

S³PR: um sensor SPR portátil baseado no chip Spreeta™ e microcontrolador Singleboard (SBM)

Nickson Saymon de Oliveira Lopes ^[1] e Leiva Casemiro Oliveira ^[2]

^[1] UFERSA; nickonsaymon@gmail.com

^[2] UFERSA; leiva.casemiro@ufersa.edu.br

Resumo: O efeito da Ressonância de Plasmons de Superfície (SPR, sigla em inglês para Surface Plasmon Resonance) é um fenômeno óptico-elétrico de muita importância para a área dos biossensores, pois permite mensurar reações bioquímicas de forma rápida e precisa. Tipicamente o fenômeno SPR ocorre quando se ilumina uma interface metal/dielétrico em condições específicas de modo que a energia dos fótons é absorvida pelos plasmons de superfície gerando um campo evanescente bastante sensível a alterações no índice de refração nessa interface. Diante do exposto, o presente trabalho se dispôs a desenvolver uma instrumentação capaz de operar o biochip Spreeta, possibilitando assim a análise de substâncias líquidas através de sua curva SPR, além de permitir o rastreamento de seus parâmetros morfológicos em tempo real (sensograma). O protótipo é composto por partes mecânicas, eletrônicas e fluidicas. A parte estrutural foi desenvolvida através de uma impressora 3D para encapsular a placa Arduino Mega 2560, o display touchscreen Nextion, a bomba peristáltica e os demais componentes. Para a validação da instrumentação, foram obtidas as curvas SPR de uma amostra de água deionizada e de uma amostra de hipoclorito de sódio, como também foi adquirida a curva sensograma das mesmas amostras.

Palavras-chave: Ressonância de Plasmons de Superfície; Spreeta; Arduino; Sensor óptico portátil.

Abstract: The Surface Plasmon Resonance (SPR) is an important optical-electrical phenomenon for the biosensor & bioelectronic field due to its capability of real-time measure of biochemical interaction with high sensibility. Typically, the SPR occurs when a metal/dielectric interface is illuminated in very specific conditions, so that the incoming photons energy are absorbed by the surface plasmons generating an evanescent field very sensitive to changes in the refractive index at this interface. In view of the above, the present work aimed to develop an instrumentation capable of operating the Spreeta biochip, thereby enabling the analysis of liquid substances through its SPR curve, as well as allowing real-time tracking of its morphological parameters (sensogram). The prototype consists of mechanical, electronic and fluidic parts. The structural part was developed using a 3D printer to encapsulate the Arduino Mega 2560 board, the Nextion touchscreen display, the peristaltic pump and the other components. To validate the instrumentation, the SPR curves of a deionized water sample and a sodium hypochlorite sample were obtained, as well as the sensogram curve of the same samples.

Key-words: Surface Plasmon Resonance; Spreeta; Arduino; Portable optical sensor.

1. INTRODUÇÃO

A Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*) é um fenômeno óptico-elétrico científica e tecnologicamente atrativo para o desenvolvimento de (bio)sensores, uma vez que permite observar/medir reações bioquímicas de forma rápida e precisa através do índice de refração de soluções aquosas ou gasosas. Tipicamente, a excitação SPR acontece ao iluminar uma interface metal/dielétrico em condições bastante específicas, na qual ocorra a interação ressonante (acoplamento óptico) entre os fótons da luz incidente e os plasmons de superfície do metal. O meio metálico, em geral, são filmes nanométricos de ouro ou prata e o meio dielétrico são soluções aquosas ou gasosas.

Os sensores baseados no efeito SPR tem uma ampla gama de aplicações podendo ser citadas aplicações biológicas e/ou clínicas como no estudo de cinéticas de adsorção-dessorção, interações antígeno-anticorpo, proteína-ligante, receptor-ligante, proteína-DNA, DNA-DNA, RNA-RNA entre outros [1]. Podem ainda ser empregados para detectar adulterações em alimentos [2-4] e mensurar a qualidade da água [5,6], como também em aplicações físicas como no estudo e caracterização das propriedades dielétricas de filmes metálicos [1].

O uso do fenômeno SPR para o desenvolvimento de sensores ópticos portáteis foi impulsionado pelo surgimento de soluções de *hardware* miniaturizadas com elevado poder de processamento. Sabendo da relevância desses dispositivos, no início dos anos 2000 a Texas Instruments™ lançou o biochip Spreeta® o qual já dispõe de todo aparato necessário para o funcionamento de um sensor SPR, ou seja, laser, grade de difração, prisma, filme fino de ouro e um *array* de fotodiodos de 128 pixels. Ele apresenta uma tensão de

operação igual a 5V além de poder medir substâncias aquosa com índice de refração entre 1,320 e 1,368 com uma resolução de 5×10^{-6} [7].

Devido a sua versatilidade, facilidade operacional e portabilidade, inúmeros trabalhos fizeram o seu uso. Por exemplo, o Spreeta foi utilizado para detectar agentes patógenos, no caso a *Escherichia Colia* enterotoxina (LT) termolábil, responsável pela diarreia do viajante e seu análogo receptor, o gangliosídeo GM [8]. Ele foi ainda testado em um ensaio IgG de camundongo [9], na medição da concentração de albumina sérica humana (HSA) na urina [10]. Foi utilizado ainda para a detecção de produtos químicos desreguladores endócrinos (EDCs) através de ensaios de inibição da proteína de transporte de tiroxina para desreguladores endócrinos da tireoide [11]. Cabe ainda mencionar um outro trabalho que demonstrou a viabilidade do seu uso em imunensaio de inibição da κ -caseína bovina a fim de detectar adulterações em leite de ovelhas e cabra, bem como na detecção de soro de coalho bovino em pó em leite em pó [12].

Desse modo, sabendo da qualidade do sensor e motivado pela inexistência de soluções comerciais para a sua operação, pois o sensor foi descontinuado pelo fabricante há mais de uma década, o presente trabalho tem por objetivo a construção de uma instrumentação para a sua operação, fazendo o uso de um microcontrolador *single-board* (SBM, sigla em inglês para *Single-Board Microcontroller*) destinado a aquisição, processamento, exibição e armazenamento dos dados SPR. O dispositivo proposto apresenta instrumentação compacta, constituída de uma estrutura mecânica especialmente projetada para a acomodação de todos os elementos ópticos, eletrônicos e fluidos. Associada a essa estrutura, foi implementado um *software* embarcado, o qual apresenta interface gráfica amigável para realização de todas as tarefas envolvidas na sua operação.

2. CURVAS SPR

Em geral, na condição de ressonância, parte da energia dos fótons é absorvida pelos plasmons de superfície do metal, gerando um campo evanescente, muito sensível a qualquer alteração nessa interface. Tal característica pode ser empregada para monitorar eventos biológicos em substâncias líquidas e/ou gasosas, conforme ilustrado pela Figura 1 (a). A alteração no índice de refração do meio ao longo do comprimento do filme (Figura 1 (c)) pode ser observada por meio de mudanças na posição de ressonância (Figura 1 (d)) indicada pela denominada Curva SPR, a qual serve para caracterizar a amostra [12]. A Figura 1 (b) ilustra uma curva SPR típica.

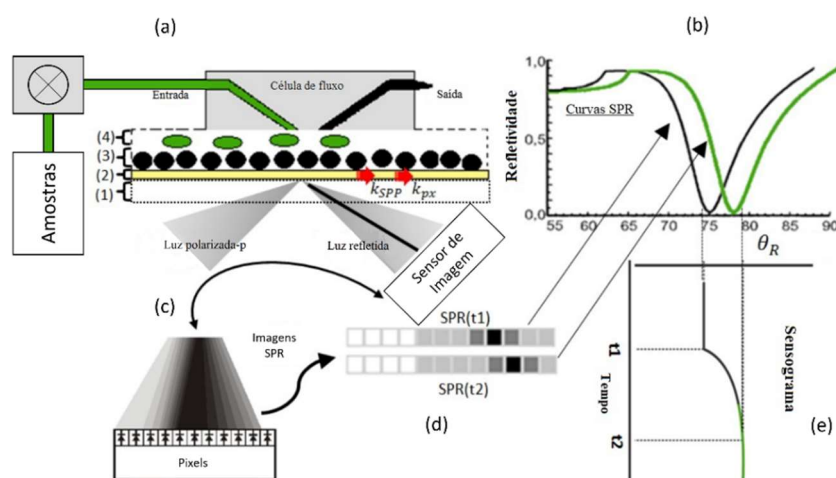


FIGURA 1. Visão esquemática de funcionamento de sensor SPR: (a) Elementos constitutivos de um sensor SPR: tipicamente bomba, recipiente(s) com a(s) amostra(s), célula de fluxo, interface metal-dielétrico e fotossensor; (b) Curva(s) SPR da(s) amostra(s) juntamente com o seu deslocamento; (c) Variação da intensidade da luz ao longo do comprimento do sensor; (d) Variação da posição do pixel de menor intensidade, utilizada para caracterizar a(s) amostra(s); (e) Curva sensograma demonstrando a variação da substância analisada (adaptado de [13]).

Ao monitorar a posição do mínimo da curva ao longo do tempo é possível obter a curva sensograma de um processo químico e ou biológico, ou seja, é possível acompanhar o desenlace de uma reação química ou de um processo biológico ao longo do tempo, possibilitando desse modo a caracterização de uma amostra ou de um determinado processo [4]. Um exemplo dessa curva pode ser visualizado através da Figura 1 (e).

2.1 Sensor Spreeta

O sensor Spreeta, cujo modelo é o TSPR1A170100 fabricado pela Texas InstrumentsTM apresenta em seu interior todos os aparatos necessários para excitar o fenômeno SPR, que são: uma fonte de luz (led infravermelho), uma grade de difração para polarizar a luz, um prisma junto com a interface de ouro, um espelho para redirecionar a luz para um array de fotodiodos, o qual possui 128 pixels de comprimento [7]. A

configuração interna do sensor é ilustrada através da Figura 2 (a) juntamente com uma foto real do mesmo, conforme Figura 2 (b).



FIGURA 2. (a) Visão interna do sensor Spreeta. Nela é possível observar seus elementos constitutivos [9]; (b) Visão real do sensor (autoria própria).

O dispositivo em questão dispõe de 16 pinos no padrão DIP 16, apesar de que nem todos tenham função. Segundo dados de seu *datasheet*, os seus pinos têm as seguintes configurações: os pinos 11 e 6 são destinados a alimentação do sensor, sendo eles o V_{DD} e o GND respectivamente; os pinos 15 e 16 são ânodo e cátodo do led, nessa sequência; os pinos 7 e/ou 8 são a saída de dados do registrador de deslocamento; o pino 5 é a entrada dos pulsos de *clock* e o pino 13 é a entrada dos pulsos de *start* do mesmo registrador. Existem ainda os pinos 3 (SDA) e 14 (SCL), os quais permitem ter acesso a memória EEPROM (sigla do inglês de *Electrically-Erasable Programmable Read-Only Memory*) interna através do protocolo I²C, porém eles não foram utilizados, pois essa memória serve apenas para armazenar informações de fábrica do sensor, como por exemplo o nome do modelo. A Figura 3, apresenta todos os pinos juntamente com seus blocos.

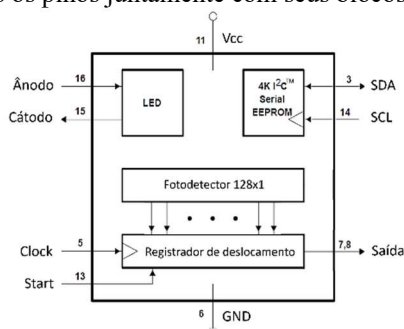


FIGURA 3. Configuração dos pinos e blocos do sensor (adaptado de [7]).

Para a operação do sensor é necessário, além da sua correta alimentação a elaboração de 3 tipos de sinais: i) um sinal de *clock*; ii) um pulso de *start* e iii) um sinal para controlar o led, embora este último não necessite ser mantido acionado durante toda o ciclo de aquisição de dados.

Para iniciar o ciclo de medição é preciso inserir um pulso de *start*, que não pode ser desativado antes do primeiro pulso de *clock*. Depois disso é iniciado a saída dos dados no pino *Output*. Depois do 18º pulso de *clock* o ciclo de medição começa até chegar o 129º pulso de *clock*. Dois pulsos de *clock* adicionais são necessários para encerrar o ciclo de medição, até um novo pulso de *start* ser inserido. Esse pulso dá início a um novo ciclo de medição repetindo assim todo esse processo. A Figura 4 resume todas essas etapas através das formas de ondas dos sinais necessários para o funcionamento do Spreeta.

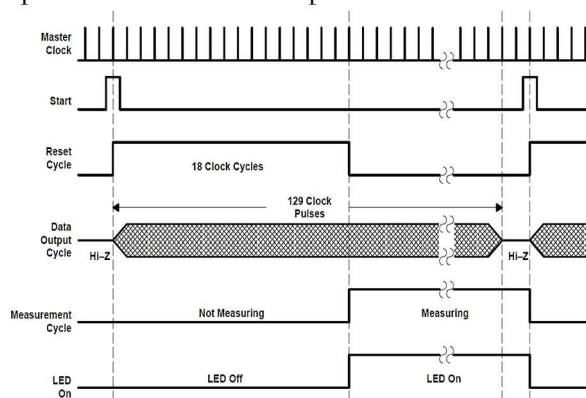


FIGURA 4. Formas de onda dos sinais exigidos para o correto funcionamento do sensor. Cabe destacar os ciclos envolvidos durante a operação [7].

3. PROJETO DO SENSOR S³PR

A instrumentação proposta foi denominada de S³PR, resultado da junção das 3 letras iniciais das palavras: SBM, Spreeta e SPR. O sensor S³PR pode ser subdividido em 3 partes: as estruturas mecânicas responsáveis por suportar e conter os dispositivos embarcados; o SBM dedicado a controlar o Spreeta e realizar todas as tarefas necessárias para a obtenção da resposta SPR e/ou sensograma; e por fim os *softwares* embarcados para o funcionamento de toda a eletrônica interna.

3.1 Modelagem da estrutura mecânica

Para conferir uma maior portabilidade ao sistema além de comportar todos os subsistemas em um mesmo lugar (bomba peristáltica, célula de fluxo e partes eletrônicas), uma estrutura mecânica foi modelada em 3D através do *software* Fusion 360® da Autodesk, Inc.

A estrutura também pode ser dividida em 3 grandes áreas. Uma dedicada a comportar o *display* (detalhe A), outra dedicada a conter o sensor e a parte fluidica (detalhe B) e pôr fim a que contém as partes lógica e de potência (detalha C) como apresentada pela Figura 5.

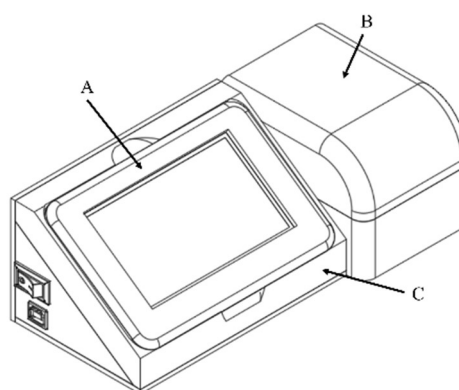


FIGURA 5. Visão geral da estrutura projetada com as suas subdivisões (autoria própria).

As áreas lógicas e do sensor podem ser visualizadas em detalhes por intermédio da Figura 6. Na área lógica e de potência estão presentes a chave ON/OFF (detalhe A), a entrada *Universal Serial Bus* – USB (detalhe B) da placa Arduino (detalhe C) visando facilitar a atualização do *software* embarcado. O módulo *bluetooth* HC-05 (detalhe D) para exportar os dados adquiridos, entrada de alimentação da fonte 12V (detalhe G), chave de seleção para modo de programação (detalhe H) e furo para conter o dissipador de calor do regulador de tensão 5V (LM 7805) não representado na figura (detalhe K). A área dedicada ao sensor contém uma minibomba peristáltica de 12V modelo WRS-385SA-14156 (detalhe E) e a case do sensor Spreeta (detalhe F).

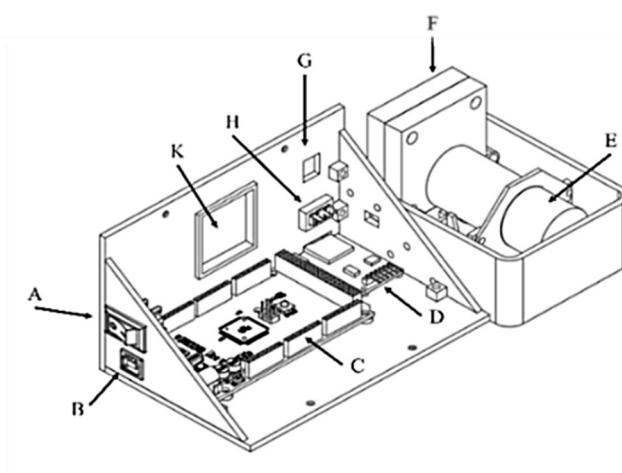


FIGURA 6. Visão interna da instrumentação proposta (autoria própria).

Por fim, também foram modelados uma case para o sensor juntamente com a célula de fluxo. Para a case, foi pensado uma estrutura que envolvesse o sensor e ainda permitisse o acesso ao *chip* SPR. Logo essa parte foi elaborada em duas partes, unidas através de parafusos. As Figuras 7 (a) e (b) ilustram o modelo elaborado junto das suas dimensões (Figuras 7 (c) e (d)).

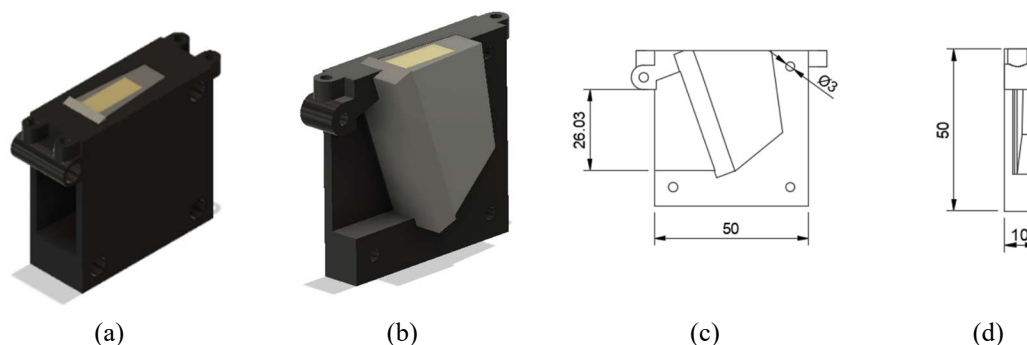


FIGURA 7. (a) Visão da case envolvendo o sensor; (b) Visão de uma das partes da case envolvendo o Spreeta; (c) Vistas lateral da case com as suas medidas; (d) Vista superior de uma parte da case acrescidas de suas dimensões (autoria própria).

Já a célula de fluxo, foi projetada com a finalidade de permitir o contato entre a substância a ser analisada e o sensor, logo dois canais laterais ligados a furos na superfície foram projetados para atender essa demanda. Para garantir uma boa vedação entre os elementos, um par de *orings* foram utilizados. Por fim, foi necessário a colocação de uma pequena cava na célula de fluxo, objetivando o encaixe da borda do sensor, garantindo assim a sua sobreposição e fixação diretamente na case do sensor através de parafusos. Além disso o volume interno da célula de fluxo foi estimado em aproximadamente $9,2\mu\text{L}$. A Figura 8 (a) apresenta o conceito da célula de fluxo e seus elementos e a Figura 8 (b) ilustra a montagem final do conjunto célula de fluxo e case do sensor.



FIGURA 8. Modelos 3D da célula de fluxo. (a) Visão geral do modelo e seus elementos constitutivos. Com destaque a entrada e saída do fluido através de entradas laterais; (b) Conjunto célula de fluxo e case do sensor (autoria própria).

3.2 SBM

Para que o sensor pudesse funcionar de maneira satisfatória foi utilizado uma placa Arduino Mega 2560 que dispõe internamente de um microcontrolador Atmega 2560 para poder realizar o processamento digital dos dados adquiridos, como também gerar os sinais necessários para o controle do sensor e o controle do *display*, da bomba peristáltica e do módulo *bluetooth*. A escolha desse microcontrolador foi motivada em primeiro lugar pela sua boa capacidade de memória FLASH além de suas vantagens, como já dispor internamente de comunicação via USB, facilitando assim a sua programação. Um outro fator preponderante para a sua escolha reside no fato de que a placa já dispõe internamente de todos os circuitos necessários para o correto funcionamento do microcontrolador, como reguladores de tensão e circuitos osciladores. O outro fator motivador da escolha desse SBM reside no seu histórico de emprego em dois trabalhos anteriores visando a mesma finalidade, conforme apresentado em [14, 15].

3.3 Software embarcado do S³PR

Para o funcionamento da instrumentação um *software* destinado ao comando e controle foi escrito em linguagem Wiring, através do Ambiente de Desenvolvimento Integrado – IDE (do inglês, *Integrated Development Environment*) própria do Arduino.

Como mencionado anteriormente, para o correto funcionamento do sensor Spreeta é necessário a utilização de uma série de sinais, em especial os 128 pulsos de *clock* e o pulso de *Star/Stop*. Esses sinais são importantes pois permitem limpar o registrador de deslocamento interno do Spreeta, responsável por armazenar os dados obtidos no ciclo de medição anterior além de sinalizar para o mesmo o início de um novo ciclo. Desse modo, o código escrito gerou esses pulsos através da saída digital do microcontrolador.

Um outro ponto importante implementado no código foi a possibilidade de exportar os dados adquiridos através de um módulo *bluetooth*. Juntamente a isso, foi ainda implementado a capacidade de controlar uma

bomba peristáltica CC destina a operação da célula de fluxo, através do método PWM (*Pulse Width Modulation*, em português Modulação por Largura de Pulsos).

Além das capacidades já mencionadas, os sinais gerados pelo sensor estão sujeitos a ruídos. Uma forma de amenizar esse problema é através da aquisição de um sinal de referência, proveniente do sensor quando ele está vazio. A partir desses dados é efetuado a divisão do sinal atual, proveniente da amostra presente na célula de fluxo, pelo sinal de referência, para geração da curva SPR, conforme (1) [16].

$$SPR_{sinal} = \frac{Sinal_{atual}}{Sinal_{ref}} \quad (1)$$

Apesar da divisão do sinal de referência pelo sinal atual reduzir em parte o problema do ruído, foi confeccionado um conjunto de filtros digitais como de média móvel e mediana destinados a suavizar e melhorar os sinais adquiridos. O filtro de média móvel consiste em calcular a média a partir de 5 pontos do sinal. O primeiro dado é substituído pelo valor médio e o processo é repetido até o término os 128 pixels. Já o filtro de mediana tem um funcionamento semelhante, porém ao invés de determinar a trocar dos valores do sinal pela média ele o faz por intermédio da mediana do intervalo.

Também foi idealizado uma rotina dedicada ao rastreo dos pontos de mínimo da curva SPR e a sua localização. Apesar do método da procura do menor valor, junto da sua localização ser de fácil elaboração, essa técnica não se mostrou muito útil, pois seus valores sofrem uma grande variação, não permitindo assim grande precisão e repetitividade. Sendo assim, essa técnica foi substituída pelo método do centroide. Esse método funciona calculando o centroide da curva dada por (2) [16].

$$C = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i(t) - L_b) i}{\sum_{i=1}^n (x_i(t) - L_b)} \quad (2)$$

onde C é a posição do centroide, L_b é a linha de base, ou seja, é uma linha de referência a qual o centroide é calculado e $x_i(t)$ é o valor do i-ésimo pixels.

É importante mencionar que apesar das rotinas elaboradas para detecção do ponto mínimo da curva SPR se mostrarem eficientes elas não podiam ser apenas adicionadas ao código principal, pois haveria conflito no processamento, pois o microcontrolador só dispõe de um único processador, logo as rotinas iriam se sobrepor e o código iria ora funcionar ora não. Para solucionar essa problemática foi escrita uma rotina através da utilização de máquinas de estados. Essa técnica consiste em dividir o tempo de processamento em múltiplos processos de forma sequencial. A Figura 9 resume em um fluxograma o *software* proposto.

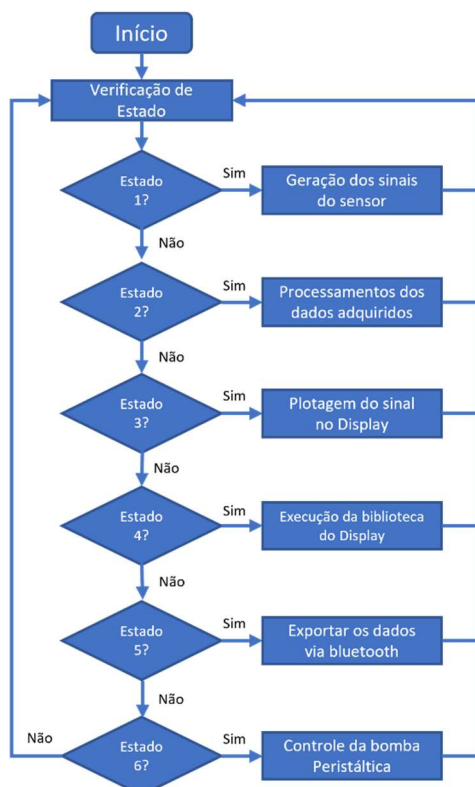


FIGURA 9. Fluxograma do código elaborado (autoria própria).

4. PROTÓTIPO DO SENSOR S³PR

A estrutura mecânica do S³PR foi confeccionada através de uma Creality Ender 3®, usando filamentos de PLA (Ácido Polilático), em um processo de Modelagem por Fusão e Deposição de material - FDM, popularmente conhecida como impressora 3D. O resultado das impressões pode ser visualizado por intermédio das Figura 10 (a) e 10 (b).

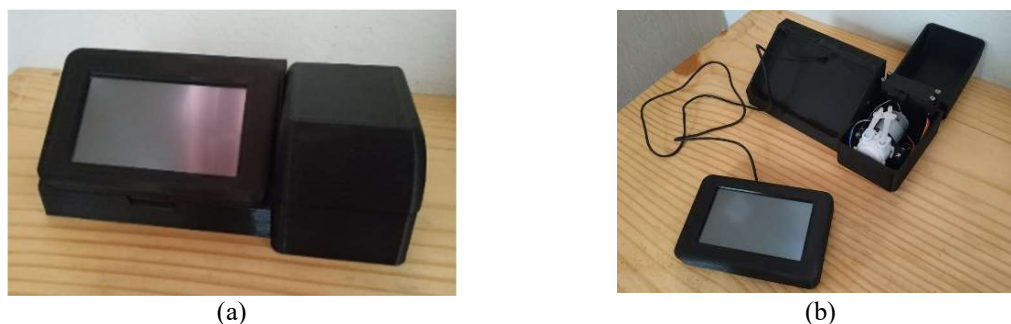


FIGURA 10. (a) Case do sensor e da célula de fluxo impressa em PLA; (b) Visão da parte interna a qual contém o sensor, a célula de fluxo e a bomba peristáltica. Cabe destacar a capacidade do display ser removível (autoria própria).

De maneira análoga, a célula de fluxo juntamente com a case do sensor foram impressas como pode ser observado por intermédio das Figura 11 (a) e (b).



FIGURA 11. (a) Conjunto case e célula de fluxo do sensor impressas em PLA; (b) célula de fluxo também impressa em PLA (autoria própria).

4.1 Driver de Potência

Para poder operar a bomba foi utilizado um *driver* para adaptar os níveis de tensão e potência do SBM com os do motor. Essas adequações foram realizadas por intermédio do circuito integrado L293D que dispõe internamente de 2 pontes H's, o habilitando para operar até 2 motores de corrente contínua em simultâneo ou 1 motor de passo com tensão de operação de até 36V e 800mA. Tais características são mais do que suficiente para atender as necessidades mencionadas. Esse *driver* permite ainda controlar o sentido de rotação e a velocidade da bomba, porém como esse primeiro parâmetro não é necessário ele não foi implementado.

4.2 Placa de Circuito Impresso

Para dar uma maior confiabilidade ao sistema foi construído uma placa de circuito. Ela foi criada através da solda das trilhas de uma placa perfurada e foi pensada para ser encaixada diretamente sobre a placa Arduino (Figura 12 (a)). Foram ainda colocados conectores (Figura 12 (b)) para permitir a conexão do SBM com o sensor (detalhe A), com o *display* (detalhe B), com o módulo *bluetooth* (detalhe C), com a chave de modo de programação (detalhe D), com a fonte de alimentação e o motor (detalhe E) e o regulador de tensão (detalhe F).

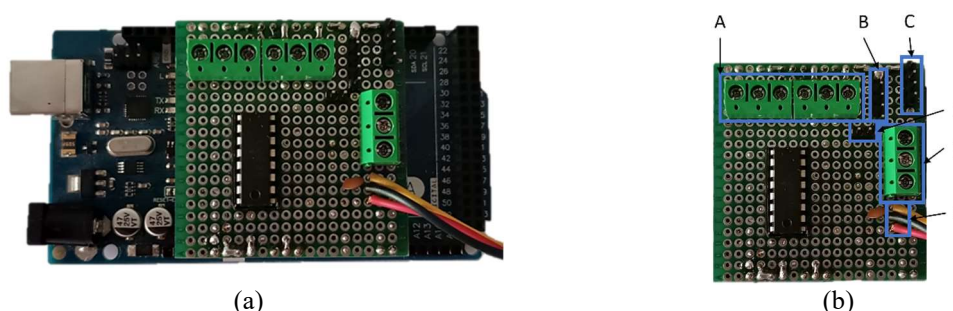


FIGURA 12. PCI elaborado em formato de *shiled*, facilitando assim a sua instalação. (a) Visão da PCI conectada a placa Arduino; (b) Descrição de seus conectores (autoria própria).

4.3 Software embarcado

Para validar o *software* embarcado e para observar e medir os sinais gerados pelo microcontrolador, foi utilizado um osciloscópio Hantek® modelo DSO5102P com tempo de amostragem igual a 1GSa/s e largura de banda igual a 100 MHz. A duração do pulso de *start* foi medida resultando em um valor igual a $26\mu\text{s}$ (Figura 13 (a)). Em seguida a frequência do sinal de *clock* foi mensurada obtendo como resultado uma frequência igual a 20,8 KHz, aproximadamente (Figuras 13 (b)), atendendo assim os critérios estabelecidos no *datasheet* do sensor.

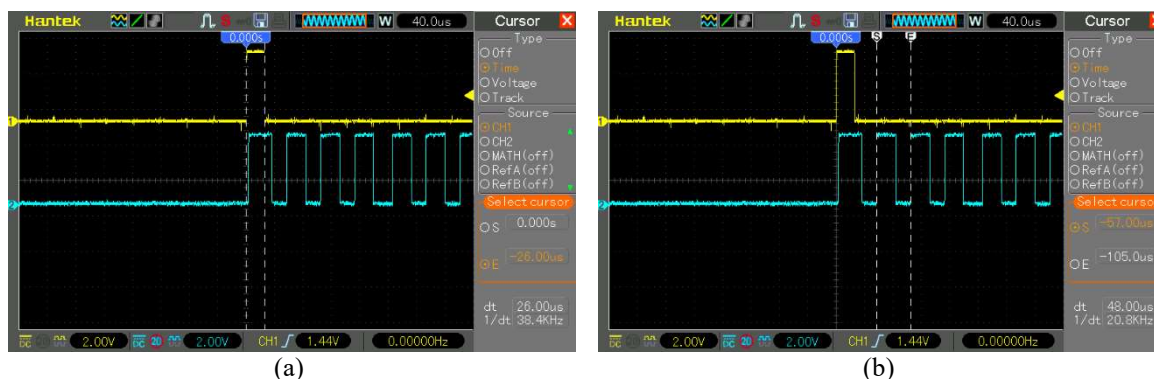


FIGURA 13. (a) Medição da duração do pulso de *start* (sinal em amarelo); (b) Mensuração da frequência do sinal de *clock*, sinal em azul (autoria própria).

Uma outra coisa a ser mencionada é a capacidade de exportar os dados. Para essa finalidade foi utilizado um módulo *bluetooth* modelo HC-05 e o aplicativo para celular *Serial Bluetooth Terminal*, os quais demonstraram ser o método mais prático para exportar os dados adquiridos. Os dados plotados no *display* são enviados para o celular ou qualquer outro dispositivo *mobile* que disponha de *bluetooth*, como pode ser constado através da Figura 14.

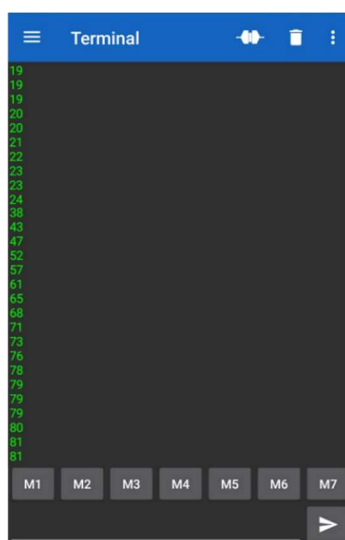


FIGURA 14. *Print screen* da tela do aplicativo, expondo os dados adquiridos pelo sensor e exportado via *bluetooth* (autoria própria).

Além dos sistemas já mencionados se fez necessário criar uma interface que permitisse a operação do sensor de forma amigável por parte do usuário. Foi empregado para esse fim um *display touchscreen* da Nextion, com 4,3 polegadas. Ele foi escolhido devido a sua facilidade de uso, como também ser de fácil programação além da possibilidade de ser controlado via comunicação serial.

Através de toques no *display* é possível calibrar o sensor (conforme apresentado pela Eq. 1) e adquirir a curva SPR da amostra analisada, além de permitir a obtenção do sinal do sensograma. É possível ainda selecionar o tipo de filtro a ser utilizado na exibição do sinal, controlar a vazão e operar a bomba que está interligada a célula de fluxo além de permitir a exportação dos dados adquiridos através de comunicação *bluetooth*.

No *display* foram elaboradas 4 telas, as quais são responsáveis por controlar a instrumentação. A Figura 15 ilustra a primeira tela principal. Através da tela principal é possível obter a curva SPR (botão “Start”), limpar a tela (botão “Limpar”), obter o sinal de referência (botão “Calibrar”), apagar a memória com relação ao sinal de referência (botão “Apagar”) e por fim ativar o filtro digital, que por padrão é o filtro de média móvel (botão “Filtrar”). Existe ainda a possibilidade de o usuário migrar de tela por intermédio dos ícones a esquerda. No ícone de ferramentas é aberto a tela de ferramentas, no ícone da engrenagem é aberto a tela de configurações e no da casa é para retornar a tela principal.



FIGURA 15. Tela principal com as suas funcionalidades (autoria própria).

Já o botão “Sensograma”, como o nome indica, migra para a tela do sensograma, ilustrado pela Figura 16. Os botões presentes na tela sensograma servem para iniciar a aquisição dos dados (botão “Start”), tomar um sinal como referência (botão “Ref.”), apagar a memória com relação ao sinal de referência (botão “Apagar”), limpar a tela (botão “Limpar”). Durante o processo de aquisição da curva sensograma o valor de mínimo de pontos utilizado para calcular a média é igual a 250 pontos por padrão. O botão “Atualizar” serve para atualizar a quantidade de pontos adquiridos para calcular a média. Os botões “+250” e “-250” servem para incrementar ou decrementar, respectivamente a quantidade de pontos já citados. Os ícones do lado esquerdo servem a mesma finalidade da tela principal enquanto o botão SPR retorna para a tela principal.

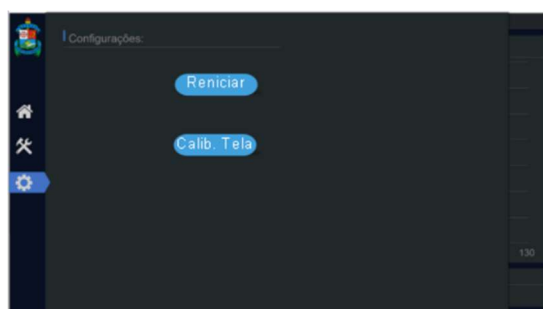


FIGURA 16. Tela do sensograma com as suas funcionalidades (autoria própria).

A tela de ferramentas serve para selecionar o tipo de filtro digital a ser utilizado e controlar o PWM da bomba peristáltica através dos botões “-”, “Atualizar” e “+” ou por intermédio do *slider*, presente abaixo dos botões mencionados, conforme pode ser observada através da Figura 17 (a). De maneira semelhante, a tela de configurações permite ao usuário calibrar o *touchscreen* da tela através do botão “Calib. Tela” e reiniciar a instrumentação pelo botão “Reiniciar”, conforme apresentado pela Figura 17 (b).



(a)



(b)

FIGURA 17. (a) Tela de ferramentas com as suas funcionalidades; (b) Tela de configurações (autoria própria).

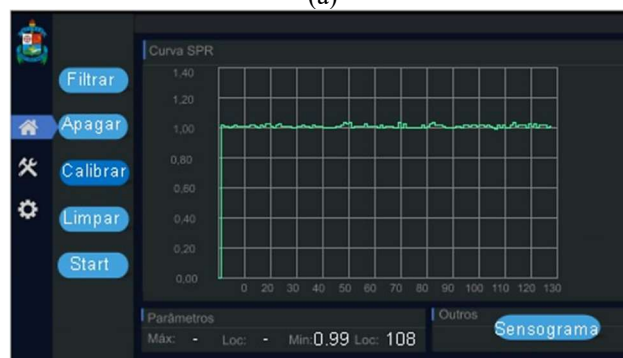
5. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

A fim de validar a instrumentação elaborada foram realizados dois testes: a obtenção da curva SPR de uma amostra de água deionizada obtida com o sistema Milipore Direct Q3 System a uma resistência elétrica de $18,7\text{M}\Omega/\text{cm}$; e uma amostra de uma solução de hipoclorito de sódio, como também a obtenção da curva sensograma de uma série de amostras das mesmas substâncias.

Para o primeiro teste, foi inicialmente realizado a limpeza da superfície do sensor com uma mistura de água deionizada e sabão neutro em igual proporção. Após o término desse processo foi efetuado a calibração do sensor, conforme Figura 18 (a) e (b).



(a)



(b)

FIGURA 18. (a) Sinais de referência; (b) Sinal calibrado (autoria própria).

Após essa etapa foi realizado o gotejamento de uma pequena amostra de água deionizada no sensor. A partir dessa amostra foi obtida a sua curva SPR a qual apresenta uma queda do sinal, em torno de 50% na região compreendida entre o pixel 84, conforme esperado. A Figura 19 apresenta esse resultado.



FIGURA 19. Curva SPR da amostra de água deionizada. Mínimo indicado na posição de pixel 84 (autoria própria).

Depois foi adicionada uma pequena amostra de hipoclorito de sódio o qual resultou em um ligeiro deslocamento do sinal original (cerca de 7 pixels para esquerda) provocado pela mudança do índice de refração, condizendo com a teoria validando assim o experimento. A Figura 20 ilustra a curva obtida.



FIGURA 20. Curva SPR da amostra de hipoclorito de sódio. Mínimo indicado na posição de pixel 77 (autoria própria).

Para obtenção da curva sensograma foi realizado um ciclo de medição utilizando as substâncias anteriores, ou seja, água deionizada e hipoclorito. Durante essa etapa o S³PR foi configurado para realizar a aquisição de 250 pontos para o cálculo da média.

O experimento iniciou com a adição de uma amostra de água deionizada e desmineralizada resultando em um sinal constante e igual a 84, ou seja, a posição do ponto de mínimo da curva SPR da amostra em questão. Manteve-se essa substância por 1 minuto. Em seguida, foi adicionada uma amostra de hipoclorito de sódio por 1 minuto, que resultou em um deslocamento na posição de ressonância, ilustrada pela queda do sinal. O processo foi repetido mais uma vez, proporcionando uma repetição do resultado anterior, conforme apresentado pela Figura 21. Cumpre destacar que para o sensograma foi utilizado o método do centroide para detecção da posição de ressonância, fornecendo o valor mínimo no pixel 84 para água e de 78 para a solução de hipoclorito.

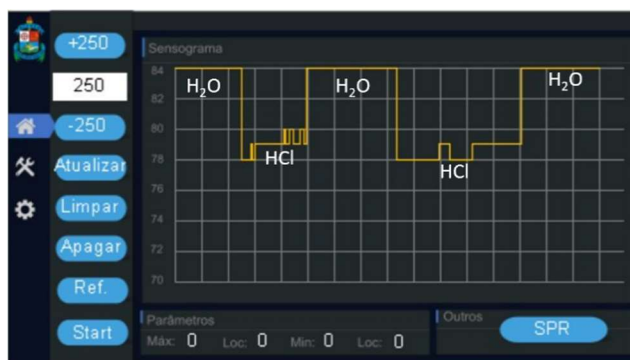


FIGURA 21. Curva sensograma para o ciclo experimental composto de $H_2O \rightarrow HCl \rightarrow H_2O \rightarrow HCl \rightarrow H_2O$. Com o sensograma é possível acompanhar a mudança das amostras através da variação da localização do ponto de mínimo da curva SPR (autoria própria).

5. CONCLUSÃO

Devido a importância dos sensores baseados no fenômeno SPR, que possibilitam caracterizar e acompanhar processos químicos/biológicos o trabalho se propôs a elaborar uma instrumentação visando operar o sensor Spreeta e adquirir curvas SPR e sensograma de substâncias líquidas. Para tal foi embarcado no equipamento todos os dispositivos necessários para a sua operação, ou seja, célula de fluxo, bomba peristáltica e um dispositivo para a aquisição e processamento dos dados. Foi ainda empregado um microcontrolador *single-board* (SBM), mais especificamente uma placa Arduino Mega 2560, de modo a construir um equipamento compacto e sem a necessidade de depender de computador.

Nessa propositura, o trabalho conseguiu demonstrar a viabilidade de se confeccionar uma instrumentação compacta fazendo o uso de SBM, como também da capacidade de adquirir curvas SPR e sensogramas de substâncias líquidas. No trabalho foram obtidas curvas SPR de amostras de água deionizada bem como de soluções de hipoclorito de sódio. De maneira semelhante foi possível acompanhar a variação de tipos de amostras das mesmas substâncias através da curva sensograma obtida pelo mesmo sistema.

Apesar de resultados demonstrarem a factibilidade do sensor propostos, algumas dificuldades foram enfrentadas como a estanqueidade da célula de fluxo devido ao seu método de confecção (impressão 3D) e material utilizado (PLA). Como sugestão para trabalhos futuros, cabem mencionar: i) imprimir a célula de fluxo em ABS (Acrilonitrila Butadieno Estireno) ou utilizar um método diferente de confecção como usinagem ou injeção de plástico; ii) investigar a possibilidade de se utilizar interrupções internas (USART e Timer's) na programação do microcontrolador para promover uma eficiência ainda maior na execução do código; iii)

estabelecer a comunicação entre o microcontrolador e o *display* via *bluetooth*, possibilitando assim uma maior mobilidade e comodidade, por parte do usuário; iv) adicionar a capacidade de armazenar os dados adquiridos em um micro cartão SD, de forma a garantir um *backup* dos dados; v) instalar uma bateria a instrumentação, possibilitando a sua utilização em campo sem a necessidade de depender da rede elétrica; vi) realizar o seu teste através de outros usuários para validar a sua usabilidade.

AGRADECIMENTOS

Financiamento: Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Agradecimentos: Os autores também agradecem a Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA.

REFERÊNCIAS

- [1] R. M. D. Carvalho, S. Rath e L. T. Kubota, “SPR: Uma nova ferramenta para biossensores,” Química Nova, vol. 26, pp. 97-104, 17 mar 2003. Autor 1, A.; Autor 2, B. Título do Capítulo. Em *Título do Livro*, 2ª ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Editora: Editora Local, País, Ano; Volume X, p. 00–00.
- [2] Yadav, M.K., Kumar, P. and Verma, R.K., 2020. Detection of adulteration in pure honey utilizing Ag-graphene oxide coated fiber optic SPR probes. *Food chemistry*, 332, p.127346.
- [3] Mansouri, M., Fathi, F., Jalili, R., Shoeibie, S., Dastmalchi, S., Khataee, A. and Rashidi, M.R., 2020. SPR enhanced DNA biosensor for sensitive detection of donkey meat adulteration. *Food chemistry*, 331, p.127163.
- [4] Qi, T., Xu, M., Yao, Y., Chen, W., Xu, M., Tang, S., Shen, W., Kong, D., Cai, X., Shi, H. and Lee, H.K., 2020. Gold nanoprism/Tollens’ reagent complex as plasmonic sensor in headspace single-drop microextraction for colorimetric detection of formaldehyde in food samples using smartphone readout. *Talanta*, 220, p.121388.
- [5] Herrera-Domínguez, M., Lambert, A. S., Morales-Luna, G., Pisano, E., Aguilar-Hernandez, I., Mählknecht, J., ... & Ornelas-Soto, N. (2023). Development of a surface plasmon resonance based immunosensor for diclofenac quantification in water. *Chemosphere*, 139156.
- [6] Feng, W., Yuan, C., Li, T., & Yang, X. (2023). Ion-imprinted-polymer coated fiber-optic SPR sensor for detection of trace Cr³⁺ in water. *Optik*, 272, 170259.
- [7] TSPR1A170100 Spreeta Liquid Sensor, Texas Instruments, 2000.
- [8] B. D. Spangler, E. A. Wilkinson, J. T. Murphy e B. J. Tyler, “Comparison of the Spreeta® surface plasmon resonance sensor and a quartz crystal microbalance for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 444, pp. 149-161, 2001.
- [9] T. M. Chinowsky, J. G. Quinn, D. U. Bartholomew, R. Kaiser e J. L. Elkind, “Performance of the Spreeta 2000 integrated surface plasmon resonance affinity sensor,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 91, pp. 266-274, 2003.
- [10] I. Navrátilová e P. Skládal, “Immunosensor for the measurement of human serum albumin in urine based on the Spreeta surface plasmon resonance sensor,” *Supramolecular Chemistry*, vol. 15, pp. 109-115, 2003.
- [11] G. R. Marchesini, K. Koopal, E. Meulenbergh, W. Haasnoot e H. Irth, “Spreeta-based biosensor assays for endocrine disruptors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 1908-1915, 2007.
- [12] W. Haasnoot, G. R. Marchesini e K. Koopal, “Spreeta-based biosensor immunoassays to detect fraudulent adulteration in milk and milk powder,” *Journal of AOAC International*, vol. 89, pp. 849-855, 2006.
- [13] OLIVEIRA, Leiva Casemiro et al. SPR sensor for tampering detection in biofuels. In: 2015 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC) Proceedings. IEEE, 2015. p. 1471-1476.
- [14] HARSOJO, Harsojo; PRAMESTA, Ervan Erry; TRIYANA, Kuwat. Building up of surface plasmon resonance instrument using spreeta 2000 and Arduino Mega 2560. *Applied Mechanics and Materials*, v. 771, p. 25-28, 2015.
- [15] PRAMESTA, Ervan Erry. RANCANG BANGUN SISTEM PENGAMATAN SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) DENGAN MENGGUNAKAN LABVIEW DAN SENSOR SPREETA 2001E. *Jurnal Penelitian*, v. 19, n. 2, 2016.
- [16] L. C. Oliveira, A. M. N. Lima, C. Thirstrup e H. F. Neff, *Surface plasmon resonance sensors: A materials guide to design and optimization*, Springer, 2015, p. 183.