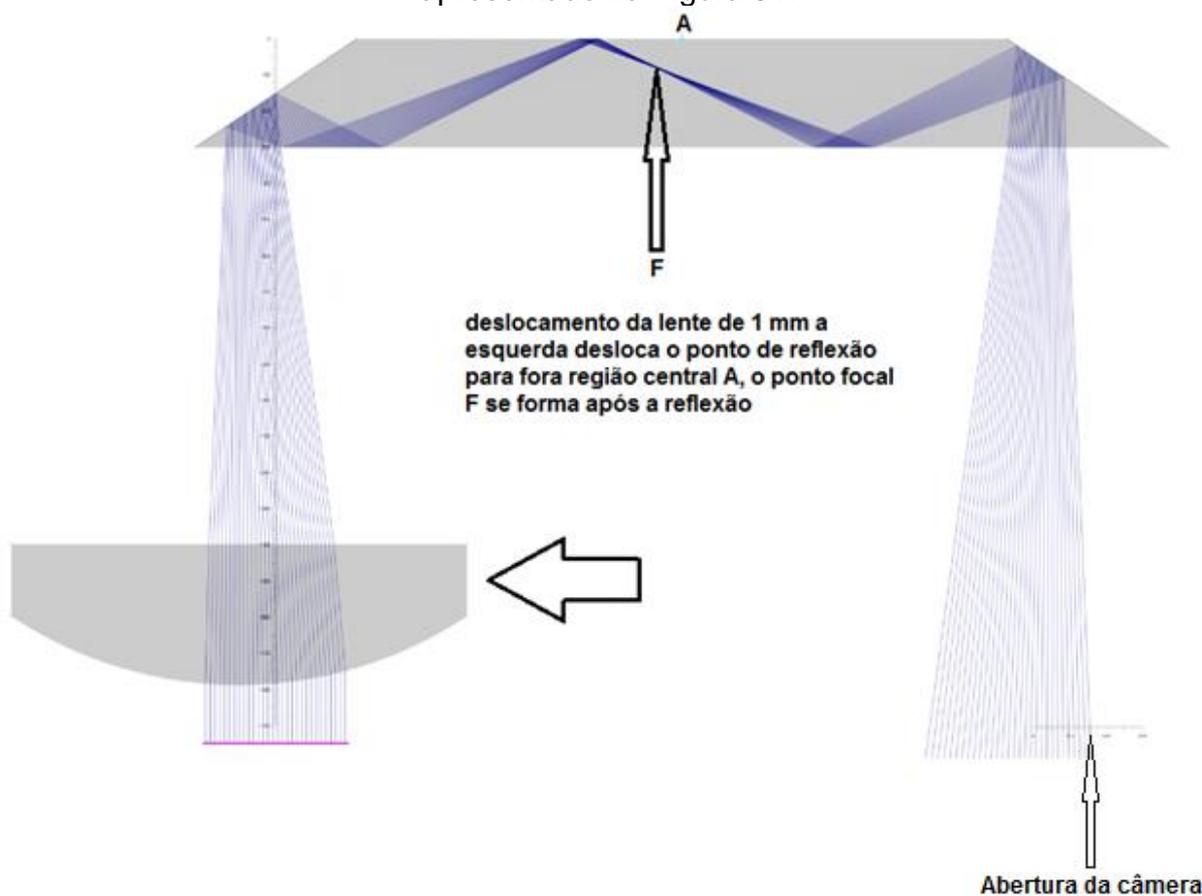
Figura 36. Lente levemente deslocada para a direita em 1 mm em relação ao ideal apresentado na Figura 31.



Fonte: Própria.

Similarmente a Figura 36, na Figura 37 verifica-se que o deslocamento de 1 mm da lente cilíndrica em relação ao PPBIO para a esquerda provoca um descasamento entre a região que ocorre a formação do ponto focal F e a região de reflexão na superfície do *biochip*. Esta reflexão ocorre mais à esquerda do ponto central A. Esse processo resulta em um desalinhamento entre o sinal de saída e a abertura da câmera afetando a qualidade do sinal captado. Como se vê na figura o sinal de saída é assimétrico, mas não tem como mensurar.

Figura 37. Lente deslocada para a esquerda em 1 mm em relação ao ideal apresentado na Figura 31.

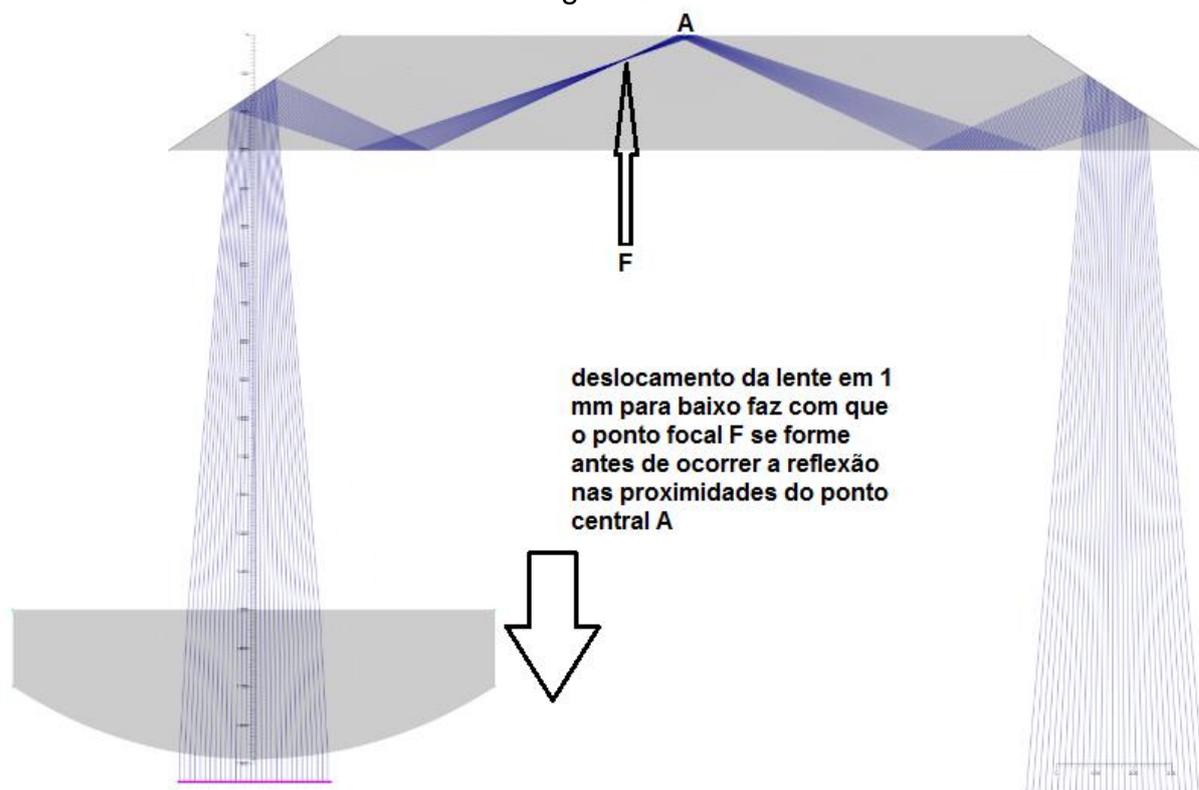


Fonte: Própria.

Nas Figura 38 e Figura 39 é feito deslocamento da lente em relação ao PPBIO no eixo vertical de um milímetro para a baixo e para cima respectivamente.

Verifica-se na Figura 38 que o deslocamento de 1 mm da lente cilíndrica em relação ao PPBIO para baixo provoca um descasamento entre a região que ocorre a formação do ponto focal F e a região de reflexão na superfície do *biochip*. Apesar da reflexão ocorrer nas proximidades do ponto central A, o ponto focal F se forma antes da reflexão. Considerando a simetria do sinal de saída em relação a abertura da câmera, esse processo aparentemente não provoca alteração no sinal de saída, não afetando a qualidade do sinal captado.

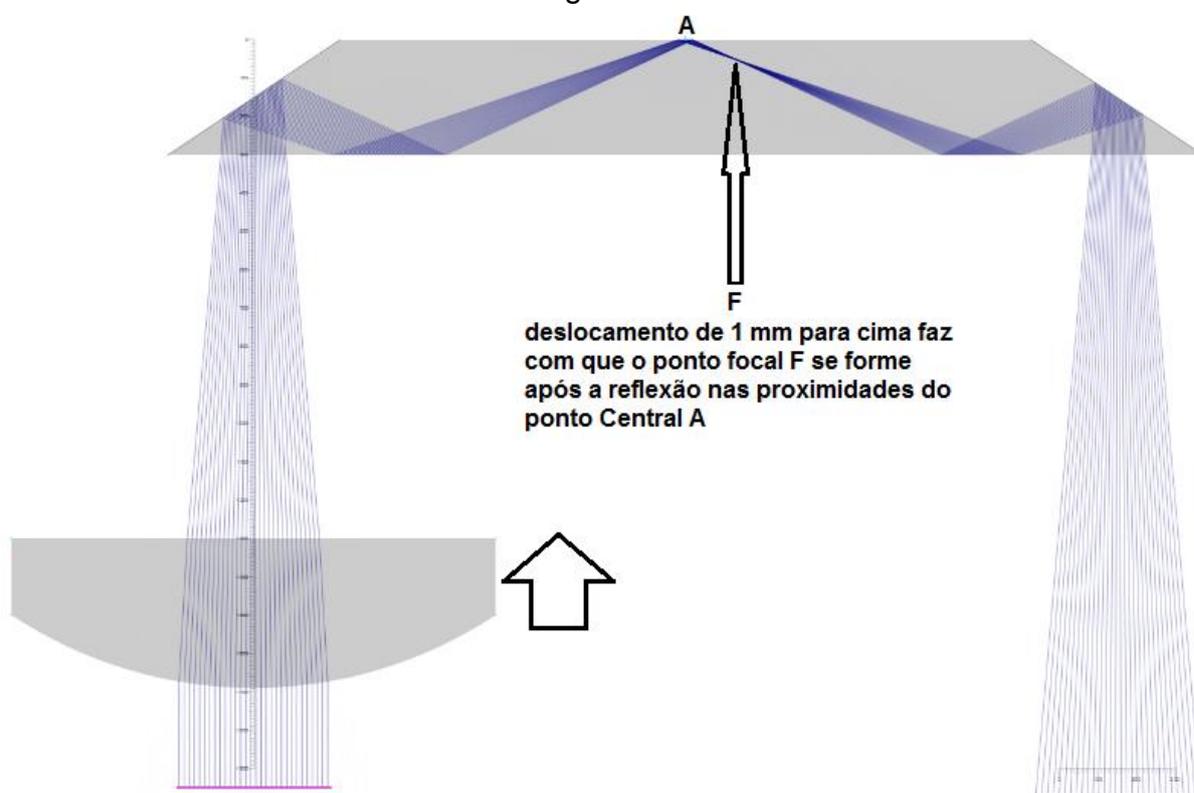
Figura 38. Lente deslocada para baixo em 1 mm em relação ao ideal apresentado na Figura 31.



Fonte: Própria.

Verifica-se na Figura 39 que o deslocamento de 1 mm da lente cilíndrica em relação ao PPBIO para cima provoca um descasamento entre a região que ocorre a formação do ponto focal F e a região de reflexão na superfície do *biochip*. Apesar da reflexão ocorrer nas proximidades do ponto central A, o ponto focal F, opostamente a Figura 38, forma-se após a reflexão. Considerando a simetria do sinal de saída em relação a abertura da câmera, esse processo aparentemente não provoca alteração na saída do sinal não afetando a qualidade do sinal captado.

Figura 39. Lente deslocada para cima em 1 mm em relação ao ideal apresentado na Figura 31.



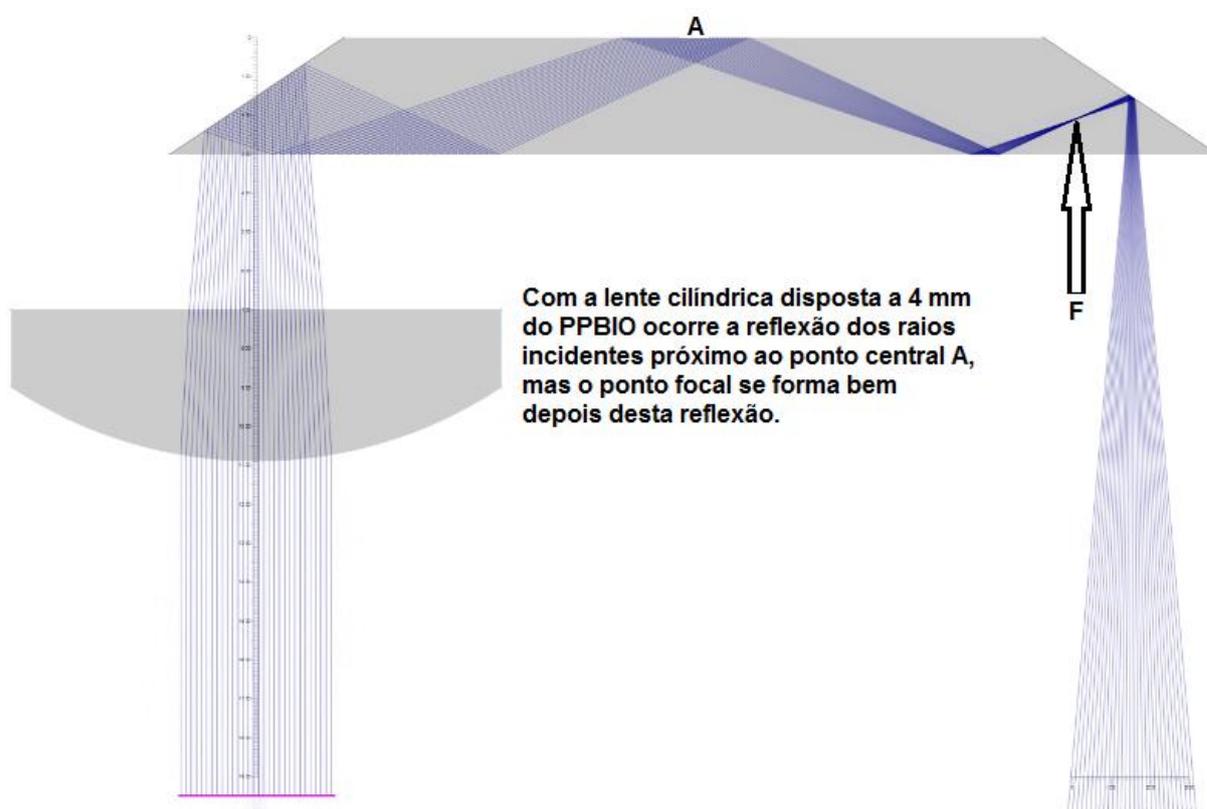
Fonte: Própria.

Nas Figura 40, Figura 41 e Figura 42 é apresentada a simulação para as distâncias entre PPBIO e a lente cilíndrica previstas na parte teórica, seção 3.1 (4,0 mm, 5,0 mm, 6,2 mm).

Na Figura 40 verifica-se a simulação com o afastamento de 4 mm entre a lente cilíndrica e o *biochip* PPBIO, verifica-se o descasamento entre o ponto onde

ocorre a formação do ponto focal F e a região de reflexão na superfície do *biochip*. Apesar da reflexão ocorrer nas proximidades do ponto central A, o ponto focal F, forma-se muito após a reflexão, quase na saída do *biochip*. A região de reflexão é relativamente larga, em torno de 3,2 mm. Percebe-se a simetria e um estreitamento na largura do sinal de saída, esse estreitamento significa uma maior densidade de informação por pixel na câmera, podendo gerar imprecisões.

Figura 40. Lente cilíndrica afastada 4 mm do *biochip* PPBIO.

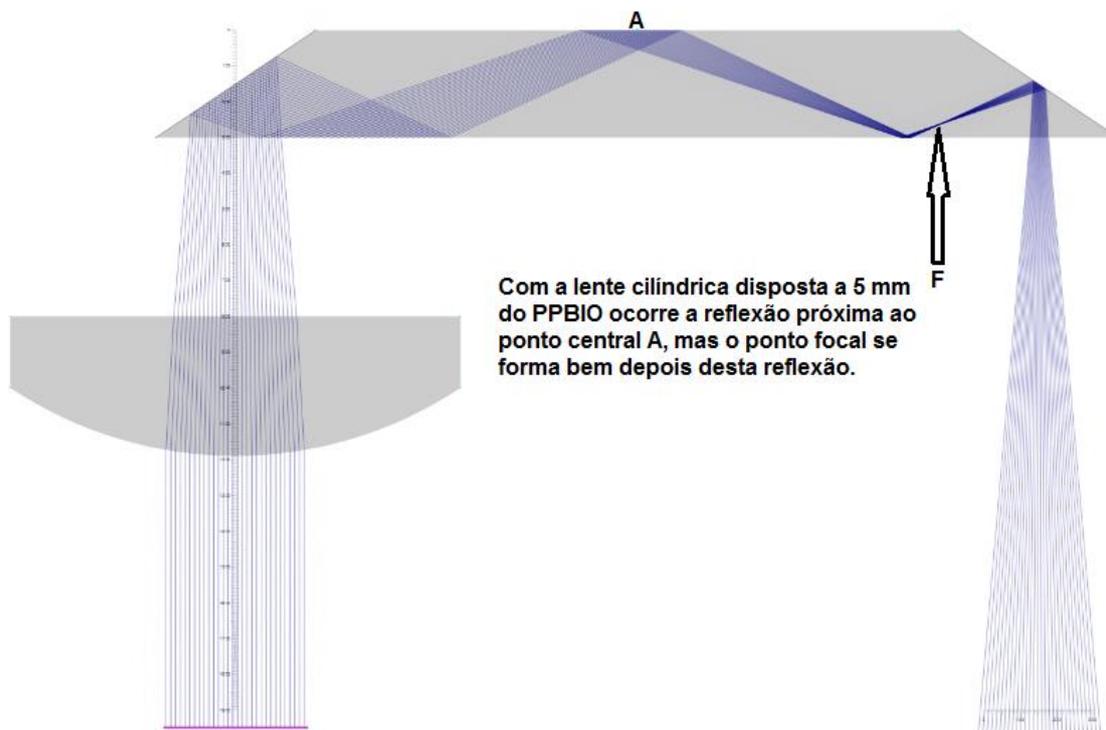


Fonte: Própria

Na Figura 41 tem-se a simulação com o afastamento de 5 mm entre a lente cilíndrica e o *Biochip* PPBIO, verifica-se o descasamento entre o ponto onde ocorre a formação do ponto focal F e a região de reflexão na superfície do *biochip*. Apesar da reflexão ocorrer nas proximidades do ponto central A, o ponto focal F, forma-se muito após a reflexão, quase na saída do *biochip*. A região de reflexão é relativamente larga, mas inferior ao da Figura 40, em torno de 2,8 mm. Assim como na Figura 40, percebe-se a simetria e um estreitamento da largura do sinal de saída

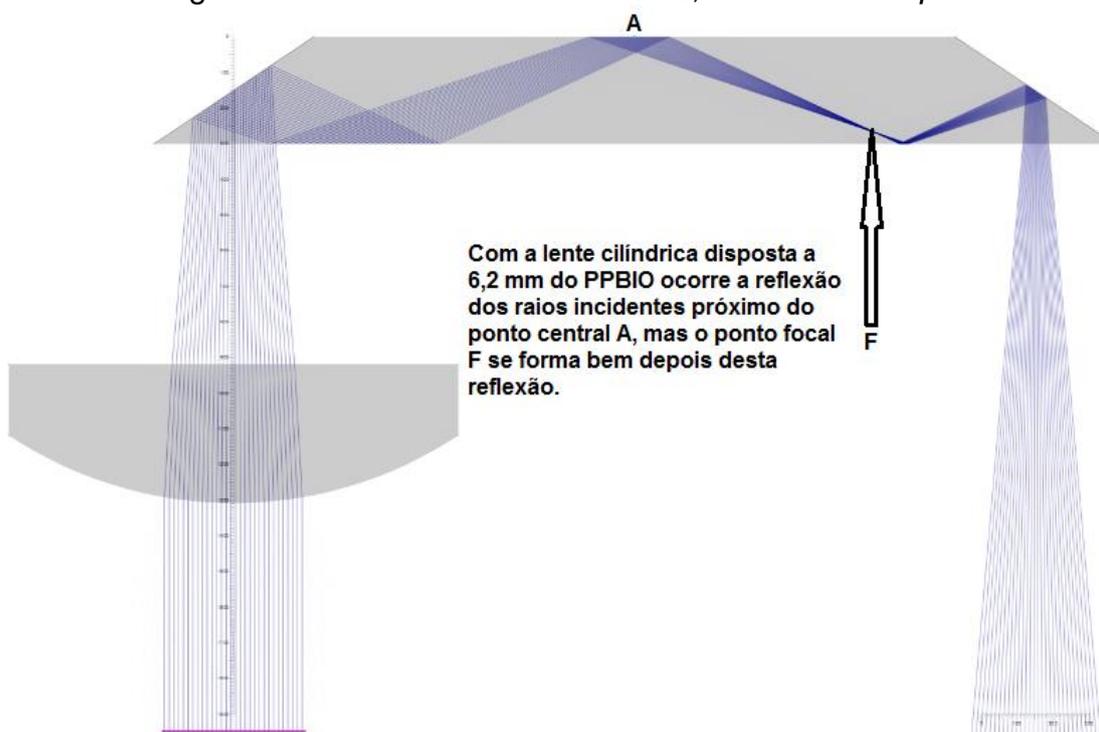
(feixe de raios emergentes), esse estreitamento significa uma maior densidade de informação por pixel na câmera, podendo gerar imprecisões.

Figura 41. Lente cilíndrica afastada 5 mm do *biochip* PPBIO.



Fonte: Própria

Figura 42. Lente cilíndrica afastada 6,2 mm do *biochip* PPBIO.



Fonte: Própria

Na Figura 42 tem-se a simulação com o afastamento de 6,2 mm entre a lente cilíndrica e o *Biochip* PPBIO, verifica-se o descasamento entre o ponto onde ocorre a formação do ponto focal F e a região de reflexão na superfície do *biochip*. Apesar da reflexão ocorrer nas proximidades do ponto central A, o ponto focal F, forma-se muito após a reflexão. A região de reflexão é relativamente larga, mas inferior ao das Figura 40 e Figura 41, em torno de 2,2 mm. Assim como nas Figura 40 e Figura 41, percebe-se a simetria e um estreitamento na largura do sinal de saída, esse estreitamento significa uma maior densidade de informação por pixel na câmera, podendo gerar imprecisões.

Diante dos resultados encontrados nas simulações apresentadas fica evidente a importância delas, pois, observa-se: 1. O efeito da aberração esférica é maior quanto maior for a largura do feixe de luz de entrada. 2. Conforme Figura 31, corroborada por cálculos matemáticos, a distância entre a lente e o PPBIO tem uma nova opção, 10,90 mm. 3. Pequenas variações na posição horizontal da lente cilíndrica (Figura 36 e

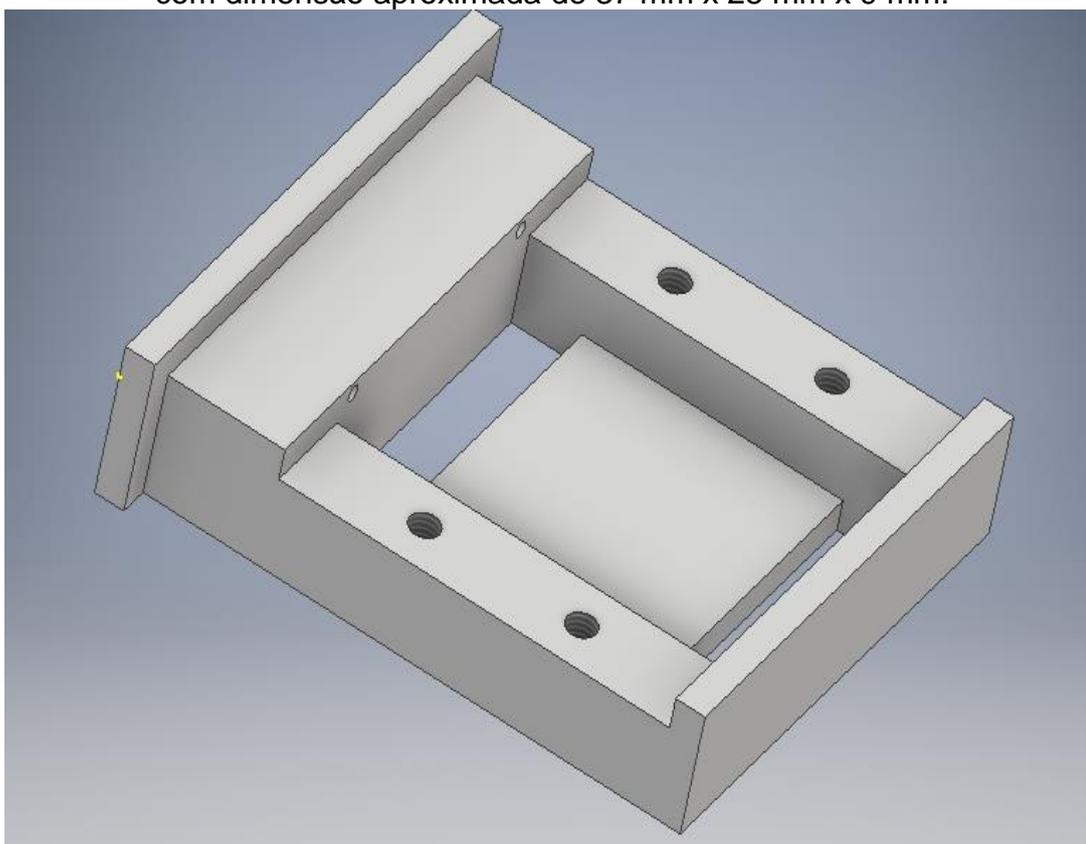
Figura 37) afetam a simetria do sinal de saída, além de deslocar o ponto de reflexão da região central, isso é totalmente incompatível com a implementação da célula de fluxo. 4. Apesar de pequenas variações (próximo a distância ideal 10,90 mm) da lente cilíndrica em relação ao eixo vertical (Figura 38 e Figura 39) provocar o descasamento entre ponto focal F e região de reflexão, isso não parece afetar significativamente o sinal de saída, há um alargamento mínimo da região de reflexão que continua no ponto central A. 5. Nas Figura 40, Figura 41 e Figura 42 (distâncias de 4 mm, 5 mm, 6,2 mm) também ocorre o descasamento entre ponto de reflexão e ponto focal F, percebe-se que apesar da reflexão ocorrer na região do ponto central A, essa região é relativamente espalhada chegando a 3,2 mm o que deve ser considerado quando da implementação da célula de fluxo; nota-se também que o fato do ponto focal F ocorrer bem depois da região central A faz com que o feixe de raios saia bem mais concentrado. Essa maior densidade do feixe de raios pode gerar imprecisões na captação do sinal, resta saber se no caso prático o processamento digital dos sinais conseguirá ou não compensar essa maior densidade de raios de saída.

4.3 CONSTRUÇÃO DA ESTRUTURA MODULAR

Sobre o projeto da estrutura, a completa definição das dimensões envolvidas é crucial, devendo levar em consideração se sob aspectos construtivos do sistema embarcado, as distâncias ópticas exigidas são realizáveis ao se adaptar as duas tecnologias. Na construção do primeiro protótipo, deve-se prever a possibilidade inclusão/exclusão de lentes conforme a configuração, além da movimentação entre elas e o PPBIO.

Inicialmente, desenhou-se a estrutura que receberá o *Biochip* PPBIO com uso do *software* Autocad Inventor, conforme ilustrado na Figura 43.

Figura 43. Desenho parcial da estrutura que será utilizada com o PPBIO, estrutura com dimensão aproximada de 37 mm x 25 mm x 9 mm.



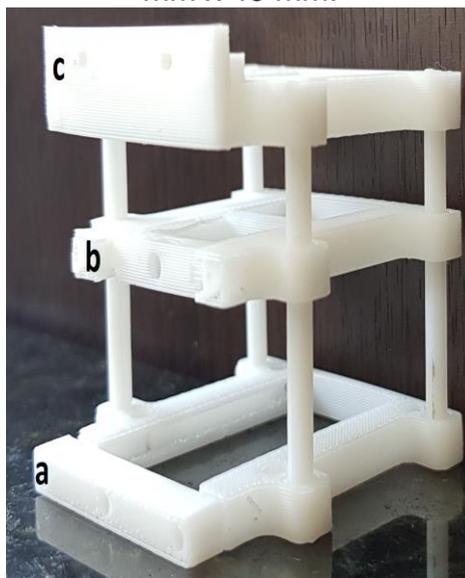
Fonte: própria.

Na sequência, com a definição do modelo de lente cilíndrica e a expectativa de que seja dispensada o uso da lente colimadora ou caso venha ser necessário o

uso da mesma, seja, com dimensões equivalentes ao da lente cilíndrica, procedeu-se ao desenho e confecção da estrutura com uso de impressão 3D, Figura 44.

A estrutura é toda interligada por quatro barras cilíndricas podendo dessa forma, ter as distâncias verticais entre as três peças alteradas (deslizadas) conforme a necessidade. Da mesma forma, as bandejas, (Figura 44 a) e b)) possuem fendas/trilhos que possibilitam o deslocamento das lentes na horizontal. Como já dito anteriormente, a fonte de luz (tela do celular) está imediatamente abaixo do *biochip*, assim, acredita-se que seja dispensado o uso da lente colimadora. De qualquer forma, a bandeja para a lente colimadora pode ser usada ou não conforme a necessidade.

Figura 44. Protótipo: a) local da lente colimadora, caso seja necessária; b) lente cilíndrica, c) *biochip* PPBIO. Estrutura com dimensões aproximadas de 37 mm x 25 mm x 45 mm.



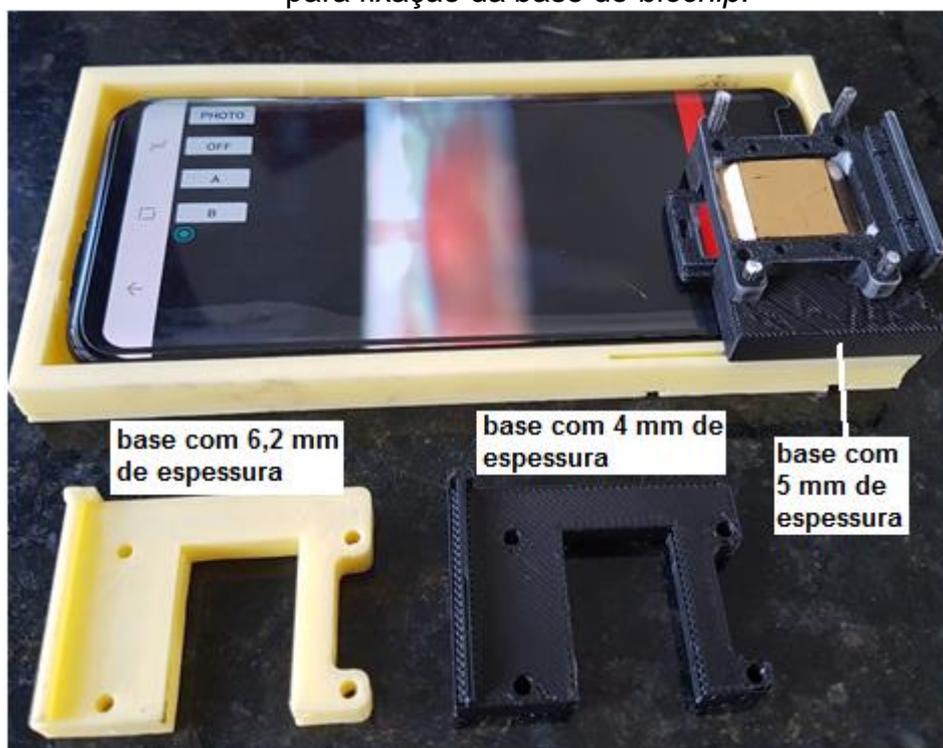
Fonte: Própria.

Feitos os primeiros testes nos modos AIM e WIM, constatou-se que havia dificuldades de manuseio, tendo em vista que a estrutura ficava sobre o celular sem qualquer fixação. Dessa forma, durante os procedimentos, muitas vezes, ela se deslocava de sua posição inicial (por vibração do celular, esbarrão involuntário, etc.), colocando-se sob suspeita os resultados.

A solução foi fazer uma adaptação do protótipo que passou a ficar fixo em uma capa especialmente idealizada para unir-se ao celular, conforme apresentado

no trabalho de (SOUZA FILHO, 2017). Na Figura 45 observa-se a fotografia do novo protótipo.

Figura 45. Novo protótipo com as bases e o celular dentro de sua capa (cor clara) para fixação da estrutura do *biochip*. A capa abarca o celular e possui uma fenda para fixação da base do *biochip*.



Fonte: Própria.

Como nesse momento não havia ainda sido definido qual a distância entre a lente plano-convexa e o *biochip*, optou-se por fazer três bases prevendo as três distâncias 4 mm, 5 mm, 6,2 mm.

No presente trabalho, não foi possível confeccionar a célula de fluxo para desenvolver testes sequenciais. Assim, todos os procedimentos de teste foram realizados colocando-se manualmente a substância a ser analisada sobre o filme metálico do ouro.

4.4 RESULTADOS OBTIDOS COM A CONFIGURAÇÃO AIM

Os testes iniciais na configuração AIM são apresentados a seguir. A montagem foi realizada conforme a

Figura 46, sendo utilizada a base com a distância de 5 mm entre o *biochip* e a lente cilíndrica.

Inicialmente, antes de qualquer procedimento, faz-se a captação da imagem de saída do *biochip* sem qualquer substância sobre a camada de ouro. O objetivo é gerar uma imagem de referência, sem o efeito SPR, para ser utilizada na normalização das imagens seguintes.

O procedimento consiste em se aplicar uma fonte de luz na entrada do *biochip* (produzida pela própria tela do celular, no caso, na cor vermelha) em seguida sobre a estrutura do *biochip* é colocada uma caixa escura, impermeável a luz para evitar a interferência de luz externa. A imagem captada na saída do *Biochip* é armazenada para processamento.

Repete-se o procedimento acrescentando sobre o filme de ouro a substância a ser analisada. Na sequência, compara-se a imagem obtida com a substância e a imagem de referência, é o processo de normalização.

Figura 46. Sistema biossensor: *smartphone* e estrutura com *biochip*.

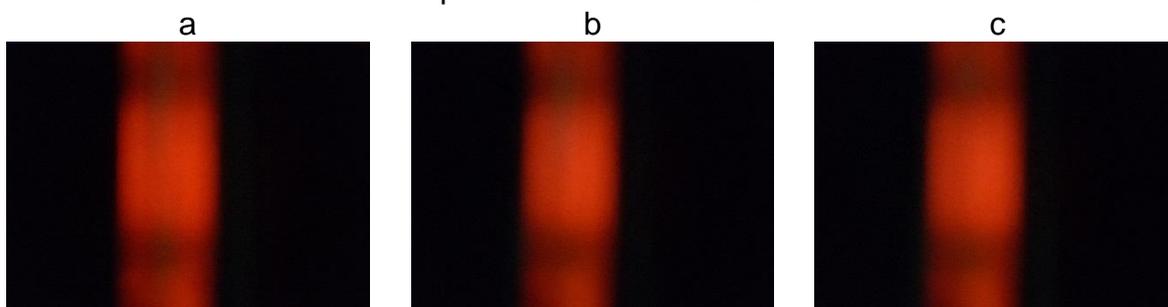


Fonte: Própria.

Os resultados aqui apresentados foram obtidos com duas substâncias, água pura (destilada) e hipoclorito de sódio, NaClO (popularmente conhecida como água sanitária), na concentração de 10%. Essa concentração menor é para se minimizar a ação corrosiva sobre o filme de ouro.

A seguir, com objetivo ilustrativo, são apresentadas as respectivas imagens que foram captadas e armazenadas pelo sistema para futuro processamento. Percebe-se que a visão humana não consegue detectar diferenças significativas entre elas, conforme o mostrado na Figura 47. O smartphone usado foi um Samsung S8 plus cujas as imagens têm resolução de 2448 linhas x 3264 colunas.

Figura 47. Imagens captadas pelo biossensor: a) referência, b) água pura, c) hipoclorito de sódio a 10%.



Fonte: Própria.

As imagens transferidas para o computador foram analisadas com o MATLAB. O resultado é apresentado nas, Figura 48, Figura 49, Figura 50.

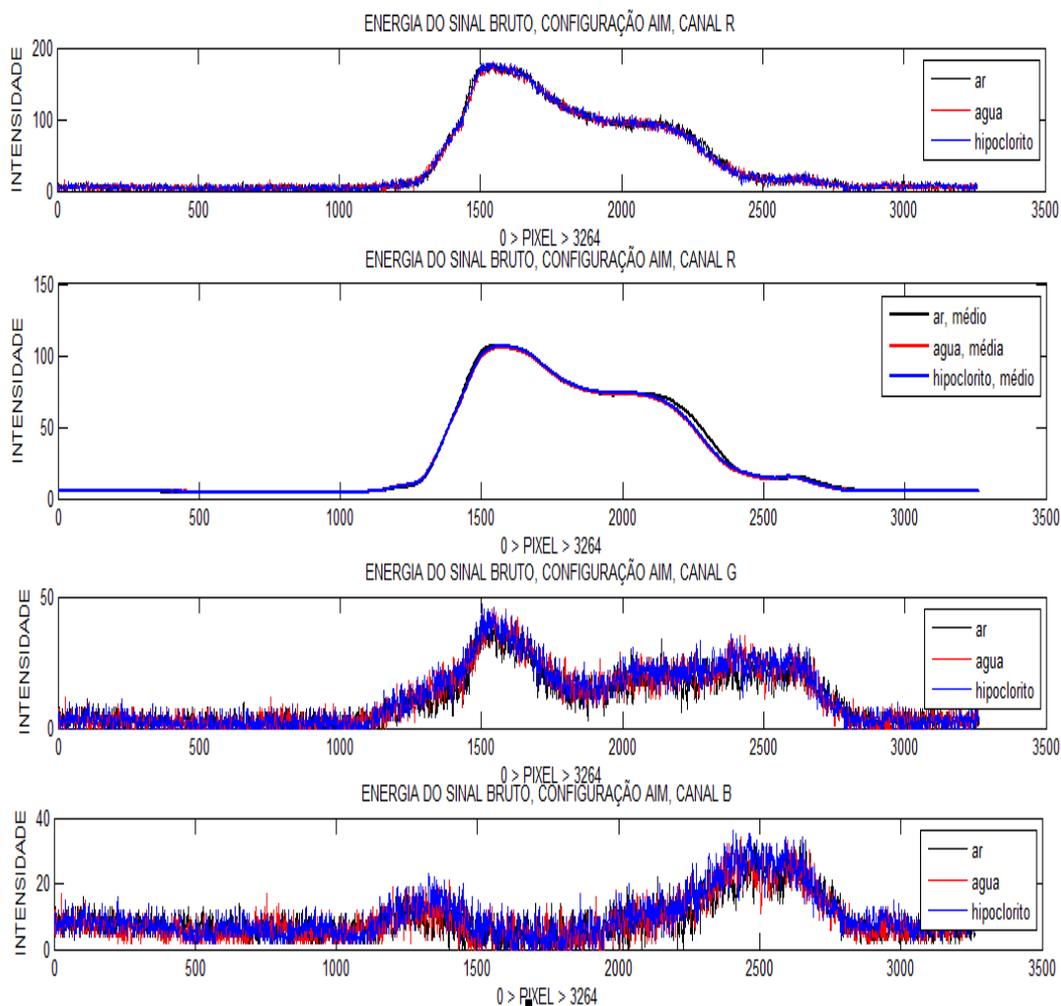
Na Figura 48, o sinal é analisado de forma separada por canal, RGB (*Red, Green, Blue*), cada canal de cor varia de 0 a 255, nestes gráficos esses valores são representados no eixo das ordenadas (“intensidade”), o eixo das abscissas corresponde aos 3264 pixels (são as colunas da imagem) de uma determinada linha da imagem, no caso adotou-se a linha central ($2448/2 = 1224$). Como a fonte de luz é vermelha, pretende-se analisar somente o canal R que é o primeiro gráfico.

Teoricamente, nos sinais mostrados no primeiro gráfico da Figura 48, observa-se o efeito SPR quando é verificada a atenuação do sinal (curvas vermelha e azul) em relação ao sinal de referência (curva preta), porém, surgem dúvidas quanto à possibilidade do ocorrido tendo em vista a quantidade de ruído.

Diante da dúvida, o gráfico que havia sido plotado sendo considerada apenas a linha central da imagem, foi novamente trabalhado considerando o valor médio das 100 linhas acima e as 100 linhas abaixo da linha central (segundo gráfico). Percebe-se que as curvas mantêm suas características, os ruídos são atenuados e a região de ressonância fica mais evidente (entre o pixel 2200 e 2400). É preciso ressaltar que foi realizada apenas uma imagem de cada sinal de saída, estando dessa forma sujeita a ruído temporal. Este ruído pode ser minimizado tirando-se várias imagens e calculando-se a média.

Estranhamente observa-se que há sinal nos canais G e B (terceiro e quarto gráficos), posteriormente, constatou-se que o vermelho produzido na tela do *smartphone* não era puro, ou seja, havia componentes B e G no sinal de entrada. De qualquer forma, não são analisados por terem magnitude relativamente inferior e, assim, estarem mais expostos à influência de ruído.

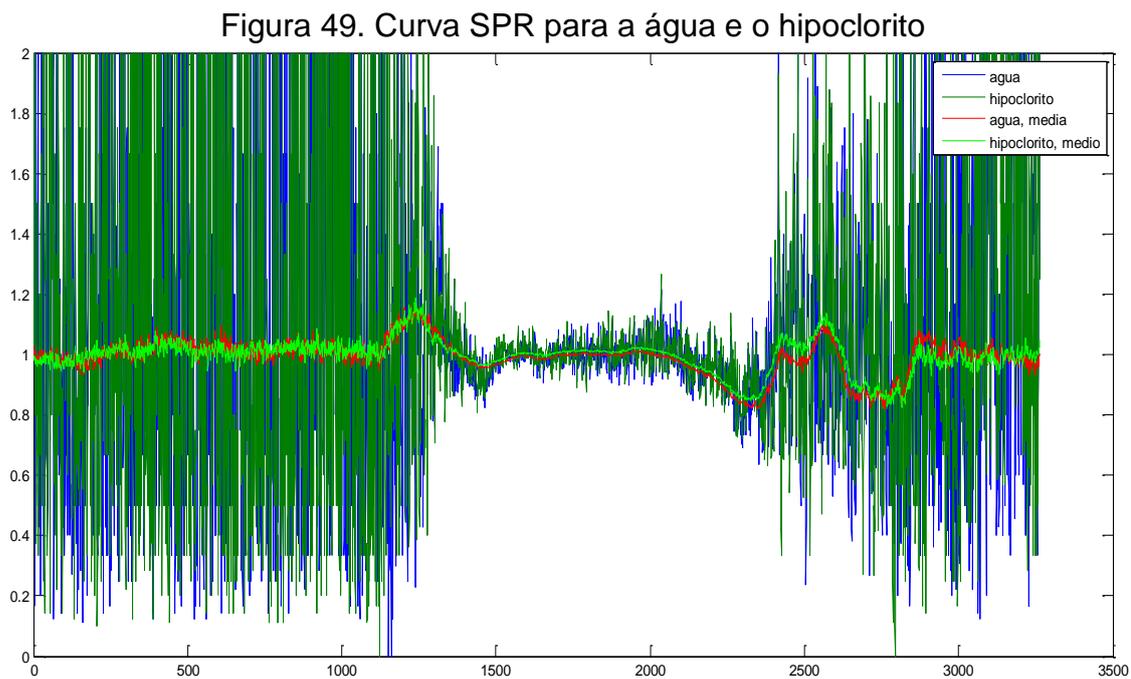
Figura 48. Sinal obtido na saída do *biochip*. O primeiro e o segundo gráfico correspondem ao canal R, o terceiro e quarto se referem aos canais G e B. Não se esperava sinal nos canais G e B visto que a luz de entrada é vermelha.



Fonte: Própria.

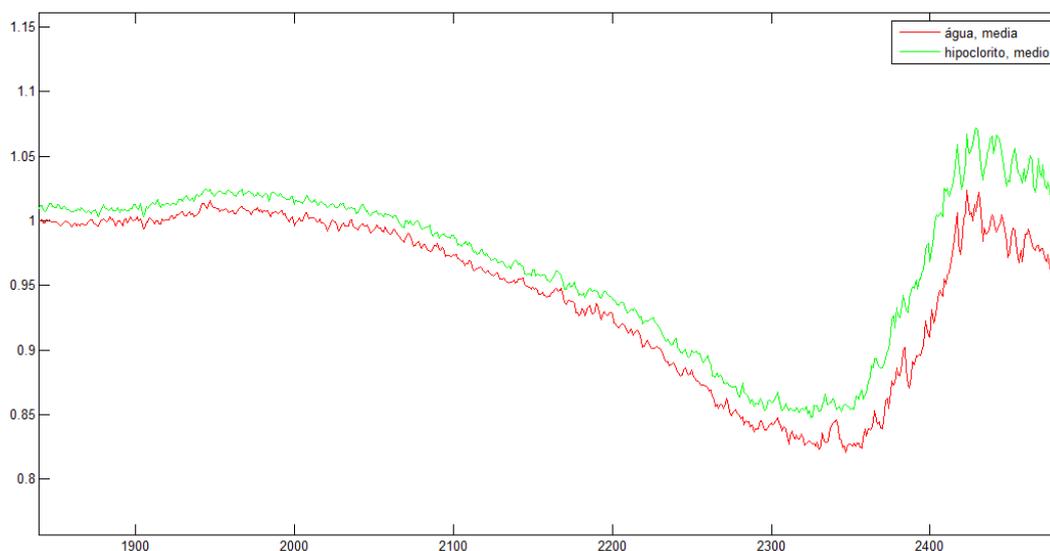
No gráfico da Figura 49, são apresentadas as curvas SPR para a água e o hipoclorito para o canal R. Os canais G e B não foram considerados. Cada curva SPR foi calculada normalizando o sinal da água e do hipoclorito pelo sinal de referência obtido no início do procedimento com o *biochip* sem qualquer substância. A curva verde escura e a verde clara, conforme legenda, corresponde ao hipoclorito, sendo a verde clara o seu valor médio; a curva azul e a vermelha correspondem à água, sendo a vermelha seu valor médio. Observa-se que nas laterais da imagem existem faixas escuras sem qualquer informação útil. Nessas extremidades (região inferior ao pixel 1300 e superior ao pixel 2400) do gráfico observa-se maiores oscilações porque para valores normalizados sendo o denominador próximo de zero

há significativa instabilidade (se olhar na Figura 47, essa região é escura e a cor escura ~ 0). O olhar mais treinado consegue detectar um possível ponto de ressonância na região do pixel 2400. Na verdade, o próprio MATLAB fornece esses valores: para a água o valor mínimo fica em 0.8211 no pixel 2348, o hipoclorito tem o valor mínimo de 0.8479 no pixel 2326.



Para a melhor visualização das curvas SPR, na Figura 50, é apresentado os gráficos com apenas as curvas médias normalizadas da água e do hipoclorito com um zoom limitado entre os pixels 1800 e 2500.

Figura 50. Gráfico das curvas SPR da água e do hipoclorito.



Fonte: Própria.

4.5 RESULTADOS OBTIDOS NA CONFIGURAÇÃO WIM

Segundo a teoria, na configuração WIM a fonte de luz é branca, composta pela soma de várias cores, ou seja, várias frequências (vários comprimentos de onda). Dependendo do índice de refração da superfície adjacente ao filme metálico (camada 3 da Figura 6, com n_3 e d_3), uma destas frequências incidentes não serão refletidos para a saída do *biochip*, tendo em vista haver um acoplamento entre essa frequência e as oscilações de elétrons livres no filme metálico. Essa ausência de determinada frequência pode ser identificada com um espectrômetro.

Conforme previsto na seção 3.2, o desvio ou espalhamento espectral pode ser constatado utilizando um pedaço de CD como rede ou grade de difração. Essa é uma solução barata e muito difundida que produz efeitos equivalentes ao espectrômetro. Esse é o primeiro passo para se conseguir observar o WIM.

Normalmente, o espalhamento espectral é projetado em um anteparo e este é visto pelo observador, diferentemente, no presente trabalho, pretende-se que a câmera frontal do *smartphone* capte diretamente esse fenômeno sem usar o anteparo.

Foi montada estrutura como apresentada na Figura 51, a estrutura com o PPBIO, o pedaço de CD e o *smartphone* com o programa que faz a captação e a armazenagem do sinal de saída do PPBIO. Comparando-se com o modo AIM são similares, não tendo a lente cilíndrica entre o *smartphone* e a entrada do *biochip*, mas tem o pedaço de CD entre a saída do *biochip* e a câmera frontal do *smartphone*, Figura 17.

O posicionamento do CD foi variado, seguindo o embasamento teórico, de maneira a se obter o melhor efeito de espalhamento espectral. Inclusive, na própria imagem da Figura 51, pode-se ver uma região de espalhamento espectral (indicado), mas esse é provocado pela lâmpada fluorescente no teto do local onde foi fotografado; neste caso o resultado foi obtido com a rede de difração (CD) colocada justaposta a lente da câmera.

Figura 51. Plataforma montada com o objetivo de observar o espalhamento espectral, fenômeno necessário para o funcionamento do WIM.

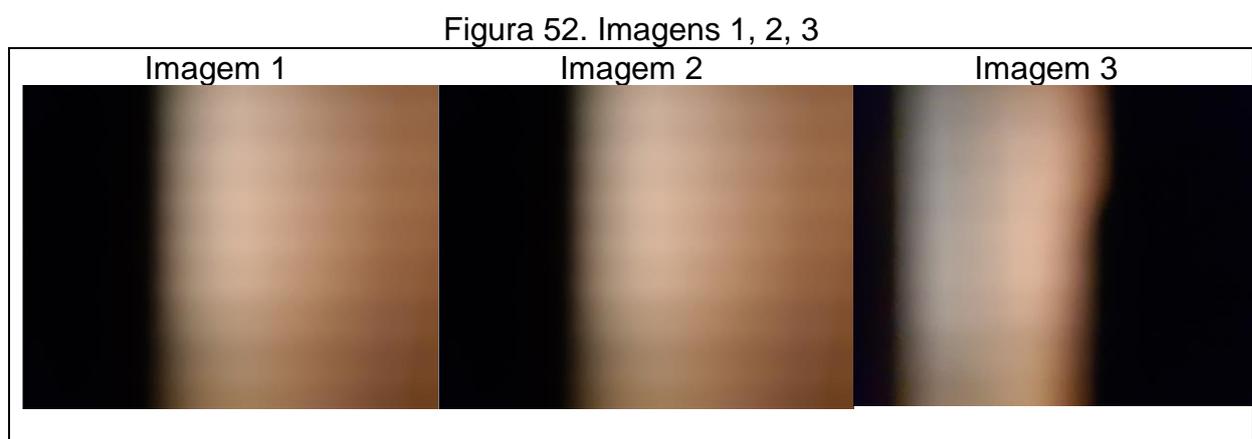


Fonte: Própria.

Como a distância da rede de difração ao anteparo determina a distância entre os espectros (Figura 21, máximo central e espectro de 1ª ordem) e conforme Figura 51, verifica-se que a rede de difração justaposta a câmera produz o resultado desejado, optou-se, inicialmente, por deixá-la nesta posição. É conveniente lembrar

que a câmera possui uma lente (ou um conjunto de lentes) e uma superfície formada por fotodetectores ao fundo, por analogia a Figura 20, essa superfície é o anteparo onde se projeta as imagens.

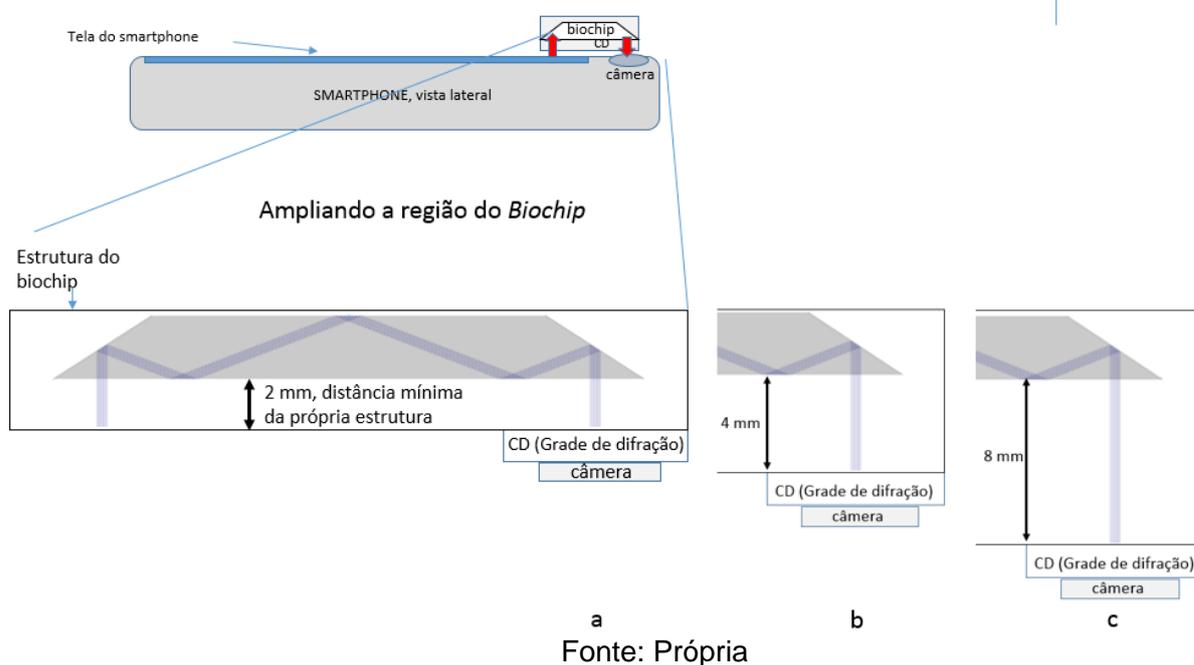
Na Figura 52, apresenta-se algumas imagens obtidas: conforme se vê na imagem 1, não se observou nada de espalhamento (decomposição da luz). Ante o resultado negativo, variou-se a distância do *biochip* PPBIO para câmera: 2 mm (imagem 2), 6 mm (imagem 3), mas também não se obteve resultado satisfatório.



Fonte: Própria.

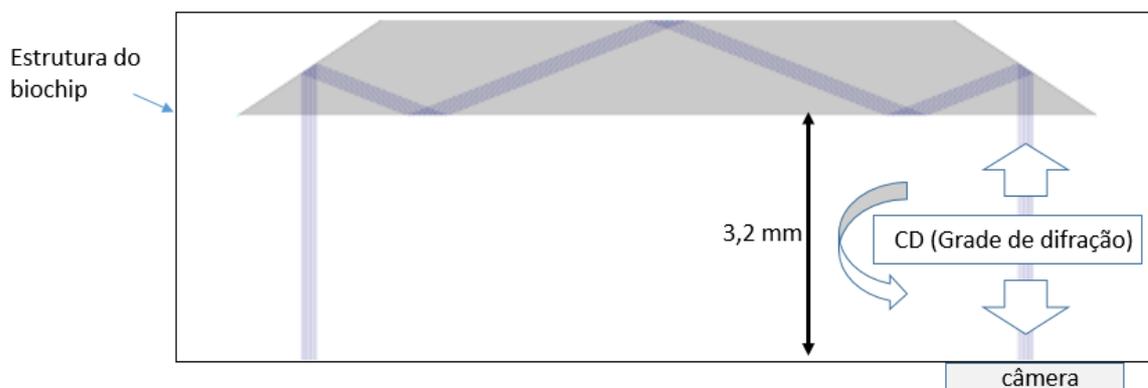
Para se ter um melhor entendimento do que foi realizado nas imagens da Figura 52 foi apresentado um desenho esquemático das situações na Figura 53. Variou-se a distância entre o *biochip* e a rede de difração, as situações a, b, c correspondem às imagens 1, 2, 3 respectivamente. Registre-se que devido a existência da estrutura que condiciona o *biochip*, a menor distância entre a rede de difração e o *biochip* é 2 mm, diante disso, entenda-se que nas imagens 1, 2, 3 distância entre o *biochip* e a rede de difração foi de 2 mm, 4 mm, 8 mm.

Figura 53. Ilustração do processo descrito na Figura 52. As imagens 1, 2, 3 correspondem às situações a, b, c.



Foram tentadas diversas posições na vertical, horizontal, inclinada para a rede de difração, mas não se conseguiu observar o espalhamento espectral desejado. Na Figura 54 apresenta-se o desenho esquemático que ilustra os procedimentos realizados.

Figura 54. Com *biochip* afastado da câmera, a grade de difração foi variada na vertical e/ou inclinada.

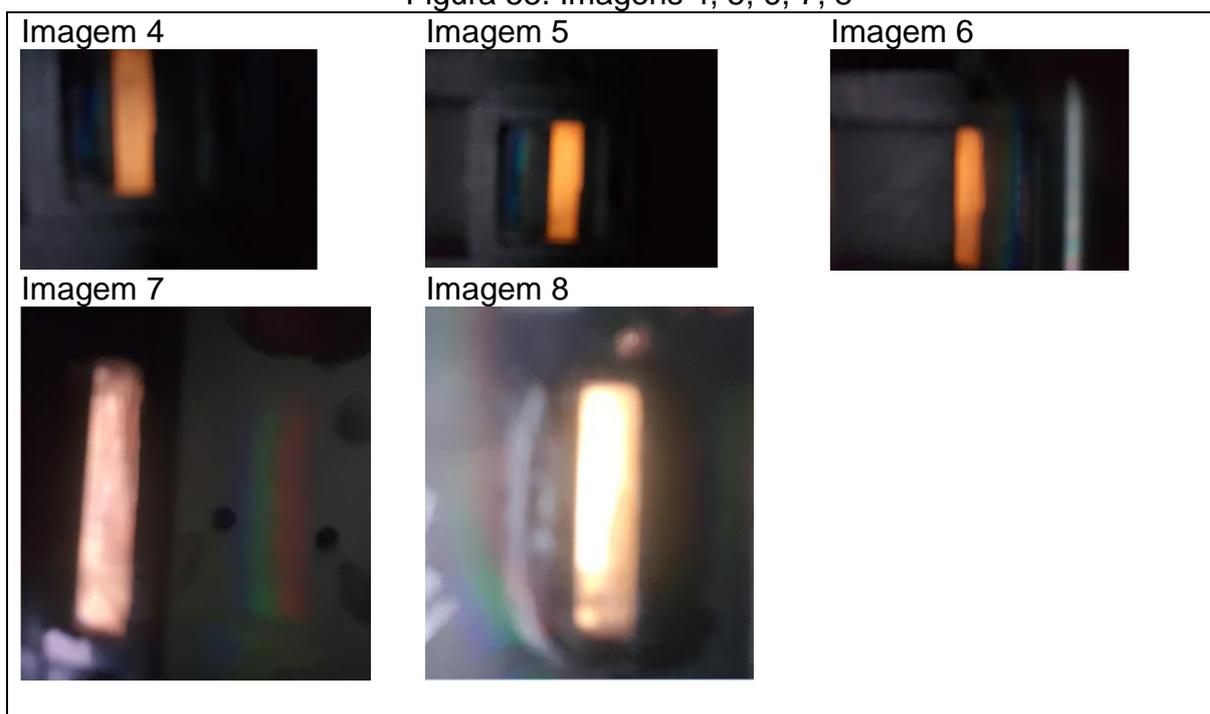


Fonte: Própria

Como já dito, foram realizadas inúmeras tentativas na busca de se observar o efeito da dispersão da luz, na sequência de imagens da Figura 55, apresenta-se alguns falsos resultados. Por exemplo, na imagem 4, foi percebido o espalhamento,

mas não é provocado pela luz refletida pelo *biochip*, neste caso, com a rede de difração afastada 2,5 cm da câmera, o espalhamento é provocado pela dispersão por reflexão, ou seja, da luz que vem diretamente da tela do celular sem passar pelo *biochip* se reflete na rede de difração; a imagem 5 diferencia-se da imagem 4 pelo fato de o afastamento ser de 3,2 cm. Na imagem 6, com *biochip* afastado o máximo possível, é feito um deslocamento horizontal da rede de difração (posição do CD), ocorre um espalhamento no lado oposto (à direita), mas também é provocado pela luz que sai diretamente do celular sem passar pelo *biochip*. Nas imagens 7 e 8 com CD (rede de difração) justaposto a câmera, o espalhamento é obtido por interferência de luz refletida com origem em ambiente externo ao sistema.

Figura 55. Imagens 4, 5, 6, 7, 8



Fonte: Própria.

Na Figura 56, apresenta-se resultados de espalhamento obtidos usando como fonte de luz da lanterna de um segundo celular (Imagem 9 e 10) e de uma caneta lanterna sob o *biochip* (Imagem 11), demonstrando que é possível sim obter a dispersão da luz com o *biochip* PPBIO.

A imagem 9 corresponde a fotografia tirada por um terceiro celular, nessa imagem, à direita se vê o *biochip* em sua estrutura sobre a fonte de luz, que é a lanterna traseira de um celular S5, do lado esquerdo se vê o outro celular com a rede de difração sobre a câmera que capta o sinal do *biochip* e o reproduz na sua tela. A imagem 10 é a própria imagem captada pelo celular.

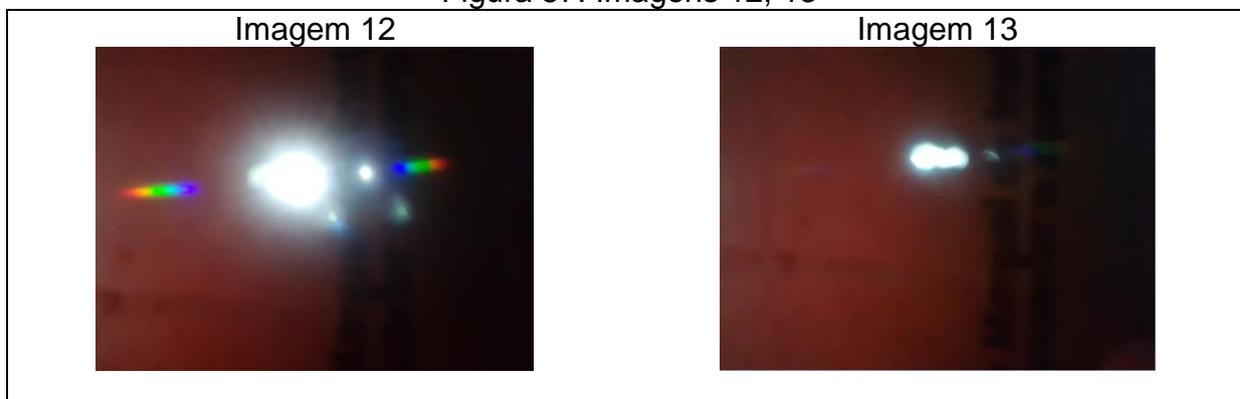
Figura 56. Imagens 9, 10, 11



Fonte: Própria.

A Figura 57 corresponde a um experimento realizado em um ambiente escuro (quarto fechado, à noite) com a luz do teto funcionando como fonte de luz. Foi utilizado um papelão como uma pequena fresta para se variar a intensidade luminosa que atravessava a rede de difração justaposta a câmera do *smartphone*. As duas imagens, 12 e 13, são similares, sendo que a imagem 12 tem um espalhamento mais denso, nítido em relação a imagem 13, provocado pela maior intensidade da fonte de luz (luz branca ao centro). Na imagem 13, percebe-se um leve (quase invisível) espalhamento devido a fonte de luz branca estar menos intensa.

Figura 57. Imagens 12, 13



Fonte: Própria.

Como apresentado uma das causas da não obtenção do resultado de espalhamento pode ser a intensidade luminosa na saída do *biochip*, mas há outras hipóteses: talvez os raios de luz de entrada no *biochip* não estejam suficientemente colimados, pode ser também a distância entre a rede de difração e a superfície fotodetectora da câmera, neste caso, o foco automático da câmera pode estar trabalhando contra o experimento.

Não se conseguiu um resultado satisfatório no uso de um pedaço de CD como rede de difração, o que inviabilizou o prosseguimento dos testes para se observar o modo WIM.

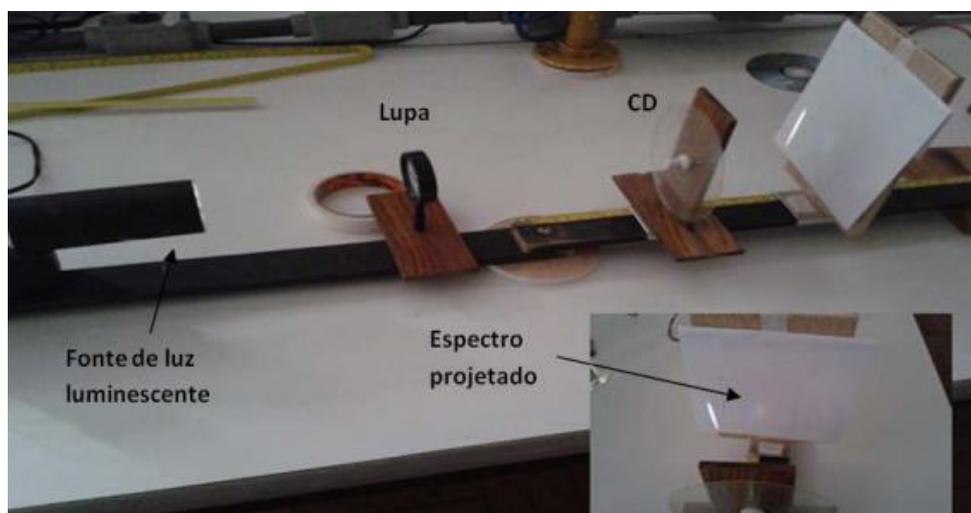
Nas

Figura 58 e Figura 59 estão apresentados duas estruturas referentes a experimentos relatados por Tavolaro e Cavalcante que promovem os resultados almejados no presente trabalho. Nesse sentido, são feitas algumas considerações: como se observa nas imagens dos experimentos, o espalhamento é projetado na tela/anteparo e não diretamente na câmera que muitas vezes tem foco automático; a distância do CD à tela é variada de forma a se conseguir uma melhor adequação de distância entre a fenda principal e o espectro colorido (de 1ª ordem); há uma lupa (lente convergente) para melhorar o foco da imagem projetada na tela, esta lupa é colocada entre a fonte e o CD.

No caso da Figura 59 ainda há um redutor de luminosidade na tela que tem a função de limitar essa luminosidade sobre a tela e melhorar a visualização das linhas espectrais de luz. Esse redutor de luminosidade é uma barreira/placa com um orifício no meio que deixa passar apenas um cone de luz. Inclusive, na

Figura 58, que não possui esta placa redutora de luminosidade, é apresentada na imagem um zoom com a indicação do ponto onde ocorrem as linhas espectrais devido à dificuldade de se identificar o espalhamento. Há montagens de experimento em que o redutor de luminosidade é criado não com um orifício, mas com uma fenda de espessura inferior a 1 mm. Segundo Westra (2007), a qualidade do espectro obtido depende da qualidade da fenda, se a fenda for muito larga, o espectro será difuso, e se for muito estreita, o espectro será muito tênue e indica que a abertura deve ser próxima de 0,2 mm, (WESTRA, 2007).

Figura 58. Estrutura montada para observação do espectro de uma lâmpada comercial branca, obtido por difração por transmissão e projetado no anteparo.



Fonte: (TAVOLARO et al., 2013)

Figura 59. Montagem utilizada para a observação da dispersão espectral, a lupa tem a função de dar maior nitidez as cores.



Fonte: Adaptada de (CAVALCANTE; TAVOLARO; HAAG, 2005)

Ante o exposto, infere-se que uma linha de prosseguimento na pesquisa para obtenção do WIM é limitar a largura do feixe de luz que entra no *biochip* por *software* ou através de uma barreira mecânica na entrada do *biochip* ou em sua saída. Há também a possibilidade de se colocar uma lente convergente (lupa) entre o *biochip* e a rede de difração, nesse caso deverá ser analisada a viabilidade física devido às dimensões envolvidas.

Uma outra possibilidade seria usar um prisma para decompor a luz branca. Esse prisma utiliza do fenômeno da refração. O inconveniente seria encontrar um prisma com dimensões minúsculas de forma a se adequar ao espaço disponível.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho foi idealizado e construído com o objetivo bem definido quer seja, fundir duas tecnologias que usam ressonância de plásmons de superfície criando uma solução alternativa, de baixo custo e portátil.

Souza Filho (2017) desenvolveu sistema embarcado em um *smartphone* que usa o *biochip* VIR que possui internamente elementos de acoplamento óptico de difração, dispensando-se o uso de elementos ópticos externos, trabalhando na configuração AIM. Moreira (2010) construiu o *Biochip* PPBIO, feito com polímero TOPAS COC prensado em uma forma de aço não tendo qualquer elemento eletrônico ou óptico interno; esse prisma em formato trapezoidal e estrutura simples se traduz em baixo custo, descartável, mas opostamente ao VIR, é dependente de lentes e outros elementos externos, o que por outro lado lhe dá mais versatilidade, pois opera na configuração AIM e WIM.

Inicialmente, foi realizado um levantamento bibliográfico com o intuito de estudar as tecnologias usadas pelos biossensores e em especial as baseadas em Ressonância de Plásmons de Superfície. Sobre esta, focou-se nos tipos, modos e condições de operação, a estrutura, vantagens e de desvantagens dos principais biossensores comerciais. Foi dada ênfase a artigos acadêmicos com soluções envolvendo o tema da portabilidade, uso de *smartphone*, baixo custo, biossensores com uso de Ressonância de Plásmons de Superfície.

Em segundo momento, passou-se a estudar especificamente as duas tecnologias para idealizar quais adaptações seriam necessárias para que as duas juntas pudessem funcionar, buscando sempre soluções simples. Foram confrontadas as duas plataformas, levando-se em conta as necessidades para o funcionamento nas duas configurações WIM e AIM.

Paralelamente, foram feitas simulações da curva SPR com MATLAB e simulações em aplicativo da web para visualizar a trajetória de raios que envolve reflexão e a refração da luz ao atravessar ambientes com índice de refração diferente.

As simulações em MATLAB da curva SPR possibilitaram a melhor compreensão do fenômeno SPR, consolidando o entendimento das principais variáveis de controle do fenômeno SPR, seja, o ângulo de ressonância em função da espessura da camada sensível, d_3 ou em função do seu índice de refração, n_3 . Esse processo é didático, pois, a aplicação dos conceitos produz um conhecimento organizado sobre o fenômeno SPR.

As simulações com estudo das trajetórias da luz nos processos de reflexão e refração foram primordiais para se entender a metodologia adotada no PPBIO no modo AIM. A solução adotada de incidir os raios de luz com vários ângulos ao mesmo tempo suprime a ausência de estrutura mecânica para variar o ângulo de incidência da luz. Esse estudo da trajetória dos raios é também fundamental para definir a distância e o alinhamento entre os componentes externos ao *biochip*. Verificou-se que o deslocamento da lente cilíndrica no sentido horizontal (para a direita ou esquerda) provoca uma assimetria no feixe de luz de saída, repercutindo nos resultados sobre o ângulo de ressonância. Por outro lado, o deslocamento da lente cilíndrica na vertical não afeta a simetria do feixe de saída, mas pode provocar uma menor ou maior precisão de resultados conforme esteja mais próxima ou afastada do *biochip*. Apesar da reflexão ocorrer na região do ponto central A, a largura do feixe de reflexão chega a 3,2 mm para o caso da distância da lente-*biochip* ser 4 mm.

De posse desse conhecimento debruçou-se no Autodesk Inventor para a criação da estrutura modular que mantivesse a versatilidade tendo em vista tratar-se de um primeiro protótipo que certamente teria que sofrer melhoramentos. A criação se traduziu em uma solução com a possibilidade de se fazer modificações com bandejas deslizantes para os componentes ópticos. Após os primeiros resultados satisfatórios optou-se por uma adaptação a versão, excluindo-se a bandeja para uso da lente colimadora e a fixação da estrutura através de uma capa para celular. Como não estava definida a distância da lente cilíndrica ao *biochip* fez-se três bases prevendo-se as distâncias de 4 mm, 5 mm, 6,2 mm entre o *biochip* e o smartphone.

Graças as facilidades que se tem hoje com impressão 3D, o processo envolvido na confecção, materialização da estrutura é relativamente simples, parte

foi realizada dentro do próprio IFPB, parte contratada diretamente junto a particulares.

Para o modo WIM usou-se uma seção de CD como rede de difração para verificar o espalhamento espectral (dispersão, decomposição da luz). Foram realizadas diversas tentativas obtendo-se vários resultados falsos positivos, após estudo pormenorizado estabeleceu-se possíveis soluções: 1. Implementar o redutor de luminosidade da tela, seja controlando via software a largura do feixe de entrada no *biochip*, seja com uma barreira mecânica (diafragma, como previsto originalmente) na entrada ou saída do *biochip*; 2. Colocar uma lente convergente (lupa) antes da rede de difração; 3. Usar um prisma no lugar da própria rede de difração.

O resultado apresentado no modo AIM foi obtido com 5 mm de afastamento da lente cilíndrica ao *biochip*, restando repetir os testes para as outras três distâncias possíveis (4 mm, 6,2 mm e 10,9 mm), a expectativa é que se confirme o obtido nas simulações. Os valores apresentados nas Figura 49 e Figura 50, foram obtidos diretamente via software, utilizando como técnica de minimização de ruído o valor médio, esse procedimento tem que ser aperfeiçoado. Os pontos de ressonância até o momento foram obtidos diretamente na imagem, medidos em pixel, apesar dos valores estarem dentro do esperado com o valor do hipoclorito (0.8479) um pouco acima da água (0.8211), é possível definir um método para se converter de pixel para ângulo, nesse caso a calibração será essencial. O caso da água é evidente que a lente esférica está desalinhada no eixo horizontal, pois, teoricamente seu ângulo de ressonância (sessenta e oito graus) deve ficar no centro da figura, por volta do pixel $3264/2 = 1632$, muito diferente do obtido, pixel 2348; chama atenção que o pixel do hipoclorito foi obtido no pixel 2326, ou seja, menor do que o da água. Isso pode ser explicado por que em experimentos reais há muito ruído, a busca direta pelo ponto mínimo da curva SPR é ineficiente, sendo necessário aplicação de técnicas de processamento de sinais para redução de erro como método do centroide, ajuste polinomial entre outros.

As simulações de trajetória dos raios no *biochip* possibilitaram definir a largura mínima que o canal da célula de fluxo, 3,2 mm, isso para o caso de absoluta precisão da lente esférica em relação ao eixo horizontal. Como verificou-se que

esses pequenos deslocamentos da lente provocam o desvio do ponto de reflexão para fora do ponto Central A, será necessário um canal ainda mais largo para a célula de fluxo. Dessa forma é possível implementar a célula de fluxo e verificar o efeito da resposta SPR à troca dinâmica de substâncias.

Embora o projeto não tenha alcançado completamente seu objetivo fica claro que a proposta é viável e está no caminho. Certamente em trabalhos futuros serão solucionadas as dificuldades em se implementar a configuração WIM. Vislumbra-se, em pesquisas futuras, uma plataforma que incorpore o *biochip* trapezoidal, PPBIO (Prisma Polimérico para aplicações Biológicas), à solução embarcada *smartphone*, o que possibilitará os testes para identificação de substâncias biológicas e químicas em tempo real, a baixo custo.

6. TRABALHOS FUTUROS

Como continuidade de pesquisa são apresentadas algumas propostas:

- Implementação da célula de fluxo, possibilitando o prosseguimento da pesquisa com análise de substâncias em tempo real.
- Continuidade de pesquisas no sentido de implementar o modo WIM.
- Repetir exaustivamente os experimentos no modo AIM, com as outras três distâncias possíveis: 4 mm, 6,2 mm, 10,9 mm a fim de estabelecer a melhor distância *biochip*/lente cilíndrica.
- Criar um algoritmo que converta o ângulo de ressonância de pixel para graus.
- Para fins comparativos, repetir os experimentos realizados no desenvolvimento do *biochip* PPBIO por Moreira (2010) e da solução embarcada de Souza Filho (2017).
- Validar a tecnologia com substâncias que tenham impacto no meio científico como o glifosato e do patógeno da doença da *Leishmaniose*.

7. PUBLICAÇÕES DURANTE O MESTRADO

Durante o desenvolvimento deste trabalho de mestrado foram escritos três artigos submetido à apresentação e publicação em congressos de nível internacional, sendo todos aceitos. Por falta de recursos o referente ao 26º congresso de materiais avançados não chegou a ser apresentado. As demais publicações não são fruto da pesquisa direta, mas de pesquisas correlacionadas.

- *26ª Advanced Materials Congress (AMC)*, que aconteceria entre os dias 10 e 13 de junho de 2019, na cidade de Estocolmo na Suécia. Trabalho submetido na modalidade de pôster, com o título “*A Smartphone-Based SPR Biosensor Device Using Low Cost Biochip*”.

- *21ª International Conference on Chemical Sensors (ICCS)*, que aconteceu entre os dias 06 e 07 de junho de 2019, na cidade de São Francisco nos Estados Unidos. Submetido na modalidade de pôster, com o título “*Study of the Application of a Portable Multi-analytical Biosensitizing System for the Detection of the Herbicide Glyphosate*”.

- *Sensors Applications Symposium 2019 (SAS)*, que aconteceu entre os dias 11 e 13 de março de 2019, em Sophia Antipolis na França. Submetido na modalidade de pôster, com o título “*Application of a Smartphone-based SPR platform for Glyphosate detection*”.

8. REFERÊNCIAS

BARRETO NETO, A. G. S. et al. Studying molecular diffusivity by using SPR spectrometry: experiment and simulations. **First Bio-sensing Technology Conference**, 2009.

BIOSENSORS Conference. Disponível em: <<http://medicalbiosensors.com/>>. Acesso em: 21 dez. 2018.

BREMER, K. et al. **Optical SPR sensor designed for smartphones**. 2017 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe & European Quantum Electronics Conference (CLEO/Europe-EQEC). **Anais...IEEE**, jun. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/8087218/>>

CALABRIA, D. et al. Smartphone-based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 94, n. December 2016, p. 124–130, 2017.

CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. DA. Biossensores : estrutura, funcionamento e aplicabilidade. p. 1–20, [s.d.].

CAVALCANTE, M. A.; TAVOLARO, C. R. C.; HAAG, R. **Espectros e modelos atômicos**. Disponível em: <<http://www1.fisica.org.br/fne/phocadownload/Vol06-Num1/exper-fis-mod1.pdf>>. Acesso em: 23 maio. 2019.

CENNAME, N. et al. A complete optical sensor system based on a POF-SPR platform and a thermo-stabilized flow cell for biochemical applications. **Sensors, Scifed**, v. 16, p. 196, 2016.

DOST, J. Surface plasmon resonance sensor based on an array of diffraction gratings for highly parallelized observation of biomolecular interactions. v. 129, p. 303–310, 2008.

E-DISCIPLINAS da Usp. **Difração e Interferência: perguntas conceituais**. Disponível em: <<https://edisciplinas.usp.br/mod/page/view.php?id=621300>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

EO Edmund Optics Worldwide. Disponível em: <<https://www.edmundoptics.eu/resources/frequently-asked-questions/optics/optical-lenses/what-is-the-difference-between-the-effective-focal-length-and-the-back-focal-length/>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

GENG, Z. et al. Recent Progress in Optical Biosensors Based on Smartphone Platforms. p. 1–19, 2017.

GOVÊA, T. S. **OBTENÇÃO DE IMAGENS ATRAVÉS DA DIFRAÇÃO DA LUZ POR CDS**. Campinas-SP.: [s.n.].

HOMOLA, J. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. **Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors**, v. 4, 2006.

HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators, ELSEVIER**, v. 54, p. 3–15, 1999.

HU, J.; ZHAO, X. An improved centroid algorithm for a surface plasmon resonance bioanalyzer using microprocessors. **Symposium on Photonics and Optoelectronics**, p. 25–28, 2009.

KIRSCH, J. et al. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and Medicine. **The Royal Society of Chemistry**, p. 36, 2013.

KUBOTA, L. T. **Biossensores: de tão simples e baratos, as pessoas desconfiam**. Campinas-SP. Jornal da Unicamp, , 2003.

LIEDBERG, B; NYLANDER, C; LUNSTROM, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 4, p. 299–304, 1983.

LIU, Y. et al. Surface Plasmon Resonance Biosensor Based on Smartphone Platforms. **Nature Publishing Group**, n. 10.1038/srep12864, p. 1–9, 2015.

MAXIMINO, F. L. **Caracterização de Plasmons de Superfície em filmes de metais nobres através de tunelamento ótico**. São Paulo: 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, 2011.

MAZULQUIM, D. B. **Projeto e fabricação de nanoestruturas plasmônicas para aplicações em óptica difrativa**. São Paulo: 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. **Compendium of Chemical Terminology Gold Book**. IUPAC. 2nd. ed. Oxford: Publications, Blackwell Scientific, 1997.

MOREIRA, C. DA S. **Projeto e realização de um biochip óptico para aplicações biológicas baseado no princípio de ressonância de plásmons de superfície**. Campina Grande: 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

MOREIRA, C. DA S.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Influence of temperature effects on sensitivity of surface plasmon resonance sensors, Instrumentation and Measurement. **Technology Conference Proceedings**, p. 170–175, 2008a.

MOREIRA, C. S. et al. Temperature dependent sensitivity of Interface, surface plasmon resonance sensors at the gold-water Interface. **Sensors and Actuators B**, v. 134, p. 854- 862, 2008.

MOREIRA, C. S. et al. Exchangeable Low Cost Polymer Biosensor Chip for Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. **EUROSENSORS 2009, Procedia Chemistry**., v. 1, 20, 2009.

MOREIRA, C. S. et al. Biossensores : Tecnologia e Aplicações. p. 1–18, 2010a.

MOREIRA, C. S. et al. A disposable, low cost prism-based surface plasmon resonance (SPR) biosensor 2010. **World Congress on Biosensors**, 2010b.

MOREIRA, C. S.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Sistema Reconfigurável para Monitoramento de Temperatura Baseado na Ressonância de Plásmons de Superfície,. **Congresso Brasileiro de Automática**, 2008b.

MOREIRA, L. F. **Caracterização e montagem de um Sensor de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR)**. Campinas: 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, Universidade Estadual de Campinas, 2016.

NEFF, H.; ZONG, W.; BORRE, A. M. N. L. M.; HOLZHÜTER, G. Optical properties and instrumental performance of thin gold films near the surface plasmon resonance. **Thin Solid Films**, v. 496, N° 2, p. 688–697, 2006.

OLIVEIRA, A E F; PEREIRA, A. C. **Biossensores e a industria alimentar**, 2016. Disponível em: <<http://qnint.s bq.org.br/novo/index.php?hash=tema.97> acessado em 09/07/2016>

PILIARIK, M.; HOMOLA, J. SPR Sensor Instrumentation. **Institute of Radio Engineering and Electronics, Prague, Czech Republic**, p. 95–116, 2006.

RAETHER, H. Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings. **Berlin, Germany; Springer Tracts in Modern Physics**, p. 111, 1988.

RAY Optics Simulation. Disponível em: <<https://ricktu288.github.io/ray-optics/simulator/>>. Acesso em: 23 dez. 2018.

REFRACTIVE index database. **RefractiveIndex.INFO**. Disponível em: <<https://refractiveindex.info>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

RITCHIE, R. H. Plasma losses by fast electrons in thin films. **Physics Review.**, v. 106, p. 874-881, 1957.

ROCHA, D. P. DA; SANTOS, G. K. M. DOS. **Espectroscopia para o Ensino Médio – uma aplicação da Física Moderna**. Teresina: [s.n.].

SANTIAGO, M. F. DA S. **Análise Numérica e Caracterização de Fibras de Cristais Fotônicos para Aplicação em Sensores e Biossensores Baseadas em Ressonância de Plásmos de Superfície**. João Pessoa: 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Instituto Federal da Paraíba, 2018.

SCHASFOORT, R. B. M.; TUDOS, A. J. Handbook of surface plasmon resonance. **Cambridge: RCS Publishing**, 2008.

SHARMA, A. K.; JHA, R.; GUPTA, B. D. Fiber-Optic Sensors Based on Surface Plasmon Resonance : A Comprehensive Review. v. 7, n. 8, p. 1118–1129, 2007.

SILVA, M. L. F. DA. **Estudo e Desenvolvimento de Sensor em Fibra Óptica Polimérica Baseada na Ressonância de Plásmos de Superfície**. João Pessoa: 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Instituto Federal da Paraíba, 2017.

SOUZA FILHO, C. A. **Desenvolvimento de um Sistema Eletrônico de Aquisição e Processamento para Biossensores**. Campina Grande: 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Campina Grande, 2006.

SOUZA FILHO, C. A. **Contribuição ao Projeto de Sistemas Multianalíticos Baseados em Ressonância de Plasmons de Superfície**. Campina Grande: 2017.

Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Campina Grande, 2017.

SOUZA FILHO, C. A.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Smartphone based , portable optical biosensor utilizing surface plasmon resonance. **IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC) Proceedings**, 2014.

TAVOLARO, C. R. C. et al. INSTRUMENTAÇÃO PARA O ENSINO DE FÍSICA MODERNA : UM KIT DE BAIXO CUSTO PARA ESPECTROSCOPIA. p. 1–8, 2013.

TERRA. **diabetes causa uma morte a cada dez segundos em todo o mundo**. Disponível em: <<https://www.terra.com.br/vida-e-estilo/saude/doencas-e-tratamentos/diabetes-causa-uma-morte-a-cada-dez-segundos-em-todo-o-mundo>>. Acesso em: 22 dez. 2018.

THIRSTRUP, C.; ZONG, W.; NEFF, H. Surface plasmon resonance sensor. **Patent Application Publication**, v. v. 0018194, 2005.

THIRSTRUP, C. et al. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. v. 100, p. 298–308, 2004.

THORLABS.COM. **NOTES/SPECIFICATIONS: Lens LJ1638L1-C**, 2015. Disponível em: <www.thorlabs.com>

TUMOLO, T. C. **Desenvolvimento de biosensores de membranas e caracterização da interação entre citocromo C e bicamadas híbridas por Ressonância Plasmônica de Superfície**. São Paulo: 2008. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2008.

TURBADAR, T. Complete absorption of light by thin metal films. **Proceedings of the Physical Society**, v. v. 73, n., p. 40, 1959.

WANG, L. J. et al. A multichannel smartphone optical biosensor for high-throughput point-of-care diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 686–692, 2017.

WESTRA, M. T. **A fresh look at light : build your own spectrometer**. Disponível em: <<https://www.scienceinschool.org/pt/2007/issue4/spectrometer>>. Acesso em: 23 maio. 2019.

WOOD, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. **Proceedings of the Physical Society of London.**, v. 18, p. 7, 1902.

ZHANG, D.; LIU, Q. Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 273–284, 2016.