

Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Engenharia Elétrica e Informática
Departamento de Engenharia Elétrica

Eduardo Gomes Pereira

**Contribuições à Determinação da Condição Ressonante
em Biosensores Ópticos Baseados na Ressonância de
Plasmons de Superfície**

Campina Grande – Paraíba – Brasil

13 de agosto de 2015

Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Engenharia Elétrica e Informática
Departamento de Engenharia Elétrica

**Contribuições à Determinação da Condição Ressonante
em Biosensores Ópticos Baseados na Ressonância de
Plasmons de Superfície**

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre em Engenharia Elétrica.

Eduardo Gomes Pereira

Área de concentração: Processamento da Informação

ORIENTADOR: ANTONIO MARCUS NOGUEIRA LIMA

ORIENTADOR: MARCOS RICARDO ALCÂNTARA MORAIS

Campina Grande – Paraíba – Brasil

13 de agosto de 2015



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

P436c

Pereira, Eduardo Gomes.

Contribuições à determinação da condição ressonante em biosensores ópticos baseados na ressonância de plasmons de superfície / Eduardo Gomes Pereira. – Campina Grande, 2015.
60 f. ; color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, 2015.

"Orientação: Prof. Antonio Marcus Nogueira Lima, Marcos Ricardo Alcântara Morais".

Referências.

1. Biosensores. 2. Ressonância de Plasmons de Superfície. 3. Algoritmo de Colônia de Formigas. 4. Regressão Linear. 5. Detecção de Mínimo. I. Lima, Antonio Marcus Nogueira. II. Morais, Marcos Ricardo Alcântara. III. Título.

CDU 621.39 (043)

**"CONTRIBUIÇÕES À DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO RESSONANTE EM
BIOSENSORES ÓPTICOS BASEADOS NA RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE
SUPERFÍCIE"**


EDUARDO GOMES PEREIRA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/08/2015


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


MARCOS RICARDO DE ALCÂNTARA MORAIS, D.Sc, UFCG
Orientador(a)


MARCELO SAMPAIO DE ALENCAR, Ph.D., UFCG
Examinador(a)


JAIDILSON DA SILVA, D.Sc., UFCG
Examinador(a)


SAULO OLIVEIRA DORNELLAS LUIZ, D.Sc., UFCG
Examinador(a)

CAMPINA GRANDE - PB

Este trabalho é dedicado à minha família

Agradecimentos

Os agradecimentos deste trabalho são direcionados:

- A Deus, pela força e perseverança, pela capacidade e sabedoria, por este mundo incrível... por tudo;
- Ao professor Antonio Marcus, pela orientação, pela oportunidade e pela confiança;
- Ao professor Marcos Morais, pela orientação, pelo auxílio e esclarecimento em diversas ocasiões, e pela paciência;
- Ao colega Leiva, pela ajuda em várias situações;
- À CAPES pelo apoio financeiro.
- À minha família, pelo apoio e compreensão, não apenas durante esta longa trajetória, mas durante toda a minha vida;
- A todos os amigos e colegas com quem convivi durante os últimos dois anos, pela “hora do café”, pelas conversas e pelas inúmeras situações compartilhadas no decorrer desta jornada;
- A todas as pessoas anônimas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

*"We are an impossibility in an impossible universe."
(Ray Bradbury, 1920 - 2012)*

Resumo

Na presente dissertação, são apresentadas contribuições à determinação da condição ressonante em sensores baseados na ressonância de plasmons de superfície. Três contribuições são apresentadas: i) um método para rastreamento da condição ressonante baseado numa aproximação por função cossenoidal, este método tem como destaque sua eficiência computacional e robustez contra diversos tipos de perturbação; ii) a construção de um regressor paramétrico linear para ajuste da curva de ressonância como aperfeiçoamento de um método existente na literatura, o regressor apresenta várias vantagens, como melhor tempo de resposta, implementação simples e não dependência da escolha inicial dos parâmetros para determinação da ressonância; e iii) um algoritmo com base no comportamento de formigas para determinar a condição ressonante em imagens, o algoritmo pode ser aplicado sem a necessidade de aprimoramento da qualidade da imagem e não requer normalização dos dados obtidos para ser aplicado. Todas as abordagens foram testadas por meio de simulações e experimentos. Os resultados obtidos serviram para mostrar a validade dos algoritmos desenvolvidos, assim como sua efetividade na determinação da condição ressonante.

Palavras-chaves: biosensores, ressonância de plasmons de superfície, algoritmo de colônia de formigas, regressão linear, detecção de mínimo.

Abstract

The present dissertation presents contributions to the resonance determination in surface plasmon resonance based sensors. Three contributions are presented: i) a method for tracking the resonance condition based on a single approximation a cosinusoidal function, this method is computationally efficient and presents robustness against disturbances; ii) a linear parameter regression construction for the resonance curve fitting as improvement for an existing method in literature, the regression presents some advantages, such as better response time, simple implementation and no dependence of initial parameter choice; and iii) an algorithm based on ants behavior to determine the resonance in images, the algorithm can be applied without the need to improve the image quality and it does not require normalization of the obtained data to be applied. All approaches were tested by simulations and experiments. The results served to show the validity of the developed algorithms, as well as its effectiveness in determining the resonant condition.

Palavras-chaves: biosensor, surface plasmon resonance, ant colony algorithm, linear regression, minimum detection.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Representação de uma estrutura de múltiplas camadas.	6
Figura 2 – Curvas de refletividade da superfície como função (a) do ângulo de incidência da luz e (b) do comprimento de onda da luz para duas propriedades ópticas diferentes da terceira camada.	9
Figura 3 – Esquema de um sensor SPR composto por quatro camadas.	10
Figura 4 – Ilustração de reação que ocorre em um sensor SPR.	11
Figura 5 – Exemplo de sensorgrama.	12
Figura 6 – Diagrama representativo de um sensor SPR e das diversas formas de perturbação que afetam a resposta de um sensor SPR.	12
Figura 7 – Esboço ilustrativo para mostrar o conceito básico do algoritmo do centróide.	16
Figura 8 – Estrutura representativa de um sensor SPR de três camadas.	20
Figura 9 – Gráfico da refletividade da superfície para diferentes valores do índice de refração da terceira camada.	22
Figura 10 – Curva SPR discreta com uma indicação da relação entre ângulo e indexador.	23
Figura 11 – Curvas SPR (tracejadas) e suas aproximações por cossenoides. A diferença entre as posições de mínimo das curvas SPR é similar às diferença de fase das cossenoides.	23
Figura 12 – (a) Refletividade do sistema de múltiplas camadas para diferentes valores de n_3 . As curvas sofrem um deslocamento para a direita a medida que se aumenta valor de n_3 , a curva mais à esquerda foi calculada com $n_3 = 1,33$ e a curva mais à direita foi calculada com $n_3 = 1,37$. Estas curvas foram utilizadas para calcular a relação entre a variação de largura e a variação da posição de mínima refletividade. (b) Mudança na FWHM em função da posição de mínima refletividade para as curvas apresentadas na (a).	27
Figura 13 – Resultados das simulações para determinação da condição ressonante (a) Determinação da variação no ângulo de ressonância para materiais com diferentes índices de refração. (b) Erro na determinação da variação do ângulo de ressonância obtidos com o uso do método proposto e o método do centróide.	28
Figura 14 – Dispersão dos materiais utilizados na estrutura de múltiplas camadas. Índice de refração como uma função do comprimento de onda para (a) TOPAS e (b) água desgaseificada e desionizada. (c) Função dielétrica do ouro em função do comprimento de onda	29

Figura 15 – (a) Refletividade do sistema multicamadas para diversos valores de n_3 . As curvas sofrem um deslocamento para a direita à medida que se aumenta valor de n_3 . A curva mais à esquerda foi calculada com $n_3 = 1,33$ e a curva mais à direita foi calculada com $n_3 = 1,37$. As curvas foram utilizadas para calcular a relação entre a variação de largura e a variação da posição de mínima refletividade. (b) Variação da largura da curva em função da variação da posição de mínima refletividade para as curvas apresentadas em (a).	30
Figura 16 – Resultados de simulações para determinação da condição ressonante no modo de interrogação por comprimento de onda para materiais com diferentes índices de refração.	31
Figura 17 – Fotos do equipamento utilizado nos experimentos para o modo de interrogação angular.	32
Figura 18 – Sensorgramas experimentais para monitoramento <i>online</i> do índice de refração a partir do método proposto e do método do centróide no modo de interrogação angular. As linhas verticais de cor cinza indicam a entrada de água na célula de fluxo.	33
Figura 19 – Curvas SPR obtidas para diferentes concentrações de álcool isopropílico no modo de interrogação angular.	33
Figura 20 – Diagrama de blocos do equipamento utilizado nos experimentos para o modo de interrogação por comprimento de onda.	34
Figura 21 – Sensorgramas experimentais para monitoramento <i>online</i> do índice de refração a partir do método proposto e do método do centróide no modo de interrogação por comprimento de onda. As linhas verticais de cor cinza indicam a entrada de água na célula de fluxo.	35
Figura 22 – Curvas SPR obtidas para diferentes concentrações de álcool isopropílico no modo de interrogação por comprimento de onda.	36
Figura 23 – Sensorgrama obtido para aplicação de ciclo de limpeza controlado a partir do método proposto no modo de interrogação angular.	37
Figura 24 – Curvas SPR geradas para condição ideal (sem ruído) e suas aproximações utilizando o regressor e o algoritmo de Levenberg-Marquardt para (a) $n_3 = 1,33$ e (b) $n_3 = 1,34$	42
Figura 25 – Curvas SPR ruidosas geradas para $n_3 = 1,33$ e suas aproximações o regressor e o algoritmo de Levenberg-Marquardt para curvas adicionadas de ruído branco Gaussiano com variâncias (a) $\sigma^2 = 0,01$ e (b) $\sigma^2 = 0,03$	43
Figura 26 – Curva SPR gerada perturbada com ruído de variância 0,03 e sua aproximação utilizando o regressor combinado com variáveis instrumentais e e o algoritmo de Levenberg-Marquardt.	44

Figura 27 – Curvas SPR experimentais obtidas (real) e suas aproximações usando o regressor sem e com o uso de variáveis instrumentais e o algoritmo de Levenberg-Marquardt para curvas obtidas com a substância na célula de fluxo sendo (a) água, (b) PBS e (c) hipoclorito.	45
Figura 28 – Representação da imagem SPR numa matriz de transição de estados.	48
Figura 29 – Imagens SPR geradas utilizando o modelo de Fresnel: (a) Imagem SPR ideal e (b) imagem SPR degradada com a linha de ressonância determinada pelo algoritmo de colônia de formigas.	51
Figura 30 – Determinação da condição de ressonância usando (a) método do centróide e (b) transformada de Radon.	52
Figura 31 – Imagens SPR experimentais para: (a) água pura e (b) 50%-50% água-hipoclorito.	53
Figura 32 – Resultados experimentais para: (a) água pura e (b) 50%-50% água-hipoclorito.	53

Lista de tabelas

Tabela 1 – Parâmetros da estrutura de múltiplas camadas usados no modelo de simulação. As espessuras das camadas externas (1 e 4) são muito maiores que as espessuras das camadas internas e são onsideradas infinitas.	26
Tabela 2 – Efeito do ruído sobre a detecção da variação da posição de mínimo obtida com o método proposto.	28
Tabela 3 – Média e variância da variação do índice de refração em regime permanente calculada a partir do método do centróide e do método proposto para o modo de interrogação angular.	34
Tabela 4 – Média e variância da variação do índice de refração em regime permanente calculada a partir do método do centróide e do método proposto para o modo de interrogação por comprimento de onda.	35
Tabela 5 – Parâmetros da estrutura de múltiplas camadas usados no modelo de simulação.	41

Lista de abreviaturas e siglas

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCD	<i>charge-Coupled device</i>
COC	<i>Cyclic Olefin Copolymer</i>
CMOS	<i>Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i>
DQM	Desvio Quadrático Médio
DOCE	<i>Diffraction Optical Coupling Element</i>
FLOPS	<i>Floating-Point Operations Per Second</i>
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
HIPO-S	Solução de Hipoclorito
MAP	<i>Maximum a Posteriori</i>
MLE	<i>Maximum Likelihood Estimator</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RIU	<i>Refractive Index Unit</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TOPAS	<i>Thermoplastic Olefin Polymer of Amorphous Structure</i>

Lista de símbolos

c	Velocidade da Luz
d_i	Largura da camada i
j	Unidade imaginária ($j = \sqrt{-1}$)
\vec{k}_{sp}	Onda de plasmons
\vec{k}_x	Componente da luz incidente na direção da onda de plasmon
m	Número de camadas
n_i	Índice de refração da camada i
q_i	i -ésimo coeficiente de Fresnel
x	Indexador
B'_0	Fator de perturbação de fundo
B'_1	Fator de perturbação de fundo
G	Ganho do fotodetector
I_0	Intensidade de luz normalizada
M_i	Matriz de transferência de propagação de onda da camada i para a camada $i + 1$
P	Resposta do fotodetector
R	Refletividade da superfície
β_i	i -ésimo coeficiente de Fresnel
ϵ_i	Permissividade dielétrica do meio i
ϵ_{iI}	Parte imaginária da permissividade dielétrica do meio i
ϵ_{iR}	Parte real da permissividade dielétrica do meio i
λ	Comprimento de onda da luz
λ_R	Comprimento de onda de ressonância
θ	Ângulo de incidência da luz

θ_R	Ângulo de ressonância
Ψ	Matriz de feromônio
$\varphi(y,x)$	Quantidade de feromônio na posição (y, x)
ω	Frequência angular
ΔN	Ruído
ΔF	Perturbação de forma da superfície
$\Delta\theta_n$	Ruído de fase (ângulo)

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Introdução	1
1.2	Justificativa e relevância	3
1.3	Objetivos	3
1.4	Organização do texto	4
2	FENÔMENO SPR	5
2.1	Introdução	5
2.2	Ressonância de plasmons de superfície	5
2.3	Refletividade de um sistema de múltiplas camadas	6
2.4	Modos de operação de dispositivos SPR	6
2.4.1	Modo de interrogação angular	7
2.4.2	Modo de interrogação de comprimento de onda	7
2.5	Sensores SPR	8
2.5.1	Biosensores SPR	9
2.5.2	Sensorgrama	10
2.5.3	Determinação da Condição Ressonante	11
2.6	Modelo de perturbação em sensores SPR	13
2.7	Processamento de Sinais	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Métodos de rastreamento da condição ressonante	15
3.1.1	Centróide	15
3.1.2	Funções de interpolação	16
3.1.3	Outras abordagens	18
3.2	Conclusão	19
4	APROXIMAÇÃO POR FUNÇÃO COSSENOIDAL	20
4.1	Descrição do método	20
4.1.1	Morfologia da curva SPR	20
4.1.2	Aproximação da curva SPR por uma função cossenoidal	21
4.1.3	Rastreamento de mudanças na posição de mínima refletividade	23
4.2	Análise do efeito das perturbações	24
4.3	Resultados de simulações	25
4.3.1	Modo de interrogação angular	25
4.3.2	Interrogação por comprimento de onda	27

4.3.3	Aspectos computacionais	31
4.4	Resultados experimentais	31
4.4.1	Modo de interrogação angular	32
4.4.2	Modo de interrogação por comprimento de onda	33
4.4.3	Discussão	35
4.4.4	Experimento com ciclo de limpeza controlado	36
4.5	Conclusão	37
5	REGRESSOR LINEAR	38
5.1	Equação paramétrica não-linear	38
5.2	Construção do regressor linear	39
5.3	Resultados de simulação	41
5.3.1	Uso de Variáveis Instrumentais	43
5.4	Resultados experimentais	44
5.5	Conclusão	45
6	ALGORITMO DE COLÔNIA DE FORMIGAS	47
6.1	Introdução	47
6.2	Algoritmo de colônia de formigas	47
6.3	Resultados de simulação	50
6.3.1	Centróide	50
6.3.2	Transformada de Radon	51
6.4	Resultados Experimentais	52
6.4.1	Discussão	52
6.5	Conclusão	54
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7.1	Síntese	55
7.2	Conclusões	55
7.3	Continuação da pesquisa	56
	Referências	57

1 Introdução

1.1 Introdução

Muitas vezes, o diagnóstico precoce de doenças é fundamental para determinar cuidados clínicos prévios, sendo importante para um tratamento efetivo ou evitar complicações ao paciente. O diagnóstico precoce de doenças também é útil na detecção antecipada de epidemias, possibilitando a adoção de medidas preventivas assim como a formulação de vacinas e soros.

Geralmente, o diagnóstico de doenças é realizado em análises de laboratório por meio de isolamento do vírus e determinação do genoma viral. Essa determinação se dá pela detecção de antígenos virais e sorologia. No entanto, é possível que os resultados positivos só apareçam após alguns dias e, em vários casos, não é possível aguardar este tempo para iniciar o tratamento. Além disso, é necessária uma infraestrutura adequada e funcionários qualificados para execução desses testes.

O uso de biosensores é uma alternativa viável para a detecção de doenças. Biosensores apresentam várias vantagens em relação aos métodos tradicionais de detecção, sendo o menor tempo de resposta uma das principais [1]. Além disso, é possível fabricar biosensores portáteis e de simples utilização, reduzindo os custos com infraestrutura e funcionários qualificados.

Biosensores são dispositivos utilizados para detectar compostos químicos por meio de interações bioquímicas entre enzimas específicas e a substância que se deseja detectar [2]. Basicamente, um biosensor é formado por: um elemento biológico, que interage com a substância de interesse; um elemento transdutor, capaz de transformar a interação num sinal elétrico mensurável; um sistema de aquisição de dados, utilizado para medição da grandeza mensurável; e uma unidade de processamento, necessária para extração das características dos sinais adquiridos [3]. Diferentes configurações para biosensores podem ser encontradas na literatura. Os tipos mais frequentes de biosensores encontrados são: eletroquímicos; piezoelétricos; ópticos; e térmicos [4].

Nas últimas décadas, biosensores ópticos ganharam destaque devido ao não uso de sinais elétricos na região sensível, possibilitando a sua aplicação em ambientes de risco inflamável e imunidade à interferência eletromagnética [5]. Biosensores ópticos utilizam luz como forma de medição e o processo de transdução ocorre por meio de mudanças sofridas pela luz devido às propriedades ópticas das substâncias analisadas. Os biosensores ópticos mais comuns são sensores baseados em fluorescência; sensores de grades de difração; sensores de espelhos ressonantes; e sensores baseados na ressonância de plasmões

de superfície, ou SPR (*Surface Plasmon Resonance*). Os três últimos ainda apresentam como vantagem a não necessidade do uso de marcadores para rotular as biomoléculas de interação [1]. O presente trabalho é focado em sensores baseados no fenômeno SPR.

A tecnologia SPR não é exclusiva para aplicações biológicas. Dispositivos baseados no fenômeno SPR podem ter outras aplicações, a exemplo de determinação de pequenos deslocamentos [6] e detecção de adulteração em combustíveis [7].

Sensores SPR são construídos numa estrutura de múltiplas camadas em que duas dessas camadas formam uma interface metal-dielétrico. A ressonância de plasmons de superfície é um fenômeno optoeletrônico que ocorre na interface metal-dielétrico sob condições específicas. Como resultado da ocorrência do fenômeno SPR, acontece uma redução na refletividade da superfície de metal para um determinado comprimento de onda ou ângulo de incidência da luz. Implementações práticas de sensores SPR são feitas para operação em dois modos principais: variando o ângulo de incidência da luz com comprimento de onda fixo, chamado interrogação angular; e variando o comprimento de onda da luz com ângulo de incidência fixo, chamado interrogação de comprimento de onda. A partir da resposta SPR (curva da refletividade da superfície de metal), é possível determinar alguns parâmetros da estrutura de múltiplas camadas. Tipicamente, os parâmetros determinados são o índice de refração ou a largura de uma camada.

Num experimento envolvendo um biosensor SPR, bioreceptor é adsorvido numa fina camada metálica (ouro ou prata) depositada sobre sobre um substrato transparente (vidro ou polímero). Um analito (substância a ser analisada) imerso numa solução aquosa é induzido a fluir sobre essa superfície. Dependendo da composição do analito, uma ligação entre o bioreceptor e o analito pode acontecer, resultando numa camada com diferentes características ópticas. A verificação das características ópticas dessa camada serve para indicar se a substância que reage com o bioreceptor está presente no analito. A condição ressonante está relacionada às características ópticas dessa camada, portanto, a verificação de suas características ópticas é realizada monitorando a condição ressonante.

Estudos em biosensores SPR são realizados em vários aspectos, a exemplo de modelagem matemática, construção de dispositivos, e desenvolvimento de algoritmos de processamento. A determinação rápida e precisa de variações na condição ressonante é de fundamental importância para qualquer sensor SPR. Essa determinação é prejudicada por vários fatores, a exemplo de ruído, imperfeições no caminho óptico e variações na fonte de luz ou no detector óptico. A escolha de métodos adequados de processamento pode ter um impacto significativo no processo de medição, seja por meio de minimização dos efeitos de perturbações ou aumento no desempenho computacional.

Sendo assim, o problema abordado neste trabalho é: “Dado um conjunto de dados obtidos experimentalmente de um sensor SPR e sujeitos a diversos tipos de perturbação, como determinar, com alta precisão, eficiência e robustez, a condição ressonante a partir

destes dados?”

1.2 Justificativa e relevância

A determinação ou, mais especificamente, o rastreamento da condição ressonante em qualquer dispositivo SPR é importante para o seu desempenho. Neste caso, desempenho refere-se principalmente à minimização de erros no rastreamento da condição ressonante.

Na presente dissertação, o interesse é melhorar o desempenho de dispositivos SPR por meio de técnicas de processamento, possibilitando o uso de dispositivos mais baratos. Sendo assim, o foco é construir e aperfeiçoar métodos de processamento para compensar ou minimizar os efeitos indesejados, tais como ruídos de medição, não uniformidade da distribuição de potencia espectral da fonte de luz e das características de propagação guia de onda óptico entre a fonte de luz e o fotodetector, e influência de fatores externos (*e.g.* temperatura ou luz ambiente).

1.3 Objetivos

O objetivo principal é o desenvolvimento e análise de métodos de processamento da curva SPR para rastreamento da condição ressonante. O desenvolvimento de métodos de processamento pode contribuir com a tecnologia de biosensores SPR em dois aspectos principais: aprimoramento da precisão e robustez e aumento da eficiência computacional dos dispositivos. Para alcançar o objetivo principal, alguns objetivos específicos precisam ser contemplados:

1. Revisão da literatura com o intuito de caracterizar sensores SPR, sua composição, conceito e aplicações, e dominar as principais técnicas para determinação da condição ressonante;
2. Estudo e análise de métodos de processamento da curva SPR existentes na literatura, visando possíveis melhorias e implementação de outros métodos;
3. Implementação e aprimoramento de métodos de processamento da curva SPR;
4. Aplicação dos métodos implementados e realização de testes experimentais que verifiquem a eficiência e adequação das implementações desenvolvidas ao problema proposto.

1.4 Organização do texto

No Capítulo 2, são apresentados os conceitos básicos do fenômeno SPR e sua modelagem matemática, assim como uma breve discussão a respeito de sensores SPR e biosensores SPR. No Capítulo 3, é apresentada uma revisão dos trabalhos existentes na literatura, com ênfase na determinação da condição ressonante. No Capítulo 4, é apresentada a primeira contribuição do trabalho, que é o rastreamento da condição ressonante por meio da aproximação por uma função cossenoidal. No Capítulo 5, é apresentada a segunda contribuição do trabalho, que é a construção de um regressor linear, como aperfeiçoamento de um método existente na literatura, para determinação da condição ressonante. No Capítulo 6, é apresentada a terceira contribuição do trabalho, que é o rastreamento da condição ressonante em imagens usando um algoritmo de colônia de formigas. No Capítulo 7, é apresentada uma breve síntese do trabalho e são manifestadas ideias para possíveis trabalhos futuros.

2 Fenômeno SPR

2.1 Introdução

Nas últimas três décadas, ocorreu um considerável avanço no desenvolvimento de dispositivos ópticos baseados no fenômeno SPR para os mais variados fins. Dispositivos SPR são encontrados em diversas aplicações para detecção de compostos químicos e biológicos. O fenômeno SPR se tornou uma poderosa ferramenta para investigar eventos dinâmicos e realizar análises de superfícies ou interfaces. Neste capítulo, os princípios físicos fundamentais do fenômeno SPR e a ideia básica a respeito dos dispositivos SPR são apresentados.

2.2 Ressonância de plasmons de superfície

A luz, ao se propagar de um meio com índice de refração n_1 para um meio com índice de refração menor, $n_2 < n_1$, é parcialmente refletida e parcialmente refratada. Variando alguns aspectos de incidência da luz, a exemplo do seu ângulo de incidência sobre a interface de ligação entre os dois meios, ocorre uma variação de intensidade nas partes refletida e refratada. Sob certas condições, a luz incidente sobre a superfície de ligação é completamente refletida [8]. Este fenômeno é conhecido como reflexão interna total. Outro fenômeno de interesse, na reflexão interna total, é o surgimento, no ponto de incidência da luz, de um campo elétrico evanescente no meio de menor índice de refração cuja amplitude cai exponencialmente com o aumento da distância de penetração [9, 10].

Ao incidir um feixe de luz sobre uma superfície metálica, devido à presença de campo elétrico, ocorre a ionização de algumas moléculas, resultando no deslocamento de elétrons livres. Esses elétrons são atraídos pelos íons positivos gerados. A interação entre os íons positivos e os elétrons gera uma onda de oscilações coletivas de elétrons, ou onda de plasmons [9]. Na superfície de um metal, esta onda é chamada de onda de plasmons de superfície.

Quando a componente na direção da onda de plasmons, \vec{k}_x , do vetor resultante da incidência da luz sobre a superfície oscila com a mesma frequência e amplitude da onda de plasmons, \vec{k}_{sp} , parte da energia luminosa é absorvida, resultando em redução da refletividade da superfície metálica. Esse fenômeno é chamado de ressonância de plasmons de superfície, ou SPR. Na Figura 1, é exibida uma representação de uma estrutura de múltiplas camadas e do fenômeno SPR.

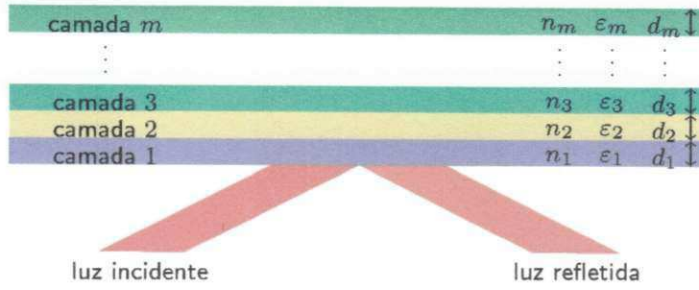


Figura 1 – Representação de uma estrutura de múltiplas camadas.

2.3 Refletividade de um sistema de múltiplas camadas

Um dispositivo SPR consiste numa estrutura de múltiplas camadas, conforme ilustrado na Figura 1. Usando o modelo de multicamadas de Fresnel, que considera as camadas como semi-infinitas, a refletividade de uma estrutura de m camadas pode ser determinada em função das características da luz incidente (ângulo de incidência, θ , ou comprimento de onda, λ) utilizando uma formulação de matrizes de transferência [8] e expressa como

$$R(\theta, \lambda) = \left| \frac{(m_{11} + m_{12}q_m)q_1 - (m_{21} + m_{22})q_m}{(m_{11} + m_{12}q_m)q_1 + (m_{21} + m_{22})q_m} \right|, \quad (2.1)$$

em que, os elementos m_{kl} ; $k, l = 1, 2$ compõem a matriz de transferência geral

$$\begin{bmatrix} m_{11} & m_{12} \\ m_{21} & m_{22} \end{bmatrix} = \prod_{i=2}^{m-1} M_i, \quad (2.2)$$

na qual, M_i é a matriz de transferência que descreve a propagação de uma onda do meio i para o meio $i + 1$, expressa por

$$M_i = \begin{bmatrix} \cos(\beta_i) & -j \sin(\beta_i) / q_i \\ -j \sin(\beta_i) q_i & \cos(\beta_i) \end{bmatrix}, \quad (2.3)$$

e q_i e β_i são os coeficientes de Fresnel, dados por

$$q_i = \frac{\sqrt{n_i^2 - (n_1 \sin(\theta))^2}}{n_i} \quad (2.4)$$

e

$$\beta_i = \frac{2\pi d_i}{\lambda} \sqrt{n_i^2 - (n_1 \sin(\theta))^2}. \quad (2.5)$$

2.4 Modos de operação de dispositivos SPR

Na maioria dos casos, implementações práticas de dispositivos SPR são desenvolvidas para operação em dois modos principais: variando o ângulo de incidência da luz com comprimento de onda fixo, chamado modo de interrogação angular; e variando o comprimento de onda da luz com ângulo de incidência fixo, chamado de modo de interrogação de

comprimento de onda. Tipicamente, os dispositivos SPR são construídos numa estrutura de três ou quatro camadas composta por um dielétrico, um metal, e um bioreceptor e uma solução aquosa ou uma apenas solução aquosa. Para o desenvolvimento apresentado nesta seção, um dispositivo SPR de três camadas é considerado.

2.4.1 Modo de interrogação angular

O fenômeno SPR ocorre quando a componente na direção dos plasmons, \vec{k}_x , do campo resultante da incidência da luz oscila com mesma frequência e amplitude da onda de plasmons de superfície. A intensidade do vetor de onda de plasmons, \vec{k}_{sp} , depende da parte real da permissividade do metal, ϵ_{2R} ; do índice de refração da terceira camada, n_3 ; e do comprimento de onda da luz, λ . Sua fórmula é [11]

$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_{2R} n_3^2}{\epsilon_{2R} + n_3^2}}. \quad (2.6)$$

A intensidade da componente resultante da luz na direção do vetor de onda de plasmons é dada por

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin(\theta). \quad (2.7)$$

Igualando (2.6) a (2.7), n_3 pode ser determinado por

$$n_3 = \sqrt{\frac{\epsilon_{2R} (n_1 \sin(\theta_R))^2}{\epsilon_{2R} - (n_1 \sin(\theta_R))^2}}, \quad (2.8)$$

na qual, n_3 é expresso em função do ângulo de ressonância, θ_R .

2.4.2 Modo de interrogação de comprimento de onda

O modo de interrogação por comprimento de onda não é intuitivo, visto que, igualando (2.6) a (2.7), o termo relacionado ao comprimento de onda é cancelado. No entanto, a permissividade dielétrica dos materiais que formam cada camada é dependente do comprimento de onda da luz. Desta forma, (2.6) e (2.7) são reescritas como

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_2(\lambda) \epsilon_3(\lambda)}{\epsilon_2(\lambda) + \epsilon_3(\lambda)}} \quad (2.9)$$

e

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_1(\lambda)} \sin(\theta), \quad (2.10)$$

em que, ω é a frequência angular e c a velocidade da luz e cujas funções dielétricas são dependentes do comprimento de onda da luz. Igualando (2.9) a (2.10), a função dielétrica do meio 3 pode ser determinada em função de λ por

$$\epsilon_3(\lambda) = \frac{\epsilon_2(\lambda) \epsilon_1(\lambda) (\sin(\theta))^2}{\epsilon_2(\lambda) - \epsilon_1(\lambda) (\sin(\theta))^2} = \epsilon_{3R}(\lambda) + j\epsilon_{3I}(\lambda). \quad (2.11)$$

Expandido (2.11) e considerando $\epsilon_2 = \epsilon_{2R} + j\epsilon_{2I}$, após algumas manipulações algébricas, é possível obter [12]

$$\epsilon_3(\lambda) = \left[\frac{\epsilon_{2R}(\lambda) \epsilon_1(\lambda) (\text{sen}(\theta))^2 + \epsilon_{2R}(\lambda) - \epsilon_1(\lambda) (\text{sen}(\theta))^2 + \epsilon_{2I}(\lambda) \epsilon_{2I}(\lambda) \epsilon_1(\lambda) (\text{sen}(\theta))^2}{(\epsilon_{2R}(\lambda) - \epsilon_1(\lambda) (\text{sen}(\theta))^2)^2 + \epsilon_{2I}(\lambda) \epsilon_{2I}(\lambda)} \right] - j \left[\frac{\epsilon_{2R}(\lambda) \epsilon_1(\lambda) (\text{sen}(\theta))^4}{(\epsilon_{2R}(\lambda) - \epsilon_1(\lambda) (\text{sen}(\theta))^2)^2 + \epsilon_{2I}(\lambda) \epsilon_{2I}(\lambda)} \right] \quad (2.12)$$

A partir da qual, o índice de refração n_3 pode ser expresso em função do comprimento de onda de ressonância como [13]

$$n_3 = \sqrt{\sqrt{(\epsilon_{3R}(\lambda_R))^2 + (\epsilon_{3I}(\lambda_R))^2} + \frac{(\epsilon_{3R}(\lambda_R))^2}{2}}. \quad (2.13)$$

A refletividade, R , será escrita em função apenas de θ quando se tratar do modo de interrogação angular e em função apenas de λ quando se tratar do modo de interrogação por comprimento de onda. Exemplos de curvas SPR para os dois modos de operação são exibidos na Figura 2.

2.5 Sensores SPR

De modo geral, um sensor SPR pode ser considerado um dispositivo constituído de múltiplas camadas capaz de detectar variações no índice de refração de uma camada. As características de algumas camadas são escolhidas de forma que ocorra ressonância na faixa de operação do dispositivo. Uma mudança no índice de refração ou na função dielétrica de uma camada resulta numa mudança na condição ressonante do sistema de múltiplas camadas. Essa mudança pode ser determinada observando as novas condições de refletividade da superfície metálica.

Na Figura 3, é exibido um esquema de um sensor SPR composto por quatro camadas. Um sensor SPR compreende um sistema óptico, contendo uma fonte de luz para excitação do fenômeno SPR, uma estrutura de múltiplas camadas para ocorrência de reflexão e absorção de luz, e um conjunto de lentes e espelhos para polarização e direcionamento da luz; um meio transdutor, que interrelaciona os fenômenos (bio)-químicos para o domínio óptico; um sistema de aquisição, composto por um sensor de imagem para captação da luz refletida; e um sistema de processamento de dados. A estrutura de múltiplas camadas é construída de forma que uma destas camadas seja constituída de uma célula de fluxo para passagem de diferentes substâncias e seja possível determinar o índice de refração da substância presente na célula ou variações no índice de refração desta substância. Uma camada metálica interligada a uma camada dielétrica é utilizada para a excitação do fenômeno SPR. Para captação da luz refletida, os sensores de imagem

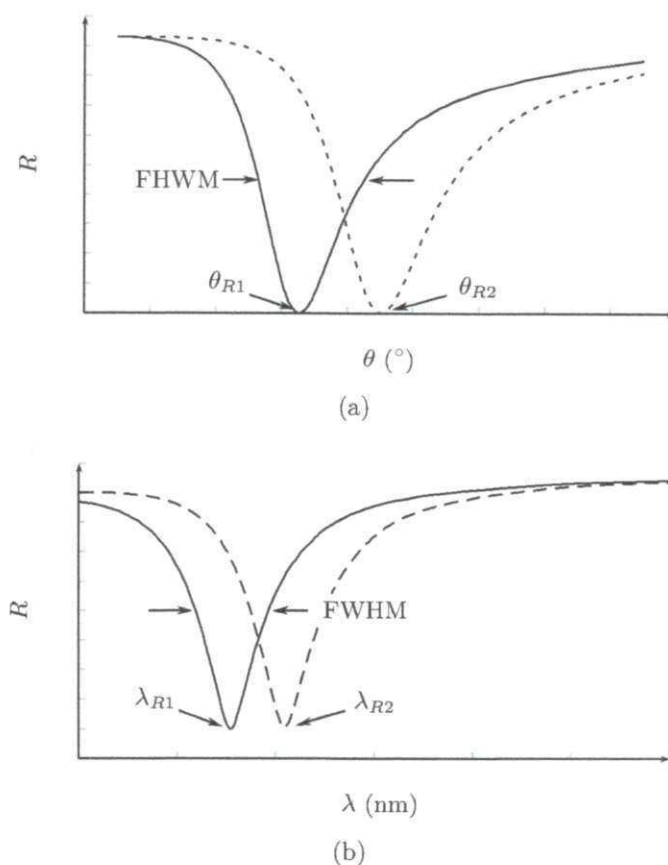


Figura 2 – Curvas de refletividade da superfície como função (a) do ângulo de incidência da luz e (b) do comprimento de onda da luz para duas propriedades ópticas diferentes da terceira camada. A condição ressonante é detectada a partir do mínimo de refletividade. A largura da curva à meia altura, ou FWHM (*Full Width at Half Maximum*), fornece informações adicionais sobre a espessura da camada.

podem conter uma linha (uni-dimensional) ou uma matriz (bi-dimensional) de fotodetectores. Os sensores de imagem mais usuais são sensores CCD (*charge-coupled device*) e sensores CMOS (*complementary metal-oxide-semiconductor*).

Na maioria dos casos, a camada metálica dos sensores SPR é constituída de ouro ou prata porque estes materiais proporcionam a ocorrência da ressonância numa combinação conveniente de comprimento de onda da luz e ângulo de incidência. Além disso, esses metais não sofrem reações com as substâncias bioquímicas tipicamente utilizadas em sensores SPR.

2.5.1 Biosensores SPR

O fenômeno SPR pode ser utilizado para detecção de biomoléculas ou avaliação de reações bioquímicas. Um sensor SPR monitora mudanças no índice de refração pró-

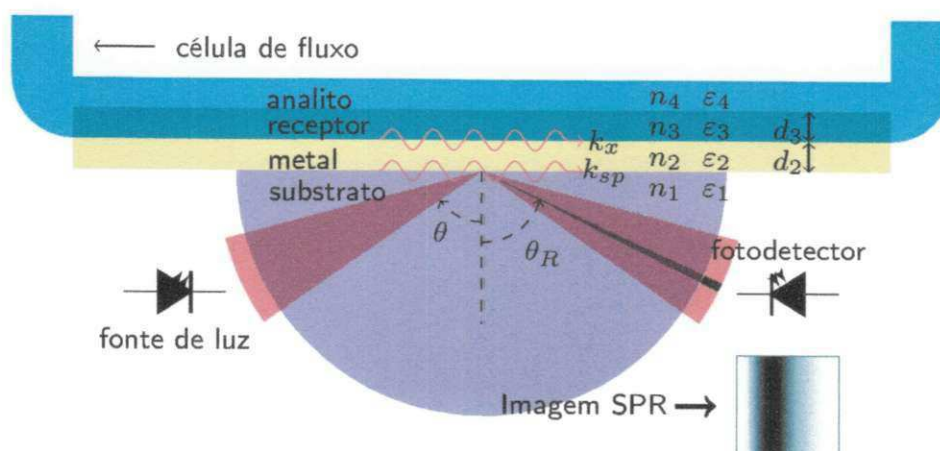


Figura 3 – Esquema de um sensor SPR composto por quatro camadas. A componente k_x entra em ressonância com k_{sp} , resultando em perda de refletividade. A refletividade da superfície metálica é medida usando um conjunto de fotodetectores, que pode compor uma câmera de duas dimensões ou um sensor de linha.

ximo à superfície metálica. Um biosensor SPR é formado por uma camada bioquímica ativa próxima à superfície metálica. Relembrando o esquema exibido na Figura 1, as duas primeiras camadas do dispositivo constituem a interface metal-dielétrico enquanto uma substância bioreceptora que interage com a substância de interesse é imobilizada sobre a superfície metálica, formando assim a terceira camada (bioreceptora) da estrutura de múltiplas camadas. Uma vez montado este conjunto de camadas, uma solução aquosa, na qual, a substância de interesse pode estar presente, é induzida a fluir sobre a terceira camada. A camada bioreceptora é seletiva, de forma que caso a substância de interesse esteja presente na solução, a substância de interesse ficará ligada à camada bioreceptora e isto resultará numa pequena variação no índice de refração desta camada e, conseqüentemente, uma mudança na refletividade da estrutura de múltiplas camadas. Assim, a presença da substância de interesse pode ser determinada rastreando mudanças na refletividade da estrutura de múltiplas camadas em relação a valores de referência conhecidos.

2.5.2 Sensorgrama

Ao se admitir uma nova substância na célula de fluxo, a adesão dessa substância na superfície (adsorção) não ocorre de forma instantânea [14]. O fenômeno de adsorção faz com que as mudanças na condição ressonante sejam contínuas ao longo do tempo. A evolução no tempo (cinética) da condição ressonante fornece informações importantes para a análise da estrutura de múltiplas camadas. A análise da cinética pode ser utilizada para indicar o tipo de reação que ocorre ou se produtos intermediários participam da reação. Por exemplo, ao ocorrer uma reação de ligação na passagem de um analito pelo bioreceptor, a condição ressonante sofre uma variação, conforme ilustrado na Figura 4. Com a análise

da cinética, é possível determinar características importantes da reação, como constantes de equilíbrio e dissociação, assim como determinar os tempos de início e fim da reação além de possíveis anomalias. A análise da cinética é feita com um sensorgrama, que é um gráfico da evolução da condição ressonante ao longo do tempo. O sensorgrama também é útil para realização de ciclos de limpeza ou experimentos controlados.

O sensorgrama pode representar a variação da condição ressonante ao longo do tempo, sendo útil para determinação dos tempos de início e fim de reações ou rotinas controladas, como ciclos de limpeza. Contudo, uma medida mais adequada para a construção de sensorgramas é a variação do índice de refração da camada analisada, Δn_3 , medida em unidade de índice de refração, ou RIU (*Refractive Index Unit*). Na Figura 5, é exibido um exemplo de sensorgrama. Nos tempos múltiplos de 1000s, uma nova substância é admitida na célula de fluxo e uma variação na condição ressonante ocorre. Devido ao fenômeno de adsorção, é esperado que a variação da condição ressonante se comporte como um sistema dinâmico linear de primeira ordem.

Neste trabalho, o objetivo é determinar a condição ressonante os efeitos de adsorção e de reações bio-químicas não são analisados.

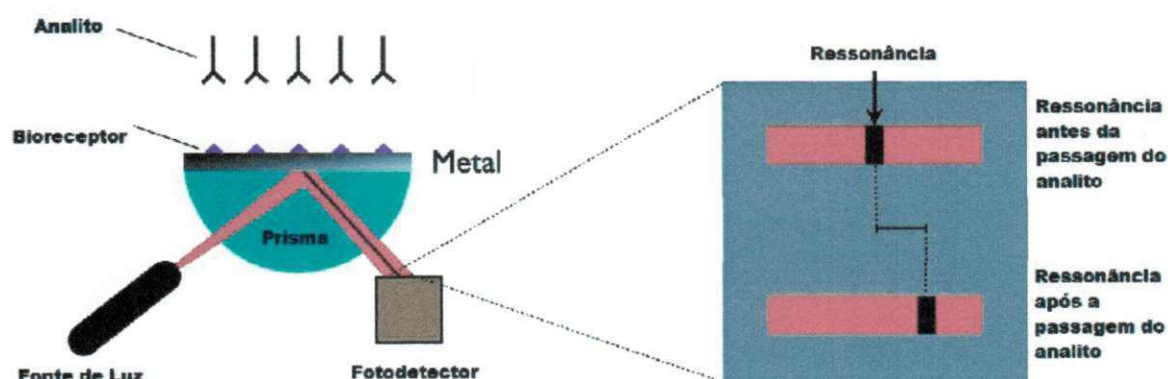


Figura 4 – Ilustração de reação que ocorre em um sensor SPR. A substância presente no analito se liga ao bioreceptor, causando uma mudança nas características ópticas da estrutura e, conseqüentemente, uma mudança na ressonância. As linhas vermelhas representam a resposta de um sensor de linha e a faixa preta nelas indica a condição ressonante. O cada ponto obtido no sensor de linha corresponde a um ângulo de incidência de luz diferente.

2.5.3 Determinação da Condição Ressonante

O rastreamento da condição ressonante é uma etapa crucial em sensores SPR. O rastreamento da condição ressonante é realizado por meio da localização da posição de mínima refletividade a partir de um sinal (imagem ou vetor de uma dimensão) da refletividade da superfície. No entanto, a localização pode ser prejudicada por vários fatores,

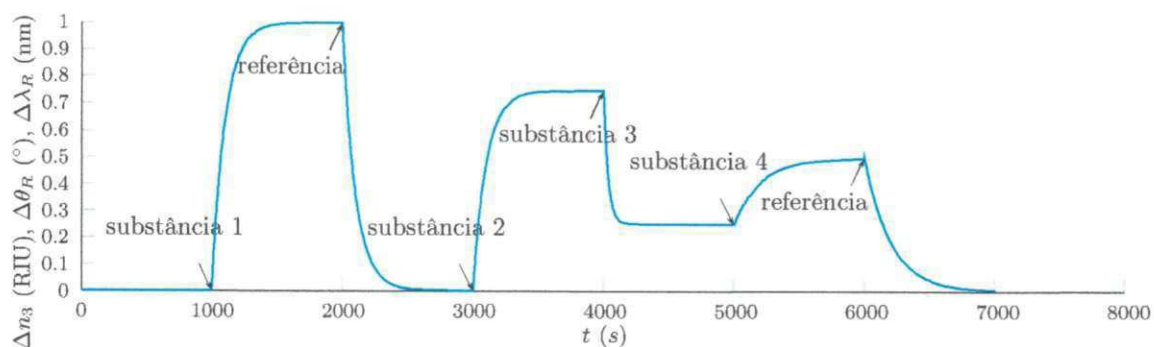


Figura 5 – Exemplo de sensorgrama. A cada intervalo de 1000 segundos, uma substância diferente da anterior é admitida na célula de fluxo. As setas indicam a entrada de uma nova substância. Usualmente, uma substância (e. g., água) é utilizada como referência no começo do experimento e a evolução no tempo da condição ressonante ou do índice de refração são utilizadas para análise.

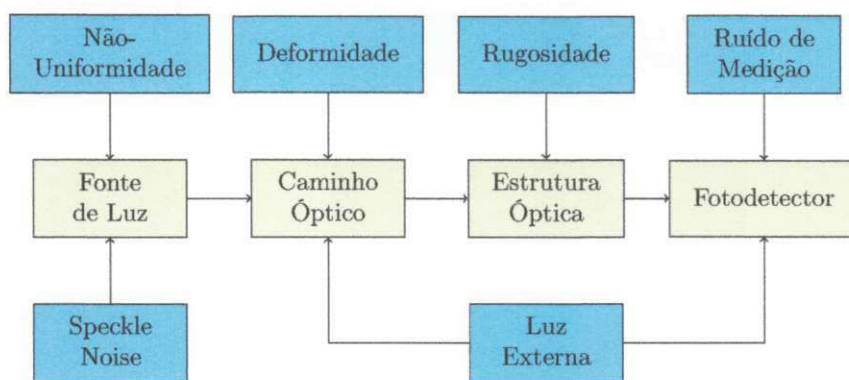


Figura 6 – Diagrama representativo de um sensor SPR e das diversas formas de perturbação que afetam a resposta de um sensor SPR.

sejam eles espaciais, a exemplo de imperfeições no caminho óptico; ou temporais, a exemplo de variações na fonte de luz e no detector óptico, e influência de fatores externos, como luz e temperatura. Um diagrama representativo contendo uma relação simplificada dos fatores que influenciam a resposta de um sensor SPR é exibido na Figura 6. Rugosidade, deformidade e não-uniformidade são perturbações espaciais, que tendem a depender do ângulo de incidência ou do comprimento de onda da luz e podem ser compensadas com um conhecimento amplo de suas características. Os diversos tipos de ruído e a luz externa são perturbações temporais, que afetam a resposta do sensor mas não podem ser compensados pois são influenciados pelo tempo.

2.6 Modelo de perturbação em sensores SPR

A determinação de mudanças de refletividade na estrutura de múltiplas camadas pode ser prejudicada por vários fatores, a exemplo de ruído, imperfeições no caminho óptico e variações na fonte de luz e no detector óptico.

Sobre os aspectos relacionados às perturbações, o modelo descrito por Thirstrup e Zong em seu artigo sobre o centróide com linha base dinâmica [15] foi utilizado. O modelo de perturbação é apresentado para o modo de interrogação angular, no entanto, ele pode ser adaptado para o modo de interrogação por comprimento de onda alterando a variável independente, θ , por λ .

No modelo de perturbação, é considerado que a resposta do fotodetector, $P(\theta, t)$, pode ser expressa como

$$P(\theta, t) = G[\alpha(\theta, t)I_0 + \beta(t)], \quad (2.14)$$

com,

$$\alpha(\theta, t) = R(\theta + \Delta\theta_n(t)) + B'_1(t) + \Delta F(\theta) \quad (2.15)$$

e

$$\beta(t) = B'_0(t) + \Delta N(t), \quad (2.16)$$

em que: G é o fator de ganho do fotodetector; I_0 é a intensidade de luz normalizada; $R(\theta, n_3)$ é a função da refletividade da superfície sob condição de ângulo de incidência θ ; $B'_0(t)$ é uma perturbação de fundo independente da intensidade luminosa, que ocorre devido ao ruído de corrente escura do fotodetector; e $B'_1(t)$ é uma perturbação de fundo dependente da intensidade luminosa, que ocorre devido ao espalhamento da luz e flutuações na intensidade da fonte de luz e no ganho do fotodetector. O termo $\Delta N(t)$ está relacionado com o ruído de quantização do detector e flutuações de corrente escura; $\Delta F(\theta)$ está relacionado com uma perturbação independente do tempo, mas dependente do espaço devido à forma da superfície; e $\Delta\theta_n(t)$ corresponde a um ruído de fase originado da fonte de luz, que emite luz em comprimentos de onda distintos, e caminho óptico não ideal.

2.7 Processamento de Sinais

Para lidar com os diversos tipos de perturbação e monitorar com precisão a condição ressonante, estratégias de processamento de sinais adequadas são necessárias. Essas estratégias ganham uma importância maior quando a necessidade de medições com alta resolução e baixo nível de ruído entra em conflito com a necessidade de construção de dispositivos portáteis, de baixo custo e com capacidade de processamento limitada [16].

O processamento de sinais pode ser considerado o último passo de um experimento envolvendo sensores SPR. A escolha de boas estratégias de processamento é fundamental para melhorar características do sensor, como precisão e relação sinal-ruído [17].

Normalmente, o processamento de sinal em um dispositivo SPR é aplicado em três etapas: normalização, filtragem e detecção. A etapa de normalização é necessária porque, geralmente, *lasers* comerciais são utilizados como fonte de luz em dispositivos SPR e a maioria deles apresenta uma distribuição de intensidade de luz gaussiana espacial na saída. Isso significa que ao se obter um sinal de refletividade na condição de reflexão interna total, este sinal tem o formato de uma curva gaussiana. A etapa de normalização consiste em dividir todas as curvas obtidas por uma curva base da condição de reflexão interna total para compensar a não uniformidade da fonte de luz. A etapa de filtragem aprimora a qualidade dos sinais obtidos pela aplicação de filtros para minimização dos efeitos de ruído. Tipicamente, filtros simples como média e mediana são aplicados nos domínios temporal e espacial. A etapa de detecção consiste em determinar a condição ressonante ou variações na condição ressonante, que é a determinação do ângulo de ressonância ou do comprimento de onda de ressonância. No Capítulo 3, é feita uma discussão a respeito dos principais métodos de processamento para detecção da condição ressonante existentes na literatura.

3 Revisão da Literatura

A determinação rápida e precisa de variações no ponto de ocorrência do fenômeno SPR é de fundamental importância para qualquer sensor SPR. Para garantir um desempenho apropriado de um dispositivo SPR, devem ser utilizados métodos de processamento de dados adequados.

3.1 Métodos de rastreamento da condição ressonante

Na literatura, existem vários estudos focados na criação ou aprimoramento de métodos para rastreamento do ponto de ocorrência do fenômeno SPR. Tais métodos são, majoritariamente, baseados: (i) no método do centróide; (ii) em alguma aproximação da curva SPR obtida por uma função; ou (iii) em extração de características da curva SPR.

3.1.1 Centróide

Um dos métodos mais utilizados para determinação da ressonância de plasmons de superfície é o método do centróide com linha base fixa, que é útil para determinação do ponto máximo ou mínimo de curvas simétricas, a exemplo de curvas polinomiais de segunda ordem ou gaussianas. Para determinar a posição de mínima refletividade, o método do centróide determina o centro geométrico da região da curva SPR abaixo de uma linha base, conforme ilustrado na Figura 7. O valor correspondente ao centro geométrico é

$$C = \frac{\sum_{\theta=\theta_i}^{\theta_f} (\theta L - \theta I[\theta])}{\sum_{\theta=\theta_i}^{\theta_f} (L - I[\theta])}, \quad (3.1)$$

em que: $I[\theta]$ é o valor de intensidade da curva no ângulo θ e L é a linha base. A posição do centro geométrico obtido pela aplicação do método do centróide é utilizada como a posição da condição ressonante.

No entanto, o formato da curva SPR é assimétrico em relação à posição de mínimo da curva SPR, o que faz com que a escolha da linha base interfira no valor do centro geométrico numa curva. Além disso, devido ao formato assimétrico, a posição do centro geométrico não é equivalente à posição de mínimo. Sendo assim, existem muitos trabalhos na literatura com variações do método do centróide para determinação da condição ressonante.

Johansen *et al.* [18] propuseram um método do centróide ponderado para reduzir os erros de linearidade e proporcionar melhor desempenho que o centróide tradicional.

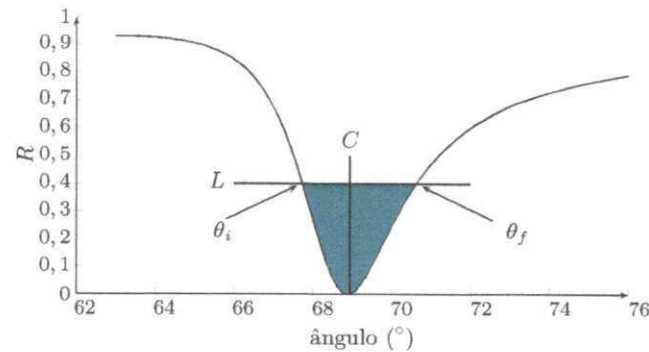


Figura 7 – Esboço ilustrativo para mostrar o conceito básico do algoritmo do centróide. O algoritmo determina o centro de massa de uma região abaixo de uma linha base que é a região hachurada na figura.

Thirstrup e Zong [15] propuseram ajustar a linha base dinamicamente de acordo com parâmetros pré-definidos para aprimorar o desempenho do método do centróide e compensar os efeitos da assimetria da curva. O método de Thirstrup e Zong é insensível a ruído de disparo (*shot noise*) e ruído de plano de fundo, resultantes das variações no ganho do detector de luz e da intensidade da fonte de luz, e da luz ambiente, respectivamente. No entanto, o método de Thirstrup e Zong pode demandar muitas iterações para convergir. Por isso, este método é considerado ineficiente computacionalmente.

Hu e Zhao [19] propuseram manter a linha base fixa e usar o quadrado da distância a partir da linha base para o ponto como peso para este determinado ponto. Sob condições ideais, para uma mesma linha base, o método de Hu e Zhao leva a erros menores que o do centróide tradicional. No entanto, os efeitos da assimetria não são compensados e, em curvas com alto nível de ruído, os efeitos do ruído são amplificados consideravelmente, podendo levar a erros maiores que os erros obtidos utilizando o método do centróide básico.

Zhan *et al.* [20] propuseram um método do centróide para determinação do ponto de ocorrência do fenômeno SPR que não faz uso de linha base. Nesse método, eram escolhidos *a priori* duas faixas de pontos para o uso do centróide. Os autores indicaram seu método como rápido e com erro próximo ao método de Thirstrup e Zong. No entanto, para grandes variações do ponto de mínima refletividade, o método de Zhan *et al.* apresenta um erro elevado.

3.1.2 Funções de interpolação

É possível obter a expressão para a curva SPR em função das variáveis independentes (ângulo de incidência ou comprimento de onda da luz) a partir dos modelos existentes. No entanto, a expressão é complexa e seu nível de complexidade aumenta exponencialmente à medida que aumenta o número de camadas da estrutura. Por isso, vários trabalhos encontrados na literatura têm como foco o uso de expressões mais simples como forma de

ajuste da curva SPR e determinação da ressonância.

Em suas análises, muitos autores consideram uma aproximação Lorentziana para a curva SPR, expressa como

$$R_L(x) = \frac{1 - A}{(x - B)^2 + C^2} \quad (3.2)$$

em que, os parâmetros A , B e C devem ser determinados para o ajuste da curva e x representa a variável independente (ângulo de incidência ou comprimento de onda, dependendo do modo de operação). Essa aproximação serve, inclusive, para realizar análises teóricas das camadas no projeto de um sensor SPR [21]. No entanto, a aproximação Lorentziana é simétrica em relação à condição ressonante e não equivalente a curvas SPR reais.

Chinowsky *et al.* [22] estabeleceram que, para pequenas variações nos parâmetros da estrutura multicamada, é possível determinar qualquer parâmetro da estrutura por meio de uma projeção linear ótima a partir dos dados obtidos. Contudo, essa estratégia requer conhecimentos detalhados dos elementos que compõem o biosensor, como características da fonte de luz e do fotodetector e até mesmo das fontes de perturbações.

Kurihara *et al.* [23] partiram do modelo de Fresnel de três camadas e, após diversas aproximações e simplificações, obtiveram uma expressão matemática não-linear cuja forma se assemelha muito à de uma curva SPR para o modo de interrogação angular. A expressão obtida pode ser utilizada para fazer um ajuste de uma curva SPR e fornecer características importantes, como largura, amplitude e assimetria da curva SPR, e posição e profundidade do ponto de mínima refletividade. Para realização do ajuste da curva, K. Kurihara *et al.* sugeriram usar o bem estabelecido algoritmo de Levenberg-Marquardt [24]. Como limitações para aplicação de tal método nota-se que o ajuste utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt requer um tempo elevado para convergir ou a possibilidade de o algoritmo convergir para um mínimo local.

Tobiska e Homola [25] propuseram uma função parametrizada não-linear semelhante à de Kurihara *et al.* para o método de interrogação de comprimento de onda. Diferentemente de Kurihara *et al.*, que derivaram sua equação apenas para uma estrutura de três camadas, Tobiska e Homola mostraram que a sua equação pode ser aplicada a estruturas com diferentes números de camadas. Assim como Kurihara *et al.*, Tobiska e Homola sugeriram utilizar o algoritmo de Levenberg-Marquardt para realização do ajuste da curva, resultando nas mesmas limitações da proposição de Kurihara *et al.*

Karl e Pien [26] propuseram utilizar um estimador de máxima verossimilhança para determinar as variações na posição da mínima refletividade. O estimador de Karl e Pien usava a forma conhecida da curva SPR para determinar mudanças na posição de mínima refletividade. O estimador proposto por Karl e Pien não é robusto a ruídos de disparo e de fundo. Além disso, muitas iterações podiam ser necessárias para convergência do método.

Hastings [27] propôs algumas mudanças no estimador de máxima verossimilhança de Karl e Pien para torná-lo mais robusto aos ruídos de disparo e de plano de fundo. Mesmo assim, a abordagem usada por Karl e Pien e Hastings considera que as curvas SPR são exatamente iguais, o que não é verdade na prática.

Wang *et al.* [28] estudaram formas de otimizar o rastreamento do ponto de mínima refletividade por meio de aproximações por funções polinomiais. Os autores afirmaram que funções de ordem maior que três não melhoram a qualidade do processamento e propuseram uma forma de limitar a faixa de valores utilizada para o ajuste polinomial.

Chen e Wang [29] usaram a transformada de Hilbert-Huang para monitorar variações no índice de refração de uma camada. Os autores relataram que, com a aplicação do algoritmo, é possível aprimorar a relação sinal-ruído e o limite de detecção.

Xie *et al.* [30] propuseram algoritmo de fusão de dados *Maximum a Posteriori* (MAP) para estimar a curva SPR e a posição de mínima refletividade. Segundo os autores, o método é bom para remover incertezas e aprimorar a densidade amostral da curva SPR. No entanto, a mesma curva precisa ser amostrada diversas vezes para se obter um bom resultado e certas formas de ruído correlacionados ao caminho óptico podem prejudicar os resultados.

Sereda *et al.* [31] utilizaram a equação desenvolvida por Kurihara *et al.* [23] e determinaram uma faixa de pontos igualmente espaçados ótima para aplicação da equação no modo de interrogação por comprimento de onda. Os autores relataram que aumentar o número de pontos para estimação da curva diminui o nível de ruído, mas aumenta a incerteza (erro) da curva estimada. Uma estimativa inicial da posição de mínimo pode ser utilizada como um ponto central e reduzir o número de comprimentos de onda utilizado.

Ghasemi *et al.* [32], apresentaram fórmulas fechadas para o erro de estimação na detecção da ressonância. Os autores afirmaram que as fórmulas otimizam consideravelmente o processo de detecção de ressonância. No entanto, as fórmulas foram desenvolvidas apenas para o caso simples de uma aproximação polinomial quadrática para detecção da ressonância. Além disso, tais fórmulas não foram aplicadas experimentalmente, visto que os autores fizeram apenas uma análise teórica delas.

3.1.3 Outras abordagens

Em adição aos métodos baseados no centróide e em aproximações por funções, existem outras abordagens para determinação da condição ressonante.

Partindo de algumas características da curva SPR, Owega e Poitras [33] estabeleceram que a posição de mínima refletividade pode ser rastreada com base numa correspondência de similaridade local. No entanto, esta abordagem é sensível à escolha de parâmetros por parte do usuário e, em condições ideais, leva a erros maiores que os mé-

todos tradicionais.

Souza Filho *et al.* [34] analisaram que mudanças na condição ressonante também podem ser verificadas com base nas características da curva SPR, a exemplo da largura e da assimetria. Todavia, estas características não são tão fáceis de obter na prática devido às diferenças entre curvas SPR teóricas e experimentais.

Karabchevsky *et al.* [35] propuseram utilizar a transformada de Radon para extrair a posição de mínima refletividade de uma imagem SPR (processamento em duas dimensões). Karabchevsky *et al.* relataram seu método como rápido. No entanto, são realizadas operações de grande complexidade computacional, como a transformada de Radon e medianas com 900 pontos numa imagem 900×800 pixels, e não foi realizada análise do desempenho computacional do método, o que leva a questionar a sua eficiência.

Geng *et al.* [36] montaram um esquema para gerar curvas SPR semiperiódicas. Eles propuseram utilizar a transformada de Fourier nessas curvas semiperiódicas para rastrear a condição de ressonância. Geng *et al.* não demonstraram porque seu método funciona e utilizaram-no apenas para detectar mudanças na estrutura multicamadas, não quantificando estas mudanças.

3.2 Conclusão

Apesar da existência de diversos métodos para rastreamento da condição ressonante, cada abordagem de processamento apresenta limitações, seja em relação à complexidade computacional; à rejeição de perturbações; ou aos erros na determinação da posição de mínima refletividade. Nos capítulos seguintes, diferentes abordagens são propostas como forma de superar essas limitações.

4 Aproximação por Função Cossenoidal

Neste capítulo, as características morfológicas da curva SPR são exploradas de forma que é possível determinar a variação do ponto de mínima refletividade a partir de aproximações por funções cossenoidais dos dados experimentais obtidos. Esta abordagem leva a uma solução eficiente computacionalmente e possibilita a determinação da variação da posição de mínimo numa única iteração com robustez e precisão.

4.1 Descrição do método

Para a análise apresentada nesta seção, será considerado que apenas o índice de refração da camada biológica é alterado (i.e., a terceira camada na Figura 8). A variável x é utilizada como um indexador para ambos, o ângulo de incidência da luz, θ , se considerado o modo de interrogação angular; ou o comprimento de onda da luz, λ , se considerado o modo de interrogação por comprimento de onda.

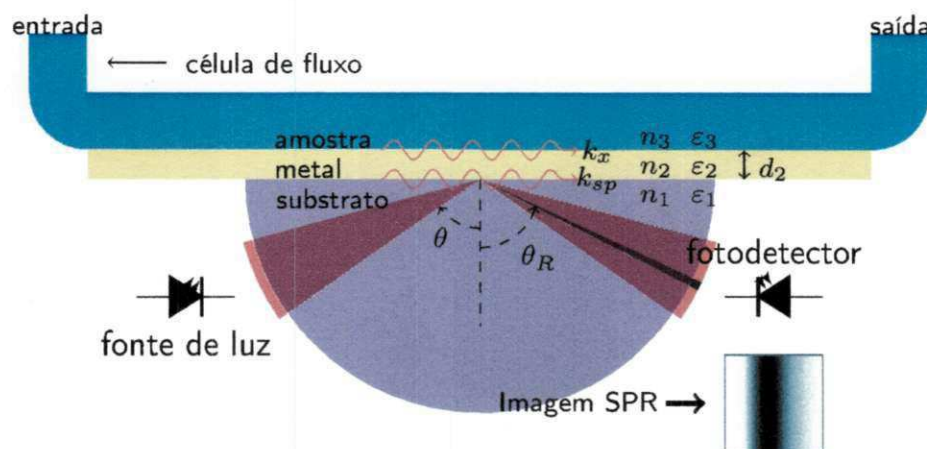


Figura 8 – Estrutura representativa de um sensor SPR de três camadas.

4.1.1 Morfologia da curva SPR

A função que representa uma curva SPR, obtida a partir de uma estrutura de múltiplas camadas para um dado índice de refração da terceira camada, pode ser expressa como $R_1(x)$, em que, x representa um indexador de um ponto na variável controlada (ângulo de incidência da luz ou comprimento de onda da luz, dependendo do modo de operação) sobre a curva SPR. Ao mudar o índice de refração da terceira camada, haverá mudanças na curva SPR, no entanto, a morfologia da curva é, essencialmente, a mesma, conforme ilustrado na Figura 9. Apesar da mesma morfologia, são observadas mudanças

na posição e intensidade do mínimo, e mudanças na profundidade e na largura da curva. A variação de largura da curva é proporcional à variação na posição de mínimo. Com base nessas mudanças, é possível representar a nova curva SPR, $R_2(x)$, baseada em $R_1(x)$, por meio da seguinte transformação

$$R_2(x) = AR_1(ax + ax_0) + B, \quad (4.1)$$

na qual: A , B , a , e x_0 são parâmetros reais e constantes (e, usualmente, desconhecidos). O parâmetro A está relacionado com a mudança de profundidade da curva, o parâmetro B corresponde à variação na intensidade de mínima refletividade, o parâmetro a representa um escalonamento na curva ($\text{FWHM2} = a\text{FWHM1}$), e o parâmetro x_0 está relacionado ao deslocamento da posição do mínimo.

4.1.2 Aproximação da curva SPR por uma função cossenoidal

Para determinar a variação da posição de mínima refletividade, será considerado que uma curva SPR pode ser aproximada por [37]

$$R(x) \approx \text{Re}[\mathbf{R}(x)] \quad (4.2)$$

em que, \mathbf{R} representa uma função complexa cossenoidal, expressa por

$$\mathbf{R}(x) = ce^{j\left(\frac{2\pi}{X}\right)x}. \quad (4.3)$$

O coeficiente ótimo, c , em termos de minimização do erro médio quadrático para tal aproximação, é determinado pela projeção de $R(x)$ em $e^{j\left(\frac{2\pi}{X}\right)x}$

$$c = \sum_{x=1}^X R(x) e^{-j\left(\frac{2\pi}{X}\right)x}, \quad (4.4)$$

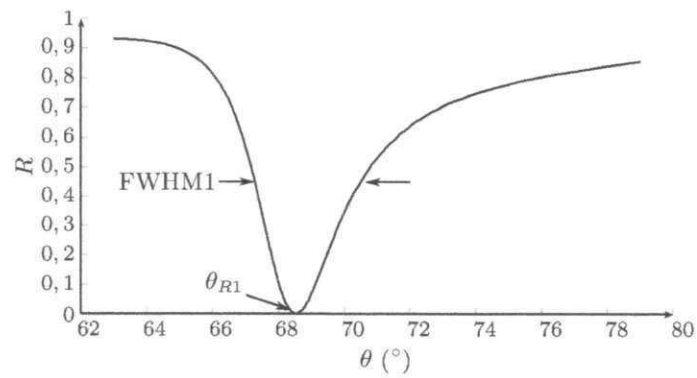
em que, X é o número de pontos (x varia de 1 a X) (ver Figura 10; j é a unidade imaginária ($j = \sqrt{-1}$); e E é uma constante, visto que o somatório do denominador é constante. O coeficiente c é complexo e, portanto, pode ser expresso como

$$c = C\angle\Phi, \quad (4.5)$$

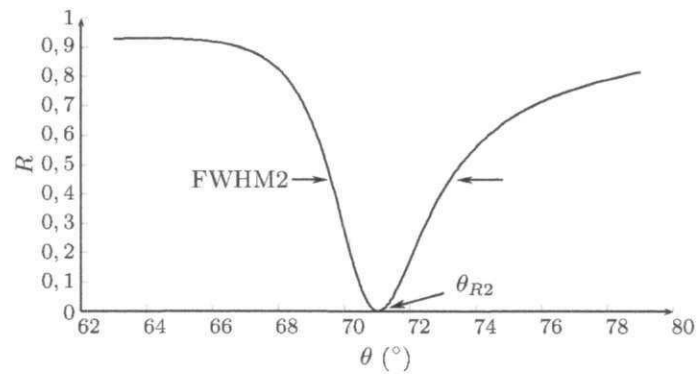
em que, C é a amplitude da cossenoide e

$$\Phi = \tan^{-1} \left(\frac{\text{Im}(c)}{\text{Re}(c)} \right) \quad (4.6)$$

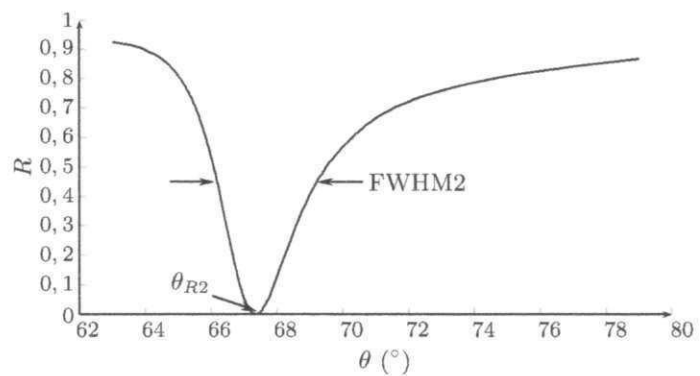
é o ângulo de fase da cossenoide. É importante observar que o valor médio é desconsiderado na aproximação.



(a)



(b)



(c)

Figura 9 – Gráfico da refletividade da superfície para diferentes valores do índice de refração da terceira camada. As mudanças de largura da curva e da posição de mínima refletividade são perceptíveis. As curvas são exibidas para representar variações (b) positivas ou (c) negativas no índice de refração.

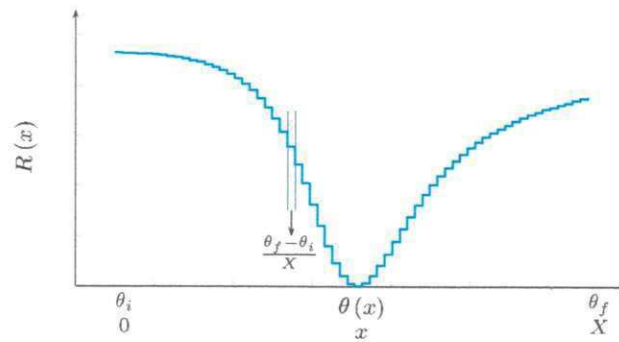


Figura 10 – Curva SPR discreta com uma indicação da relação entre ângulo e indexador.

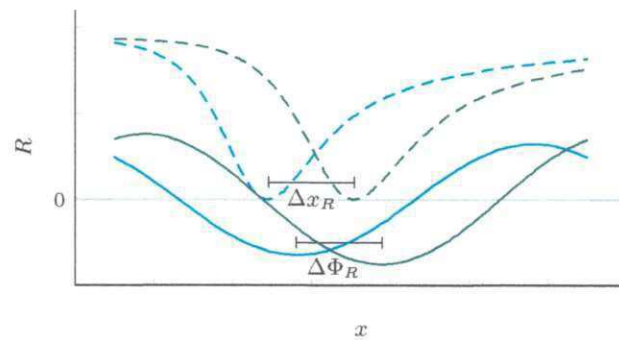


Figura 11 – Curvas SPR (tracejadas) e suas aproximações por cossenoides. A diferença entre as posições de mínimo das curvas SPR é similar às diferença de fase das cossenoides.

4.1.3 Rastreamento de mudanças na posição de mínima refletividade

As curvas SPR não se parecem com as cossenoides e as posições de mínimo das curvas SPR são diferentes das posições de mínimo das cossenoides. Na Figura 11, são exibidas curvas SPR e suas aproximações por uma função cossenoidal. No entanto, a diferença entre as posições de mínimo das curvas SPR é similar à diferença entre as posições de mínimo das cossenoides e, conseqüentemente, da diferença de fase entre elas. A diferença de fase pode ser utilizada para se determinar a diferença de mínimo entre as curvas SPR.

A aproximação definida em (4.2) é, essencialmente, uma expansão em séries de Fourier considerando apenas a primeira harmônica. Utilizando $R_1(x)$ como uma curva SPR de referência e considerando as propriedades da transformada de Fourier e a transformação apresentada em (4.1), a fase, Φ_2 , obtida a partir da aproximação de $R_2(x)$ por uma cossenóide pode ser expressa em função da fase de referência, Φ_1 , por

$$\Phi_2 = a\Phi_1 + ax_0. \tag{4.7}$$

Calculando a diferença de fase entre as cossenoides,

$$\Delta\Phi_R = \Phi_2 - \Phi_1, \tag{4.8}$$

obtem-se

$$\Delta\Phi_R = (a - 1)\Phi_1 + ax_0. \quad (4.9)$$

O termo $(a - 1)$, corresponde exatamente à variação no comprimento da curva, que, conforme mostrado nos resultados de simulação apresentados mais adiante neste capítulo (Figura 12(b) Figura 15(b)), é quase linearmente proporcional a variação da posição de mínima refletividade. Assim,

$$(a - 1)\Phi_1 \propto ax_0 \quad (4.10)$$

ou

$$\gamma ax_0 = (a - 1)\Phi_1, \quad (4.11)$$

em que, γ é uma constante de proporcionalidade obtida a partir da relação entre $a\Delta x$ e $(a - 1)\Phi_1$. Portanto, a variação de posição na mínima refletividade pode ser expressa como

$$\Delta x_R^P = ax_0 = \frac{\Delta\Phi_R}{(1 + \gamma)}. \quad (4.12)$$

De forma que, conhecendo a constante γ e a diferença de fase $\Delta\Phi_R$, é possível rastrear variações na posição de mínima refletividade, representadas por Δx_R^P . É importante notar que esta abordagem serve apenas para determinar variações na condição ressonante, sendo necessária uma calibração prévia para utilização de uma condição de referência.

4.2 Análise do efeito das perturbações

Observando (4.12), é possível notar que o resultado final não depende dos parâmetros A e B . Isto significa que, usando a técnica proposta, a amplitude e o nível DC dos sinais obtidos não influenciam o resultado.

Para analisar os efeitos das fontes de perturbação, o modelo apresentado na seção 2.6 foi utilizado. Os ruídos de fundo, $B'_0(t)$ e $B'_1(t)$, são classificados como de variação lenta e podem ser considerados constantes durante a aquisição de uma curva SPR. Observando as Equações 2.14; 2.15; e 2.16, é possível ver que $B'_0(t)$ e $B'_1(t)$ afetam $P(\theta, t)$ como um nível DC e o parâmetro G afeta $P(\theta, t)$ como um multiplicador constante (ganho em amplitude). Portanto, esses parâmetros podem ser desconsiderados desde que o nível DC e o ganho em amplitude não afetam o resultado final quando se usa a abordagem proposta. Os termos $\Delta F(\theta)$ e $\Delta N(t)$ podem ser combinados em um único termo, $\Delta W(\theta, t)$, modelado como um ruído branco gaussiano de média nula. Portanto, para a análise que utiliza o método proposto, considerando a intensidade de luz normalizada ($I_0 = 1$), a resposta do fotodetector pode ser reescrita como

$$P^*(\theta, t) = R(\theta + \Delta\theta_n(t)) + \Delta W(\theta, t). \quad (4.13)$$

A aproximação definida em (4.2) contém uma componente de uma única frequência. Portanto, o processamento do sinal usando o método proposto contém, implicitamente, um filtro passa baixa de altíssima qualidade.

4.3 Resultados de simulações

Para verificar a aplicabilidade do método descrito, foram desenvolvidas simulações digitais com base no modelo de Fresnel (descrito na seção 2.3) para calcular a refletividade de uma estrutura de múltiplas camadas. As simulações foram desenvolvidas para os dois modos de operação principais: modo de interrogação angular e modo de interrogação por comprimento de onda. Foi considerado um sistema com quatro camadas composto por: copolímero de olefina cíclica (COC-TOPAS); ouro; uma camada cujo índice de refração foi variado, podendo ser considerada a camada biológica; e uma camada de água, usada para representar a parte aquosa de uma solução. Nas simulações, foram analisadas as variações dos parâmetros, o erro de detecção e a estabilidade dos dados na presença de perturbações.

Para avaliar a influência das perturbações e a estabilidade dos resultados obtidos a partir do uso do método proposto, foi utilizado o Desvio Quadrático Médio (DQM) com relação à condição ideal para curvas perturbadas sob o modelo de perturbação descrito na seção 2.6. O DQM é calculado por

$$\sigma_{\Delta\theta_R^P}^2(n_3) = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M [\Delta\theta_R^T(n_3) - \widehat{\Delta\theta_P^R}(i)]^2, \quad (4.14)$$

em que, $\Delta\theta_R^P(n_3)$ representa a variação na condição ressonante calculada utilizando o método proposto em condições ideais (sem perturbações) e $\widehat{\Delta\theta_P^R}(i)$ representa a i -ésima estimativa da variação na condição ressonante obtida utilizando o método proposto na presença de perturbações.

4.3.1 Modo de interrogação angular

Para o modo de interrogação angular, foi considerado um comprimento de onda da luz fixo, $\lambda = 670\text{nm}$, e o ângulo de incidência da luz, θ , variando de 63° a 79° em passos de $0,015625^\circ$. Foi utilizada uma estrutura de quatro camadas e os valores dos parâmetros da estrutura são exibidos na Tabela 1. Nas simulações, o índice de refração, n_3 , foi variado de 1,33 a 1,37 em passos de 0,001. Os valores escolhidos são condizentes com os equipamentos utilizados para a realização experimental.

Na Figura 12(a), é mostrado um conjunto de curvas SPR obtidas para diferentes valores do índice de refração, n_3 . Na Figura 12(b), a variação da largura da curva (*i.e.* FWHM) em função da variação na posição de mínima refletividade para diferentes valores

Tabela 1 – Parâmetros da estrutura de múltiplas camadas usados no modelo de simulação. As espessuras das camadas externas (1 e 4) são muito maiores que as espessuras das camadas internas e são consideradas infinitas.

camada	composição	índice de refração	largura (nm)
1	TOPAS	$n_1 = 1,526$	$d_1 = \infty$
2	fina camada de ouro	$n_2 = 0,161 + 3,787j$	$d_2 = 50$
3	biocamada	$n_3 = 1,33$ a $1,37$	$d_3 = 400$
4	água	$n_4 = 1,333$	$d_4 = \infty$

do índice de refração, n_3 , é exibida. A partir da Figura 12(b), é possível perceber que a largura da curva, que está relacionada com o parâmetro a em (4.1), está linearmente relacionada com a variação na posição do mínimo, o que foi considerado em (4.10) e (4.11).

As variações do ângulo de ressonância obtida a partir da busca do ponto de mínima refletividade nas curvas SPR sem ruído são chamadas de verdadeiras. O erro de detecção para os outros métodos é calculado com relação ao caso verdadeiro utilizando a seguinte expressão para o modo de interrogação angular

$$\delta_{\Delta\theta_R}(n_3) = \Delta\theta_R^T(n_3) - \Delta\theta_R^*(n_3). \quad (4.15)$$

em que, $\Delta\theta_R^T(n_3)$ é a variação do ângulo de ressonância para o caso verdadeiro e $\Delta\theta_R^*(n_3)$ é a variação do ângulo de ressonância estimada utilizando algum método de determinação.

Na Figura 13, são exibidos os gráficos da variação do ângulo de ressonância para os casos “verdadeiro”, estimada utilizando o método do centróide ($\Delta\theta_R^C$) e estimada utilizando o método proposto ($\Delta\theta_R^P$). Em todos os casos, a variação na posição do mínimo foi determinada com base em curvas SPR ideais (livres de perturbação). É importante lembrar que, com exceção do método do centróide quadrático, todos os métodos do centróide levam a resultados semelhantes quando as curvas processadas são livres de perturbação. Na Figura 13(b), são exibidos os gráficos do erro (valor verdadeiro – valor calculado) de determinação das variações do ângulo de ressonância determinadas utilizando o método do centróide e o método proposto. Os erros na determinação do índice de refração usando o método proposto são menores que usando o método do centróide.

Na Tabela 2, são mostrados os valores obtidos da DQM para o método proposto relativos à condição ideal para curvas perturbadas sob o modelo de perturbação descrito na seção 2.6. Os termos de perturbação, $\Delta\theta_N$ e ΔN , foram gerados com uma distribuição Gaussiana de média nula e variâncias $\sigma_{\Delta\theta_N}^2$ e $\sigma_{\Delta N}^2$. Para determinação da variação do mínimo com o método proposto, nenhuma estratégia de aprimoramento do sinal foi

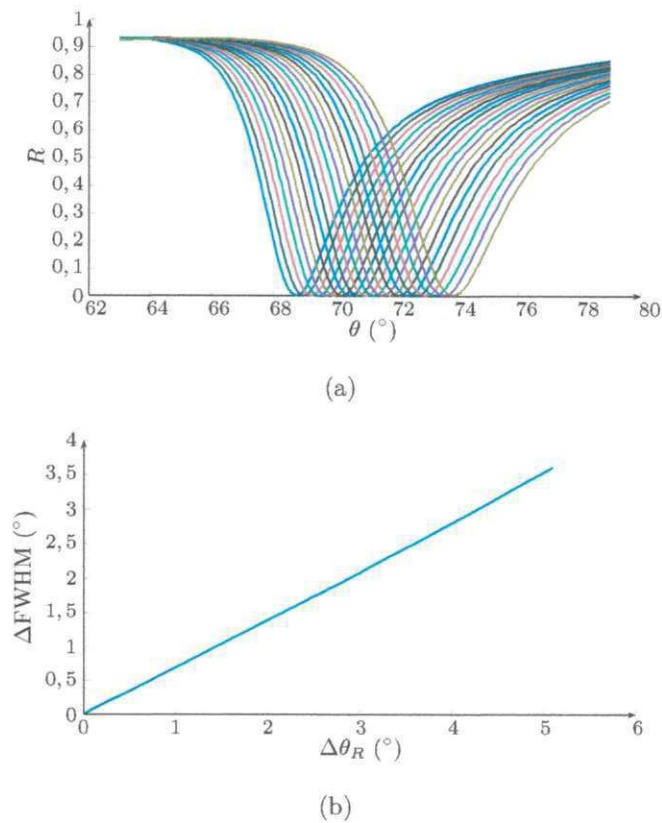
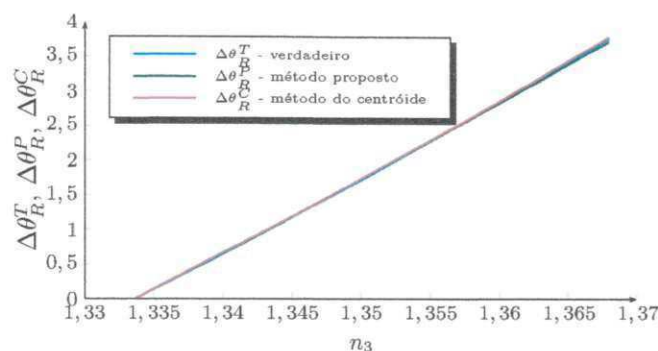


Figura 12 – (a) Refletividade do sistema de múltiplas camadas para diferentes valores de n_3 . As curvas sofrem um deslocamento para a direita a medida que se aumenta valor de n_3 , a curva mais à esquerda foi calculada com $n_3 = 1,33$ e a curva mais à direita foi calculada com $n_3 = 1,37$. Estas curvas foram utilizadas para calcular a relação entre a variação de largura e a variação da posição de mínima refletividade. (b) Mudança na FWHM em função da posição de mínima refletividade para as curvas apresentadas na (a).

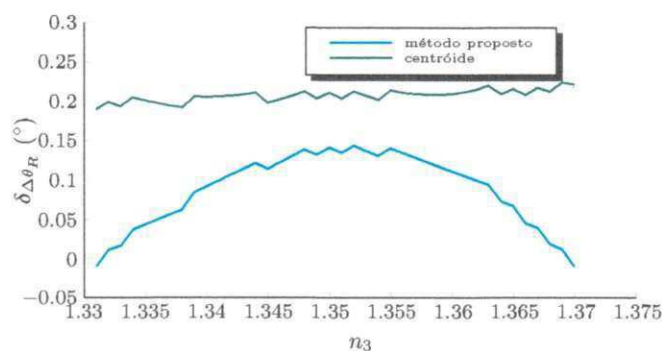
utilizada. Para representar uma situação mais próxima da real, nas simulações, os sinais obtidos foram saturados contendo valores entre 0 e 1. Cada DQM na Tabela 2 foi calculado usando 1000 curvas SPR geradas para cada índice de refração. A partir da Tabela 2, é perceptível que o método proposto apresenta capacidade de rejeição de ruído, visto que o DQM é significativamente baixo se comparado com a resolução do sensor (0,0156).

4.3.2 Interrogação por comprimento de onda

Para o modo de interrogação por comprimento de onda, a dependência óptica em relação ao comprimento de onda da luz nos materiais empregados na estrutura de múltiplas camadas foi considerada. Sabendo que o TOPAS começa a transmitir a partir de 390nm, o comportamento das propriedades ópticas em função do comprimento de onda são exibidos na Figura 14. A figura também contém a função dielétrica da camada de ouro em função do comprimento de onda da luz utilizando o conjunto de dados experimentais



(a)



(b)

Figura 13 – Resultados das simulações para determinação da condição ressonante (a) Determinação da variação no ângulo de ressonância para materiais com diferentes índices de refração. (b) Erro na determinação da variação do ângulo de ressonância obtidos com o uso do método proposto e o método do centróide.

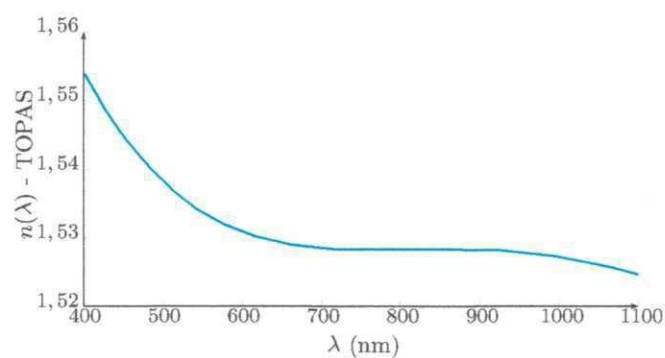
Tabela 2 – Efeito do ruído sobre a detecção da variação da posição de mínimo obtida com o método proposto.

DQM	$\sigma_{\Delta\theta_N}^2 = 0$	$\sigma_{\Delta\theta_N}^2 = 0,1$	$\sigma_{\Delta\theta_N}^2 = 0,2$	$\sigma_{\Delta\theta_N}^2 = 0,3$
$\sigma_{\Delta N}^2 = 0$	–	0,013	0,023	0,381
$\sigma_{\Delta N}^2 = 0,1$	0,001	0,014	0,030	0,387
$\sigma_{\Delta N}^2 = 0,2$	0,002	0,019	0,074	0,403
$\sigma_{\Delta N}^2 = 0,3$	0,003	0,027	0,091	0,410

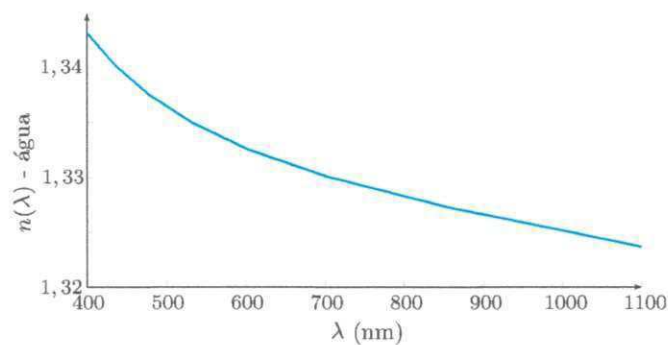
de Jhonson e Christy [38].

Nas simulações, foi considerado um ângulo de incidência da luz fixo, $\theta = 68^\circ$ e o comprimento de onda da luz, λ , foi variado de 600nm a 1.400nm em passos de 0,9765nm. O índice de refração, n_3 , foi variado de 1,33 a 1,37, em passos de 0,001. Os valores escolhidos são condizentes com os equipamentos utilizados para a realização experimental.

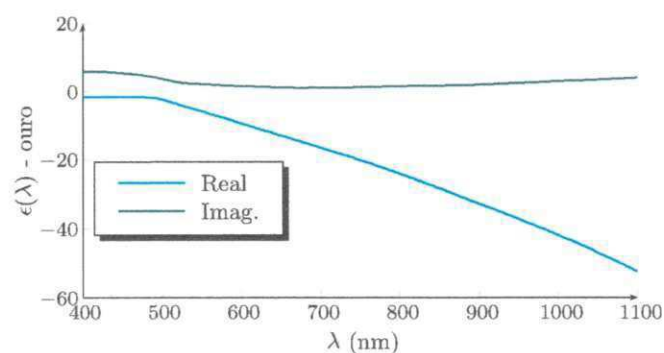
Na Figura 15(a), é apresentado um conjunto de curvas SPR para diferentes valores



(a)



(b)



(c)

Figura 14 – Dispersão dos materiais utilizados na estrutura de múltiplas camadas. Índice de refração como uma função do comprimento de onda para (a) TOPAS e (b) água desgaseificada e desionizada. (c) Função dielétrica do ouro em função do comprimento de onda

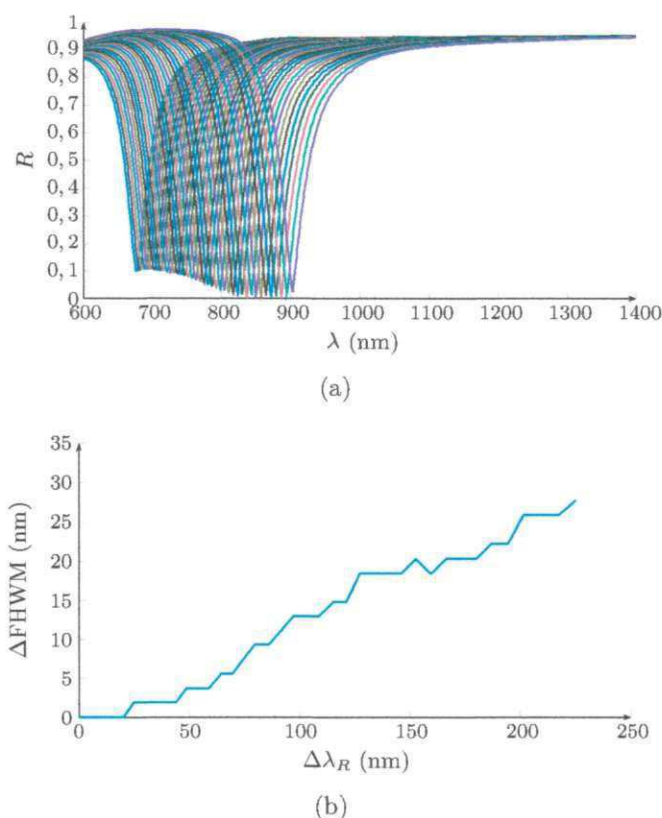


Figura 15 – (a) Refletividade do sistema multicamadas para diversos valores de n_3 . As curvas sofrem um deslocamento para a direita à medida que se aumenta valor de n_3 . A curva mais à esquerda foi calculada com $n_3 = 1,33$ e a curva mais à direita foi calculada com $n_3 = 1,37$. As curvas foram utilizadas para calcular a relação entre a variação de largura e a variação da posição de mínima refletividade. (b) Variação da largura da curva em função da variação da posição de mínima refletividade para as curvas apresentadas em (a).

do índice de refração da terceira camada, n_3 . Na Figura 15(b), é apresentado o gráfico da variação da largura da curva (FWHM) em função da variação do ponto de mínima refletividade para diferentes valores do índice de refração, n_3 . Pela Figura 15(b), é possível notar que a variação da largura da curva, que está relacionada com o parâmetro a em (4.1), é quase linearmente relacionada à mudança de posição de mínima refletividade, o que foi considerado em (4.10) e na (4.11).

Na Figura 16, são mostrados os gráficos da variação no comprimento de onda de ressonância para os casos “verdadeiro” ($\Delta \lambda_R^T$), estimado usando o método do centróide ($\Delta \lambda_R^C$) e estimada usando o método proposto ($\Delta \lambda_R^P$). Em todos os métodos, a variação na posição do mínimo foi determinada com base em curvas SPR ideais (livres de perturbações).

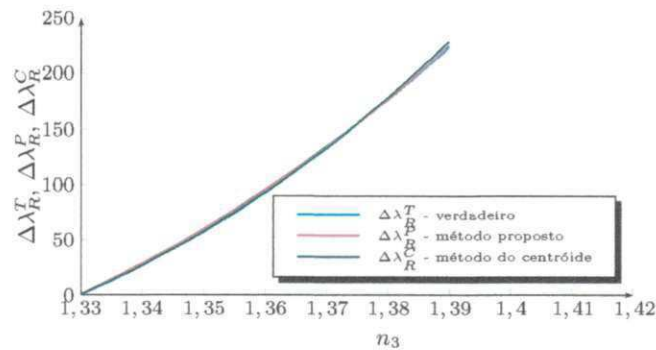


Figura 16 – Resultados de simulações para determinação da condição ressonante no modo de interrogação por comprimento de onda para materiais com diferentes índices de refração.

4.3.3 Aspectos computacionais

Em termos gerais de complexidade, para processar uma curva com 1024 pontos, o método de aproximação por função cossenoidal requer até 4103 FLOPS (*F*loating-*P*oint *O*perations *P*er *S*econd). Para processar a mesma curva com 1024 pontos, o método do centróide com linha base fixa requer até 5124 FLOPS. É importante comentar que a aplicação do método do centróide requer um aprimoramento prévio da qualidade dos sinais obtidos, resultando em um custo computacional maior.

4.4 Resultados experimentais

Para demonstrar a aplicabilidade do método proposto, experiências com soluções de diferentes índices de refração foram realizadas. As substâncias utilizadas nos experimentos foram água degaseificada e desionizada (H₂O) e soluções de álcool isopropílico. Para ambos os modos de operação, interrogação angular e por comprimento de onda, as curvas SPR foram obtidas para H₂O, e soluções com álcool a concentrações de 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 70%.

Para analisar a estabilidade do método, foram calculadas a média e a variância nas regiões em regime permanente do sensorgrama, calculadas, respectivamente, como

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \sum_{t=t_c-\Delta t}^{t_c} \Delta n_3(t) \quad (4.16)$$

e

$$\sigma^2 = \frac{1}{\Delta t} \sum_{t=t_c-\Delta t}^{t_c} [\mu - \Delta n_3(t)]^2, \quad (4.17)$$

em que, t_c corresponde aos tempos finais da presença de substância na célula de fluxo a cada concentração, e Δt a faixa de tempo utilizada para cálculo.

4.4.1 Modo de interrogação angular

Fotografias do equipamento utilizado nos experimentos para o modo de interrogação angular são exibidas na Figura 17. O sistema óptico usa um elemento de acoplamento óptico difrativo, ou DOCE (*Diffractive Optical Coupling Element*), desenvolvido por Thirstrup *et al.* [11]. Um laser, comercializado pela Thorlabs, com controle de corrente e temperatura (consequentemente de potência, ou intensidade luminosa) foi utilizado como fonte de luz ($\lambda = 670\text{nm}$). Lentes colimadora, para direcionar os raios luminosos, e polarizadora, permitindo a passagem da luz numa única polarização (paralela ao plano de incidência) foram utilizadas. Para movimento das soluções, uma bomba peristáltica REGLO, comercializada pela Ismatec, foi utilizada. Os sinais foram capturados por uma câmera CMOS *DCC1645C*, também comercializada pela Thorlabs.

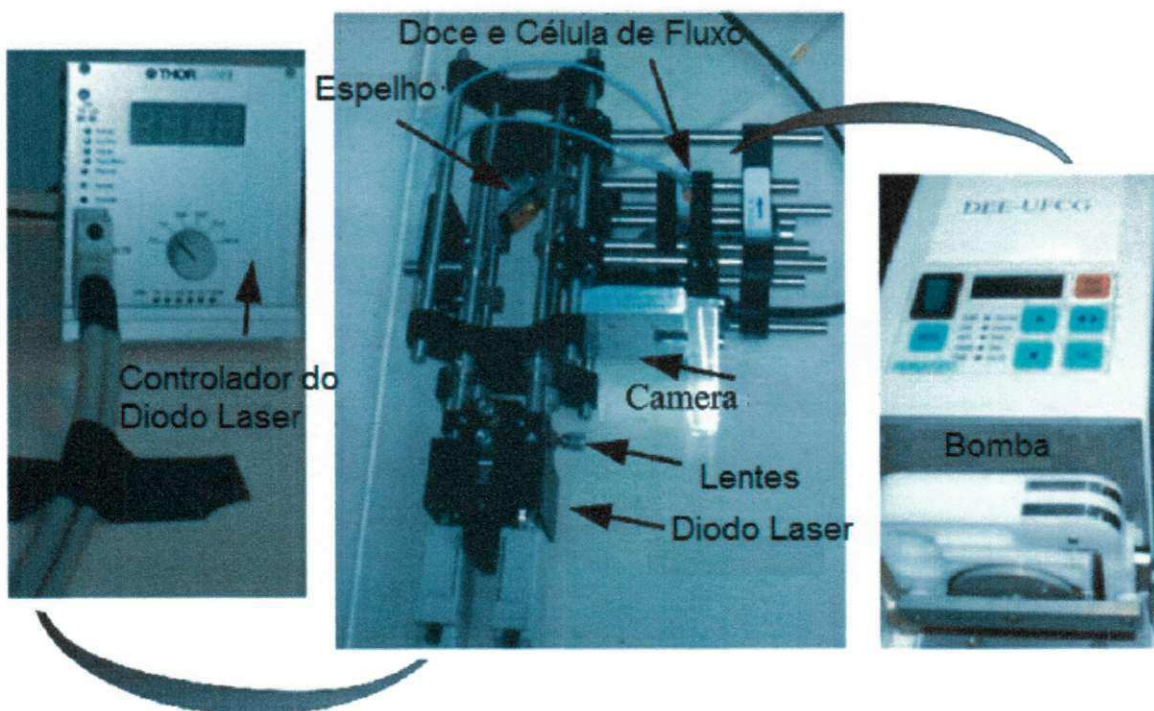


Figura 17 – Fotos do equipamento utilizado nos experimentos para o modo de interrogação angular.

As soluções foram admitidas na célula de fluxo aumentando a concentração de álcool isopropílico. Curvas SPR com 1.024 pontos foram obtidas e processadas usando o método proposto e o método do centróide. Os dados processados foram utilizados para determinação de variações no índice de refração. Os sensorgramas obtidos com o cálculo do índice de refração a partir do método proposto e do método do centróide são exibidos na Figura 18. Exemplos de curvas SPR obtidas para cada concentração são apresentadas na Figura 19. As curvas estão representadas em função da posição de pixel, p , que pode

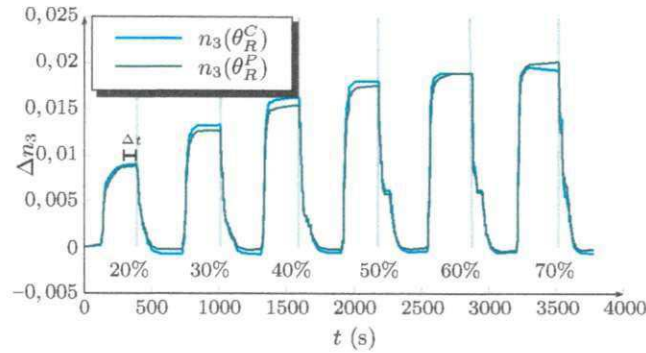


Figura 18 – Sensorgramas experimentais para monitoramento *online* do índice de refração a partir do método proposto e do método do centróide no modo de interrogação angular. As linhas verticais de cor cinza indicam a entrada de água na célula de fluxo.

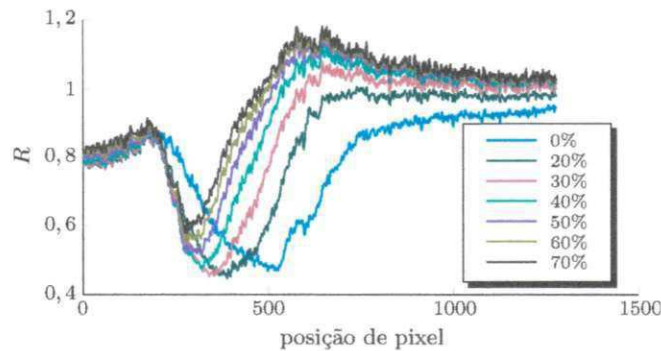


Figura 19 – Curvas SPR obtidas para diferentes concentrações de álcool isopropílico no modo de interrogação angular.

ser convertida de forma aproximada para ângulo usando

$$\theta(p) = 63 + \frac{1200 - p}{93.33}. \quad (4.18)$$

Para analisar a estabilidade do método, foram calculadas a média e a variância nas regiões de regime permanente do sensorgrama, a região foi determinada como sendo os últimos 100s (Δt) antes das mudanças de substância (faixas prestas ligadas às linhas verticais de cor cinza na Figura 18). Os valores da média e da variância das variações do índice de refração para as diferentes concentrações de álcool isopropílico são mostrados na Tabela 3. Os valores foram calculados utilizando 41 pontos.

4.4.2 Modo de interrogação por comprimento de onda

Para os experimentos no modo de interrogação por comprimento de onda, o equipamento desenvolvido por Oliveira *et al.* [13] foi utilizado. Um diagrama de blocos representativo do equipamento utilizado nos experimentos para o modo de interrogação por comprimento de onda é exibido na Figura 20. O sistema óptico usa um *chip* em formato

Tabela 3 – Média e variância da variação do índice de refração em regime permanente calculada a partir do método do centróide e do método proposto para o modo de interrogação angular.

concentração	20%	30%	40%	50%	60%	70%
média (centróide)	0,0089	0,0132	0,0163	0,0181	0,0190	0,0195
média (método proposto)	0,0088	0,0126	0,0154	0,0176	0,0190	0,0201
variância $\times 10^{-9}$ (centróide)	0,0901	0,3939	0,0249	0,3016	0,3312	0,7513
variância $\times 10^{-9}$ (método proposto)	0,3023	0,3216	0,2396	0,0341	0,1481	0,0549

de prisma desenvolvido por Moreira *et al.* [39]. Foi utilizada uma fonte de luz branca cujo espectro é dividido no prisma. Lentes colimadora, para direcionar os raios luminosos, e polarizadora, permitindo a passagem da luz numa única polarização (paralela ao plano de incidência) foram utilizadas. Para movimento das soluções, uma bomba peristáltica REGLO, comercializada pela Ismatec, foi utilizada. Os sinais foram capturados por um espectômetro de fibra óptica.

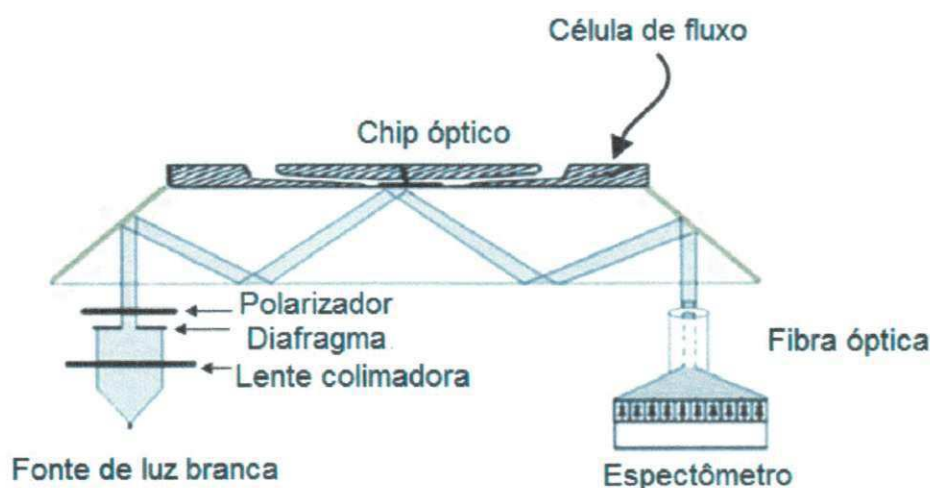


Figura 20 – Diagrama de blocos do equipamento utilizado nos experimentos para o modo de interrogação por comprimento de onda.

Curvas SPR com 3848 pontos foram obtidas e processadas usando o método proposto e o método do centróide. Os dados processados foram utilizados para determinação de variações no índice de refração. Os sensorgramas obtidos com o cálculo do índice de refração a partir do método proposto e do método do centróide são exibidos na Figura 21. Exemplos de curvas SPR obtidas para cada concentração são apresentadas na Figura 22.

Para analisar a estabilidade do método, foram calculadas a média e a variância nas regiões de regime permanente do sensorgrama, a região foi determinada como sendo

os últimos 50s (Δt) antes das mudanças de substância (faixas prestas ligadas às linhas verticais de cor cinza na Figura 21). Os valores da média e da variância das variações do índice de refração para as diferentes concentrações de álcool isopropílico são mostrados na Tabela 4. Os valores foram calculados utilizando 21 pontos.

Tabela 4 – Média e variância da variação do índice de refração em regime permanente calculada a partir do método do centróide e do método proposto para o modo de interrogação por comprimento de onda.

concentração	20%	30%	40%	50%	60%	70%
média (centróide)	0,0079	0,0132	0,0165	0,0184	0,0191	0,0205
média (método proposto)	0,0078	0,0120	0,0162	0,0171	0,0190	0,0181
variância $\times 10^{-6}$ (centróide)	0,0700	0,0920	0,2540	0,2710	0,6170	3,8240
variância $\times 10^{-6}$ (método proposto)	0,0075	0,0428	0,0163	0,0058	0,0070	0,0022

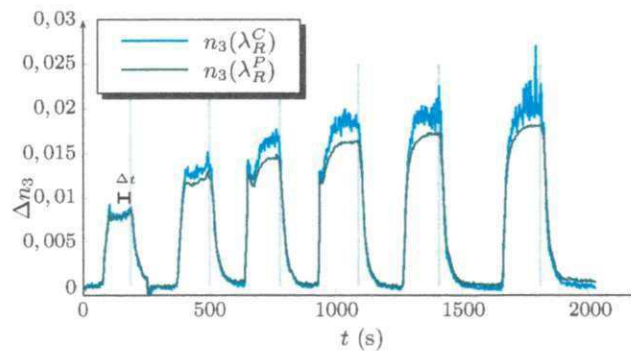


Figura 21 – Sensorgramas experimentais para monitoramento *online* do índice de refração a partir do método proposto e do método do centróide no modo de interrogação por comprimento de onda. As linhas verticais de cor cinza indicam a entrada de água na célula de fluxo.

4.4.3 Discussão

A partir da Figura 18 e da Figura 21, é possível ver que as curvas apresentam comportamento exponencial quando a concentração da solução na célula de fluxo é alterada (transição de estados), que é o comportamento esperado devido ao fenômeno de adsorção [14]. No entanto, em estado estacionário, as curvas obtidas utilizando o método proposto apresentam um melhor comportamento (menor nível de oscilação) ao longo do tempo, conforme os valores de variância apresentados nas Tabelas 3 e 4. Isso mostra que o método proposto apresenta maior robustez a ruído temporal que o método do centróide.

Também foram realizadas simulações com outros conjuntos de índices de refração e os resultados obtidos foram similares. O conjunto de índices de refração para apresentação

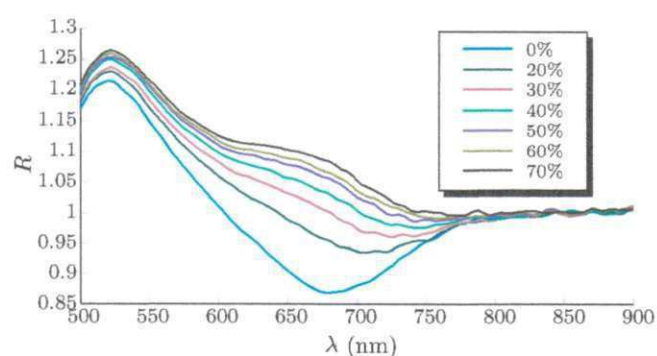


Figura 22 – Curvas SPR obtidas para diferentes concentrações de álcool isopropílico no modo de interrogação por comprimento de onda.

dos resultados neste documento foi escolhido por ser compatível com os equipamentos disponíveis para realizações experimentais.

4.4.4 Experimento com ciclo de limpeza controlado

Também foram realizados experimentos para análise de cinética com uma substância utilizada para formação de uma camada residual (o sistema de três camadas se torna um sistema de quatro camadas) e um ciclo de limpeza controlado para remoção desta camada. BSA (*Bovine Serum Albumin*) foi utilizado para formação camada de uma residual. Devido à disponibilidade de equipamento, o experimento foi realizado apenas para o modo de interrogação angular. O equipamento utilizado para o experimento foi o mesmo apresentado na Figura 17.

Neste experimento, as substância utilizadas foram: água pura, como substância de referência; hipoclorito, como substância de limpeza; PBS, como substância que não forma camada residual; e BSA à concentração de 10%, como substância que não forma camada residual. Na célula de fluxo, as substâncias foram admitidas na seguinte ordem: 1) água, 2) hipoclorito, 3) água, 4) PBS, 5) água, 6) BSA, 7) água, 8) hipoclorito, 9) água. O sensorgrama relativo à determinação da variação do ângulo de ressonância usando o método desenvolvido pode ser visto na Figura 23.

Observando a figura, é perceptível que o índice de refração determinado volta ao normal ao se readmitir água na célula de fluxo após as admissões de hipoclorito ou PBS, no entanto, o mesmo não é válido após a admissão de BSA, o índice de refração fica bem acima do índice de refração de referência. Para remover esta camada, um ciclo de limpeza controlado foi aplicado com a indução de hipoclorito na célula de fluxo até que o valor de referência para hipoclorito fosse encontrado. Após o ciclo de limpeza, água foi readmitida na célula de fluxo e é perceptível que o índice de refração medido corresponde ao índice de refração inicial.

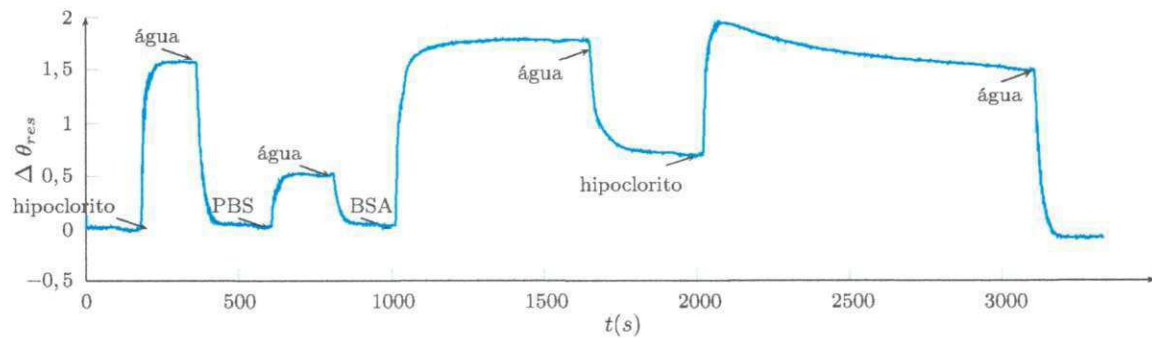


Figura 23 – Sensorgrama obtido para aplicação de ciclo de limpeza controlado a partir do método proposto no modo de interrogação angular. A substância presente inicialmente na célula de fluxo é água e as marcações indicam os tempos de entrada das substâncias na célula de fluxo.

4.5 Conclusão

Neste capítulo, um método para rastreamento da condição ressonante em sensores SPR foi apresentado. O método foi desenvolvido com base em características da curva SPR. A solução desenvolvida foi testada por meio de simulações e validada por experimentos nos dois modos de operação. O método apresentado possibilita a determinação de mudanças na posição de refletividade por meio de uma simples aproximação por uma função cossenoidal e pode ser aplicado diretamente aos dados brutos normalizados obtidos, não sendo necessária a etapa de filtragem. O método desenvolvido é de simples implementação, alta eficiência computacional e imune a perturbações. É importante observar que o método não pode ser utilizado para determinação da condição ressonante, apenas para rastrear suas variações, o que significa que um valor de referência conhecido é necessário para sua aplicação. No entanto, na maioria dos casos o interesse em experimentos envolvendo sensores SPR é rastrear as variações na condição ressonante com relação a uma referência.

5 Regressor Linear

Neste capítulo, é apresentado um vetor de regressão paramétrica linear para a equação não linear proposta por Kurihara *et al.* [23] para ajuste da curva SPR. Devido à semelhança entre as equações, o vetor de regressão paramétrica linear também pode ser utilizado para a equação de Tobiska e Homola [25]. O vetor de regressão linear possibilita uma estimação, a partir de mínimos quadrados simples, para equação não-linear da curva.

5.1 Equação paramétrica não-linear

Devido às múltiplas interações na estrutura de múltiplas camadas, uma expressão fechada para a curva SPR em função das variáveis independentes (ângulo de incidência ou comprimento de onda da luz) é difícil de se obter. Partindo do modelo de Fresnel de três camadas, com base em várias simplificações e aproximações, Kurihara *et al.* determinaram uma equação paramétrica não-linear para a curva SPR contendo cinco parâmetros. A equação paramétrica não-linear proposta por Kurihara *et al.* para ajuste da curva SPR é expressa por

$$R_K(\theta) = A \left[1 - \frac{B + C(\theta - D)}{E^2 + (\theta - D)^2} \right], \quad (5.1)$$

em que, R_K corresponde à refletividade da superfície e θ o ângulo de incidência da luz. Os parâmetros A , B , C , D , e E devem ser determinados para o ajuste da curva.

Tobiska e Homola propuseram uma função parametrizada não-linear semelhante à de Kurihara *et al.*, mas para o caso de interrogação de comprimento de onda. A equação paramétrica não-linear proposta por Tobiska e Homola para ajuste da curva SPR é expressa por

$$R_T(\lambda) = 1 - A \frac{W + P(\lambda - C)}{W^2 + (\lambda - C)^2}, \quad (5.2)$$

em que, R_T corresponde à refletividade da superfície e λ o comprimento de onda da luz. Para esta equação, os autores também relacionaram os parâmetros A com a profundidade, C com a posição do mínimo, W com a largura e P com a assimetria da curva SPR, características que podem ser úteis em estratégias de processamento [40, 34, 41].

Para determinação dos parâmetros das equações, se utiliza o algoritmo de Levenberg-Marquardt, que é um algoritmo não-linear para a determinação de parâmetros utilizado para calcular os mínimos quadrados não linear, mas que apresenta problemas, como a necessidade de uma escolha inicial dos parâmetros adequada e possibilidade de convergência lenta ou convergência para um mínimo local.

De acordo com o Teorema dos Mínimos Quadrados [42], o valor mais provável das grandezas desconhecidas é aquele que minimiza a soma dos quadrados da diferença (erro) entre os valores atualmente observados e os valores calculados multiplicados por números que medem o grau de precisão. A ideia é minimizar uma função de perda construída a partir dos quadrados dos erros de estimação. Uma função de perda básica é

$$J = \frac{1}{2}(R - \hat{R}_K)^T(R - \hat{R}_K) \quad (5.3)$$

em que, R é a curva SPR a ser estimada e \hat{R}_K é uma estimativa de R na forma de (5.1).

Neste capítulo, é apresentado um regressor linear que possibilita estimar os parâmetros destas equações por meio de um algoritmo dos mínimos quadrados simples, superando os problemas citados. As Equações 5.1 e 5.2 são bem similares. Normalizando e fazendo $A = 1$ e $\theta = \lambda$ em (5.1), é possível determinar facilmente os parâmetros de (5.2) com base nos parâmetros de (5.1). Por isso, será apresentada a construção do regressor linear apenas para (5.1).

5.2 Construção do regressor linear

Expandindo (5.1), é obtida

$$\begin{aligned} R_K(\theta) &= A \left[1 - \frac{B + C(\theta - D)}{E^2 + (\theta - D)^2} \right] \\ &= A \left[\frac{E^2 + D^2 - B + CD - 2D\theta - C\theta + \theta^2}{E^2 + D^2 - 2D\theta + \theta^2} \right] \end{aligned} \quad (5.4)$$

cujos termos R e θ são conhecidos. (5.4) pode ser reorganizada

$$[E^2 + D^2] R_K - [2D] \theta R_K + \theta^2 R_K = [A(E^2 + D^2 - B + CD)] + [-A(2D + C)] \theta + [A] \theta^2. \quad (5.5)$$

Isolando o termo $\theta^2 R_K$, que não multiplica nenhum parâmetro,

$$\theta^2 R_K = [A] \theta^2 - [A(2D + C)] \theta + [2D] \theta R_K - [E^2 + D^2] R_K + [A(E^2 + D^2 - B + CD)] \quad (5.6)$$

ou, expressando de uma forma mais simples,

$$\theta^2 R_K = A' \theta^2 + B' \theta + C' \theta R_K + D' R_K + E', \quad (5.7)$$

com

$$\begin{aligned} A' &= A \\ B' &= -A[2D + C] \\ C' &= 2D \\ D' &= -[E^2 + D^2] \\ E' &= A[E^2 + D^2 - B + CD] \end{aligned} \quad ,$$

que pode ser colocada numa representação em regressão linear simples

$$y(\theta) = \phi^T(\theta) \Theta, \quad (5.8)$$

em que,

$$y(\theta) = \theta^2 R_K, \quad (5.9)$$

$$\phi^T(\theta) = [\theta^2 \quad \theta \quad \theta R_K \quad R_K \quad 1] \quad (5.10)$$

e

$$\Theta = [A' \quad B' \quad C' \quad D' \quad E']. \quad (5.11)$$

Usando N pontos de refletividade a diferentes ângulos de incidência, se obtém

$$Y = \begin{bmatrix} y(\theta_1) \\ \vdots \\ y(\theta_N) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \phi^T(\theta_1) \\ \vdots \\ \phi^T(\theta_N) \end{bmatrix} \Theta = \Phi \Theta. \quad (5.12)$$

Fazendo uma estimativa $\hat{\Theta}$ de Θ ,

$$\hat{Y} = \Phi \hat{\Theta}. \quad (5.13)$$

Gerando uma função de perda

$$J(\hat{\Theta}) = \frac{1}{2} \varepsilon^T \varepsilon = \frac{1}{2} (Y - \Phi \hat{\Theta})^T (Y - \Phi \hat{\Theta}) = \frac{1}{2} (Y^T Y - Y^T \Phi \hat{\Theta} + \hat{\Theta}^T \Phi^T \Phi \hat{\Theta} - \hat{\Theta}^T \Phi^T Y). \quad (5.14)$$

O mínimo desta função é encontrado derivando-a e igualando-a a zero

$$\frac{d}{d\hat{\Theta}} J(\hat{\Theta}) = \frac{1}{2} (0 - Y^T \Phi + \Phi^T \Phi \hat{\Theta} - \Phi^T Y + \hat{\Theta}^T \Phi^T \Phi) = \Phi^T \Phi \hat{\Theta} - \Phi^T Y = 0. \quad (5.15)$$

Desta forma, a melhor estimativa para Θ é

$$\hat{\Theta} = (\Phi^T \Phi)^{-1} \Phi^T Y. \quad (5.16)$$

Tal que os parâmetros de (5.1) são determinados resolvendo:

$$\begin{aligned} A &= A' \\ D &= -C'/2 \\ C &= 2D - B'/A \\ E &= \sqrt{-D^2 - D'} \\ B &= E^2 + D^2 - CD - E/E' \end{aligned} \quad (5.17)$$

5.3 Resultados de simulação

Primeiramente, para verificar a funcionalidade do ajuste da curva SPR utilizando o regressor proposto, foram realizadas simulações. Nas simulações, uma estrutura de três camadas composta por TOPAS, ouro e uma solução aquosa foi considerada. Detalhes da estrutura de múltiplas camadas podem ser vistos na Tabela 5. As simulações foram realizadas considerando o modo de operação angular com comprimento de onda da luz fixo, $\lambda = 670\text{nm}$, e variando o ângulo de incidência da luz de 65° a 77° . As curvas SPR foram geradas utilizando o modelo de Fresnel, apresentado na seção 2.3. As curvas SPR geradas utilizando o modelo são chamadas de verdadeiras. Com o uso do regressor, o objetivo é obter aproximações para curvas SPR. Por isso, foram utilizados apenas dois valores distintos para o índice de refração da terceira camada.

Tabela 5 - Parâmetros da estrutura de múltiplas camadas usados no modelo de simulação.

camada	composição	índice de refração	largura (nm)
1	TOPAS	$n_1 = 1,526$	$d_1 = \infty$
2	ouro	$n_2 = 0,161 + 3,787j$	$d_2 = 50$
3	solução aquosa	$n_3 = 1,33$ e $1,34$	$d_3 = \infty$

Na Figura 24, as curvas SPR geradas para $n_3 = 1,33$ e $n_3 = 1,34$ e suas aproximações utilizando o regressor desenvolvido e o algoritmo de Levenberg-Marquardt são apresentadas. Para verificação da qualidade das aproximações, foi utilizado o erro médio quadrático, calculado como

$$\delta_{mq} = \frac{1}{N} \sum_{\theta=\theta_i}^{\theta_f} [R(\theta) - \hat{R}_K(\theta)]^2, \quad (5.18)$$

em que, R é a curva SPR verdadeira, obtida a partir do modelo; \hat{R}_K é a de R aproximação na forma da Equação 5.1; θ_i é o ponto inicial e θ_f o ponto final da curva; e N é o número de pontos.

Para a curva obtida utilizando $n_3 = 1.33$, o erro médio quadrático de aproximação utilizando o regressor foi de $0,13056 \times 10^{-3}$ enquanto o erro médio o erro médio quadrático de aproximação utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt foi de $0,11558 \times 10^{-3}$. Para a curva obtida utilizando $n_3 = 1.34$, o erro médio quadrático de aproximação utilizando o regressor foi de $0,09286 \times 10^{-3}$ enquanto o erro médio o erro médio quadrático de aproximação utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt foi de $0,07796 \times 10^{-3}$. As curvas estimadas usando a regressão e o algoritmo de Levenberg-Marquardt são muito próximas das curvas originais com base nos erros médios quadráticos obtidos. Foram realizadas simulações utilizando outros valores de n_3 e, em todas elas, os valores dos er-

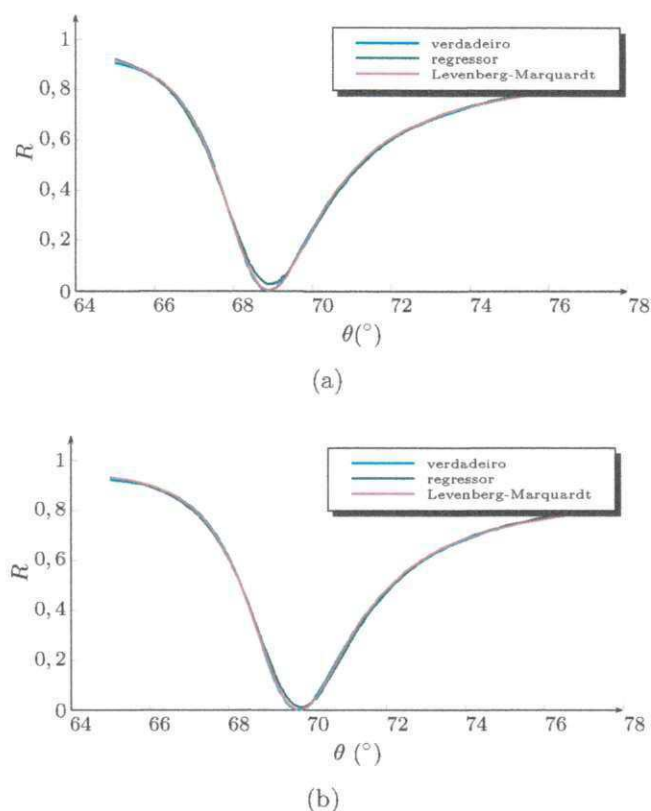


Figura 24 – Curvas SPR geradas para condição ideal (sem ruído) e suas aproximações utilizando o regressor e o algoritmo de Levenberg-Marquardt para (a) $n_3 = 1,33$ e (b) $n_3 = 1,34$.

ros foram similares aos valores apresentados e o erro obtido utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt foi menor que o erro obtido utilizando o regressor.

Para simular uma situação menos ideal, ruído com distribuição normal foi adicionado ao espectro para simular ruído de medição. Na Figura 25, as curvas SPR geradas para $n_3 = 1,33$ perturbadas com ruído de variâncias 0,01 e 0,03 e suas aproximações utilizando o regressor e o algoritmo de Levenberg-Marquardt são apresentadas.

Foi percebido que, com o aumento do nível de ruído, o erro nos resultados obtidos com o ajuste pseudolinear aumenta de forma que, para valores elevados do nível de ruído, as curvas aproximadas são muito diferentes das curvas originais. Isto ocorre porque o ajuste não é realizado diretamente para a curva SPR, mas para o termo $\theta^2 Y$, o que leva a uma propagação de erros ao resolver (5.17). Para superar este problema, métodos aprimorados dos mínimos quadrados podem ser utilizados, a exemplo do uso de variáveis instrumentais. O uso de variáveis instrumentais possibilita uma estimação de parâmetros adequada mesmo quando elementos da regressão estão relacionados aos erros [42]. Variáveis instrumentais são um conjunto de variáveis que, de certo modo, estão relacionados com o erro mas não estão incluídas no modelo.

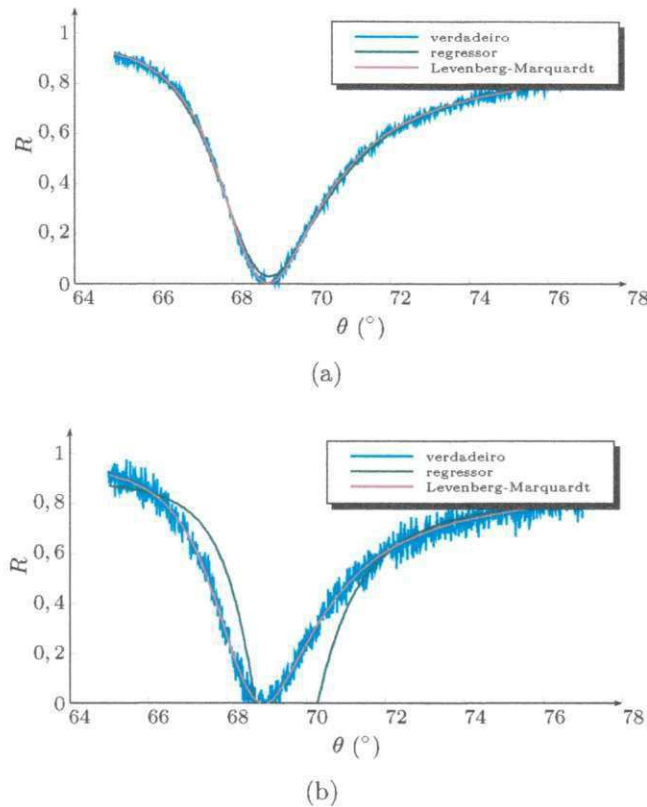


Figura 25 – Curvas SPR ruidosas geradas para $n_3 = 1,33$ e suas aproximações o regressor e o algoritmo de Levenberg-Marquardt para curvas adicionadas de ruído branco Gaussiano com variâncias (a) $\sigma^2 = 0,01$ e (b) $\sigma^2 = 0,03$.

5.3.1 Uso de Variáveis Instrumentais

Inicialmente, para a geração das variáveis instrumentais, foi realizada uma estimativa da curva SPR utilizando o regressor e o método dos mínimos quadrados linear. A curva estimada foi denominada $z(\theta)$ e foi utilizada para a geração das variáveis instrumentais:

$$\xi^T(\theta) = [\theta^2 \quad \theta \quad \theta z \quad z \quad 1]. \quad (5.19)$$

As variáveis instrumentais foram então utilizadas para a solução dos mínimos quadrados da seguinte forma:

$$\hat{\Theta} = (\xi^T \Phi)^{-1} \xi^T Y. \quad (5.20)$$

Após a obtenção de $\hat{\Theta}$, os parâmetros da curva foram determinados utilizando (5.17).

Na Figura 26, são exibidas a curva SPR gerada perturbada com ruído de variância 0,03 e seu ajuste usando o regressor com o uso de variáveis instrumentais. O uso de variáveis instrumentais se mostrou efetivo e forneceu uma estimativa consistente da curva SPR original.

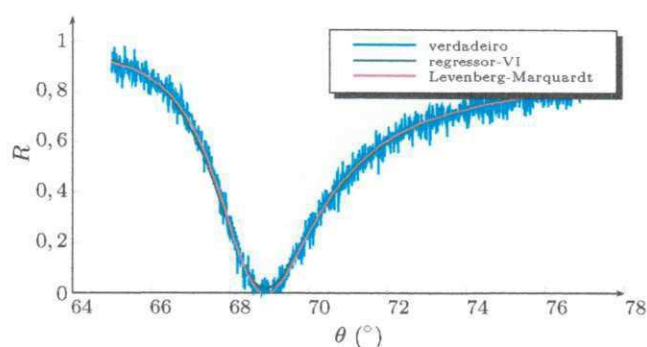


Figura 26 – Curva SPR gerada perturbada com ruído de variância 0,03 e sua aproximação utilizando o regressor combinado com variáveis instrumentais e o algoritmo de Levenberg-Marquardt.

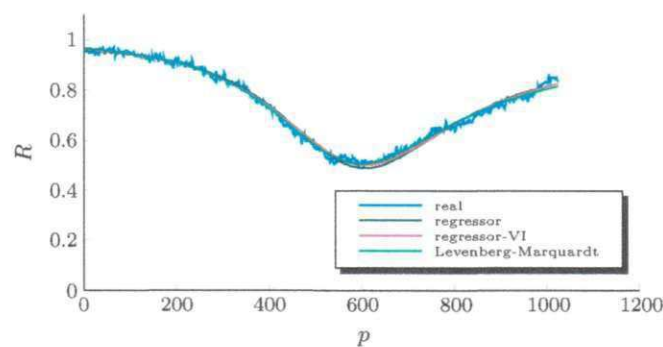
5.4 Resultados experimentais

Para demonstrar a aplicação prática do regressor desenvolvido, experiências com substâncias de diferentes índices de refração foram conduzidas. As substâncias utilizadas nos experimentos foram água deionizada e degaseificada e soluções de PBS e hipoclorito. O equipamento utilizado foi o mesmo descrito na subseção 4.4.1.

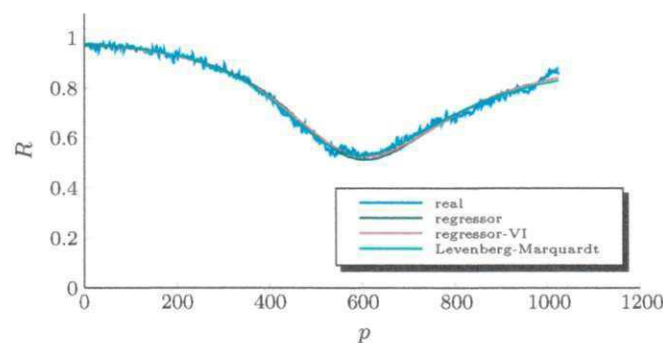
Inicialmente, três curvas SPR com 1024 pontos cada uma foram obtidas para H_2O , PBS and hipoclorito contidas na célula de fluxo em regime permanente. Após normalização, as curvas obtidas foram utilizadas para ajuste utilizando o regressor sem e com o uso de variáveis instrumentais e o algoritmo de Levenberg–Marquardt. As curvas obtidas para refletividade normalizada em função da posição de pixel, p , são exibidas na Figura 27.

O conjunto de dados experimentais foi escolhido por ter uma falha na posição de ressonância para hipoclorito, como é possível perceber observando a Figura 27(c). Esta falha ocorre devido a uma rachadura no espelho utilizado no equipamento e não pode ser superada por algoritmos mais simples como simples busca ou centróide.

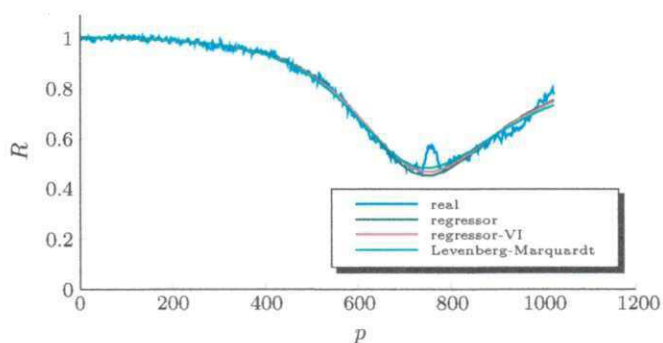
Ainda observando as curvas da Figura 27, a curva aproximada usando o regressor é bem próxima da curva aproximada usando o algoritmo de Levenberg-Marquardt. No entanto, o tempo médio de processamento de uma única curva usando o regressor é muito menor que o tempo médio de processamento usando o algoritmo de Levenberg-Marquardt. Para processar uma única curva de 1024 pontos, a solução utilizando o regressor aliado a variáveis instrumentais requer 117000 FLOPS. Não foi possível determinar o número de FLOPS requerido para usando o algoritmo de Levenberg-Marquardt, no entanto, o tempo necessário para a solução usando o algoritmo de Levenberg-Marquardt foi sessenta vezes maior. O tempo médio usando o regressor ainda pode ser aprimorado usando um algoritmo recursivo.



(a)



(b)



(c)

Figura 27 – Curvas SPR experimentais obtidas (real) e suas aproximações usando o regressor sem e com o uso de variáveis instrumentais e o algoritmo de Levenberg-Marquardt para curvas obtidas com a substância na célula de fluxo sendo (a) água, (b) PBS e (c) hipoclorito.

5.5 Conclusão

Neste capítulo, foi apresentado um vetor de regressão paramétrica linear, para ajuste da curva SPR. Em relação aos métodos anteriores, o uso da regressão linear apresenta várias vantagens, como melhor tempo de resposta; implementação simples; e não dependência da escolha inicial dos parâmetros. O regressor foi testado por meio de simulações e experimentos e os resultados obtidos foram muito similares aos obtidos utilizando o

algoritmo de Levenberg-Marquardt mas o algoritmo de Levenberg-Marquardt leva a uma curva mais próxima à original, no entanto, o uso do regressor desenvolvido apresenta uma eficiência computacional muito maior que o uso do algoritmo de Levenberg-Marquardt, sendo preferível para a aplicação em equipamentos com capacidade de processamento limitada, a exemplo de dispositivos portáteis de baixo custo. Em situações de nível de ruído elevado, a estimativa utilizando o método dos mínimos quadrados linear e o regressor é falha, porém, é possível contornar o erro de estimativa ao se utilizar métodos aprimorados para solução dos mínimos quadrados linear, a exemplo do uso de variáveis instrumentais.

6 Algoritmo de Colônia de Formigas

Neste capítulo, é descrito o uso de um algoritmo meta-heurístico baseado em colônia de formigas para determinação da posição de ressonância a partir de imagens de baixa qualidade. Usando uma regra de transição de estados no algoritmo de colônia de formigas, a determinação da ressonância é formulada como um problema de encontrar o melhor caminho entre os extremos de uma imagem SPR. O uso de colônia de formigas possibilita lidar com múltiplas faixas escuras e apresenta boa robustez em relação a ruído e outras formas de perturbações. Resultados de simulação e experimentais são apresentados para demonstrar a aplicabilidade da solução proposta.

6.1 Introdução

Assim como a maioria dos métodos existentes na literatura, os métodos apresentados nos capítulos anteriores são aplicados a uma única curva SPR. Muitos equipamentos capturam uma imagem da refletividade da superfície [43]. Dependendo de diversos fatores, a imagem SPR obtida pode ser de baixa qualidade. *Speckle noise* originado da fonte de luz produz pontos com intensidade variada em pixels aleatórios. Não uniformidade da distribuição de potência espectral da fonte de luz e não idealidades das características de propagação guia de onda óptica entre a fonte de luz e o fotodetector contribuem para reduzir a qualidade da imagem. Em adição, o sensor de imagem está sujeito a perturbações, tais como ruído de corrente escura, efeitos de quantização e influência da luz externa.

Geralmente, para processar estas imagens, os métodos de processamento de uma única curva são aplicados após utilizar todas as linhas da imagem para gerar uma única curva. Neste caso, cada linha de uma coluna é considerada uma medida diferente no mesmo ângulo e todas as linhas de uma mesma coluna são combinadas usando algum tipo de filtro (por exemplo, média) para gerar um único ponto. No entanto, combinar linhas para gerar uma única curva pode resultar numa curva distorcida, visto que, normalmente, as fontes de luz utilizadas em dispositivos SPR têm uma distribuição de intensidade de luz gaussiana. Isso significa que as regiões mais centrais da imagem SPR têm uma concentração maior de intensidade luminosa e, ao somar todas as linhas e extrair a média para gerar uma única curva, esta concentração tende a aumentar, resultando numa distorção da curva obtida.

6.2 Algoritmo de colônia de formigas

Para determinar a condição ressonante (a faixa escura resultante da redução da refletividade) numa imagem de baixa qualidade, foi desenvolvido um algoritmo com base

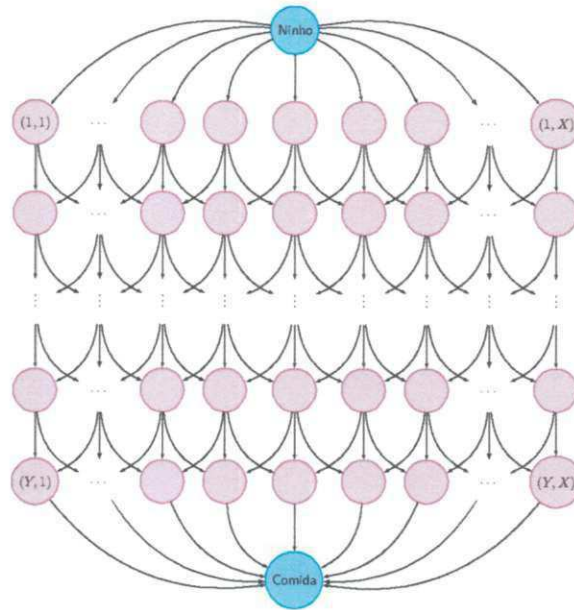


Figura 28 – Representação da imagem SPR numa matriz de transição de estados. As setas indicam as possíveis trajetórias das formigas a partir de um nó quando se realiza movimento de avanço.

no comportamento de formigas [44, 45, 46]. A imagem SPR é tratada como uma matriz de transição de estados da parte superior para a parte inferior da imagem SPR. A imagem é considerada um grafo bidimensional $X \times Y$ (ver Figura 28) e cada pixel é considerado um nó com tamanho (ou custo) proporcional à intensidade do pixel. As formigas atravessam o grafo indo do topo (ninho) para o fundo (comida), e voltando para o ninho. Elas nunca se movem horizontalmente. O movimento do ninho para a comida é chamado de movimento de avanço, enquanto o movimento da comida para o ninho é chamado de movimento de retorno.

Inicialmente, as formigas são uniformemente distribuídas na primeira linha da matriz ($y = 1$) e todos os elementos da matriz de feromônio,

$$\Psi = \begin{bmatrix} \varphi(1,1) & \varphi(1,2) & \cdots & \varphi(1,X) \\ \varphi(2,1) & \varphi(2,2) & \cdots & \varphi(2,X) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \varphi(Y,1) & \varphi(Y,2) & \cdots & \varphi(Y,X) \end{bmatrix}, \quad (6.1)$$

assumem um mesmo valor inicial ϕ_0 . $\varphi(y,x)$ é a quantidade de feromônio na posição (y, x) .

Cada nó tem um custo associado $c_{(y,x)}$. Quanto maior o custo, maior o tempo que as formigas permanecem neste nó antes de transitar para o próximo nó. O tempo de permanência é definido como

$$s_{(y,x)} = \text{round} \left(\frac{c_{(y,x)}}{v} \right), \quad (6.2)$$

em que, $\text{round}(\cdot)$ é a operação de arredondamento para o inteiro mais próximo e v representa a velocidade das formigas.

No movimento de avanço, as formigas tendem a seguir o caminho com maior concentração de feromônio memorizando sua trajetória. É esperado que a faixa escura de refletividade seja estacionária numa imagem, resultando em um caminho contínuo. Com base nisso, as formigas podem se mover apenas para os seus três vizinhos mais próximos da linha seguinte, como representado na Figura 28. Na posição (y, x) , realizando movimento de avanço, a formiga a se move para a próxima posição de acordo com a seguinte regra probabilística

$$p_{(x-1,y+1)} = \frac{p_l}{S}, \quad (6.3)$$

$$p_{(x+1,y+1)} = \frac{p_r}{S}, \quad (6.4)$$

$$p_{(x,y+1)} = \frac{p_c}{S}, \quad (6.5)$$

em que,

$$p_l = \sum_{x_i=1}^{x-1} \frac{\varphi_{(y+1,x_i)}^\alpha}{(x-x_i)^2}, \quad (6.6)$$

$$p_r = \sum_{x_i=x+1}^X \frac{\varphi_{(y+1,x_i)}^\alpha}{(x-x_i)^2}, \quad (6.7)$$

$$p_c = \min(p_l, p_r) + \varphi_{(y+1,x)}^\alpha \quad (6.8)$$

e

$$S = p_l + p_r + p_c, \quad (6.9)$$

com α sendo um parâmetro que determina a importância do feromônio.

No movimento de retorno, as formigas se movem voltando pela sua trajetória de avanço memorizada. Ao se mover do nó (x, y) para o nó $(x_f, y-1)$, as formigas deixam feromônio no nó (x, y) . A regra de atualização de feromônio é

$$\varphi_{(y,x)}^{new} = \varphi_{(y,x)}^{old} + \rho, \quad (6.10)$$

em que ρ é uma quantidade padrão de feromônio deixada pelas formigas. Após completar os movimentos de avanço e retorno, a formiga a escolhe o ponto $(1, x)$ de acordo com a seguinte regra probabilística

$$p_{(1,x)} = \frac{\varphi_{(1,x)}^\alpha}{\sum \varphi_{(1,x)}^\alpha} \quad (6.11)$$

e começam novamente os movimentos de avanço e de retorno.

Periodicamente, a matrix de feromônio, Ψ , é atualizada para representar os efeitos da dispersão de feromônio devido às condições de ambiente. A atualização da matrix de

feromônio é dada por

$$\varphi_{(y,x)}^{new} = \begin{cases} \gamma & (1 - \beta) \varphi_{(y,x)}^{old} \leq \gamma \\ (1 - \beta) \varphi_{(x,y)}^{old} & (1 - \beta) \varphi_{(y,x)}^{old} > \gamma \end{cases} \quad (6.12)$$

em que, β é a taxa de evaporação de feromônio e γ é a quantidade mínima de feromônio permitida em cada posição da matriz de feromônio.

6.3 Resultados de simulação

Um modelo de simulação foi desenvolvido para execução de algoritmo de colônia do formigas para a determinação da posição do fenômeno SPR. Foi considerado um sistema de três camadas composto por: substrato de topazio (camada 1, $n_1 = 1.526$, $d_1 = \infty\text{nm}$); uma camada fina de ouro (camada 2, $n_2 = 0,161 + 3,787j$, $d_2 = 50\text{nm}$); e uma solução aquosa (camada 3, $n_3 = 1,333$, $d_3 = \infty\text{nm}$), e operando no modo de interrogação angular com comprimento de onda da luz fixo em $\lambda = 670\text{nm}$. O ângulo de incidência da luz foi variado de 63° a 79° em passos de $0,0625^\circ$. Uma curva SPR de 256 pontos foi gerada usando o modelo de Fresnel de múltiplas camadas. Esta curva foi utilizada para gerar uma imagem SPR 256×256 com resolução de 8 bits por meio da repetição da mesma curva em cada linha da imagem. O contraste da imagem foi reduzido e um ruído Gaussiano de média nula e variância $\sigma^2 = 0,2$ foi adicionado. Além disso, imperfeições ópticas como manchas claras e faixas escuras também foram adicionadas para degradar a qualidade da imagem e simular uma situação menos ideal.

O algoritmo de colônia de formigas foi aplicado à imagem SPR. Depois de executar o algoritmo de colônia de formigas, a maior parte do feromônio ficou concentrada numa única linha. Esta linha é o melhor caminho da matriz de transição de estados e corresponde à faixa SPR. Na Figura 29, são exibidas a imagem SPR ideal e a imagem SPR degradada com a linha de ressonância obtida após o uso do algoritmo de colônia de formigas.

Para estudo comparativo, foram aplicados na imagem degradada o método do centróide, que é o mais usual para determinar a condição ressonante, e o método baseado na Transformada de Radon, que é específico para uso em imagens.

6.3.1 Centróide

Para determinar a posição de mínima refletividade, o método do centróide foi aplicado individualmente a cada linha da imagem após a aplicação de um filtro de mediana (7×7 pixels) nela. A imagem SPR contendo a linha obtida usando o método do centróide é exibida na Figura 30(a). Observando a figura é possível perceber que a detecção da ressonância foi bem mais dispersa ao se usar o método do centróide.

6.3.2 Transformada de Radon

A transformada de Radon para uma função de duas variáveis, $f(x, y)$, (imagem) é uma transformação integral desta função sobre linhas retas, definida matematicamente como

$$\mathcal{R}\{f(x, y)\} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos(\phi) + y \sin(\phi) - \rho) dx dy \quad (6.13)$$

em que, $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$ e $\phi \in [-90^\circ, 90^\circ]$. A função delta de Dirac (δ) converte a integral de duas dimensões para uma integral de linha ao longo de $\rho = x \cos(\phi) + y \sin(\phi)$. Por meio da transformada de Radon, uma imagem é representada como uma coleção de linhas de projeção ao longo de várias direções.

O método baseado na transformada de Radon foi utilizado conforme a descrição em [35]. Após a utilização do método, foi obtida uma faixa para a linha de ressonância. A faixa de ressonância obtida a partir do uso da transformada de Radon está exibida na Figura 30(b). A faixa obtida é relativamente larga, isso se deve ao fato de a transformada de Radon ser utilizada primariamente para detectar linhas ou bordas enquanto a condição ressonante apresenta uma curva suave. O resultado do método baseado na transformada de Radon apresenta melhores resultados quando a espessura da ressonância é pequena, no entanto, esta espessura está relacionada à qualidade do sensor, quanto menor a espessura da ressonância, maior a qualidade do sensor SPR.

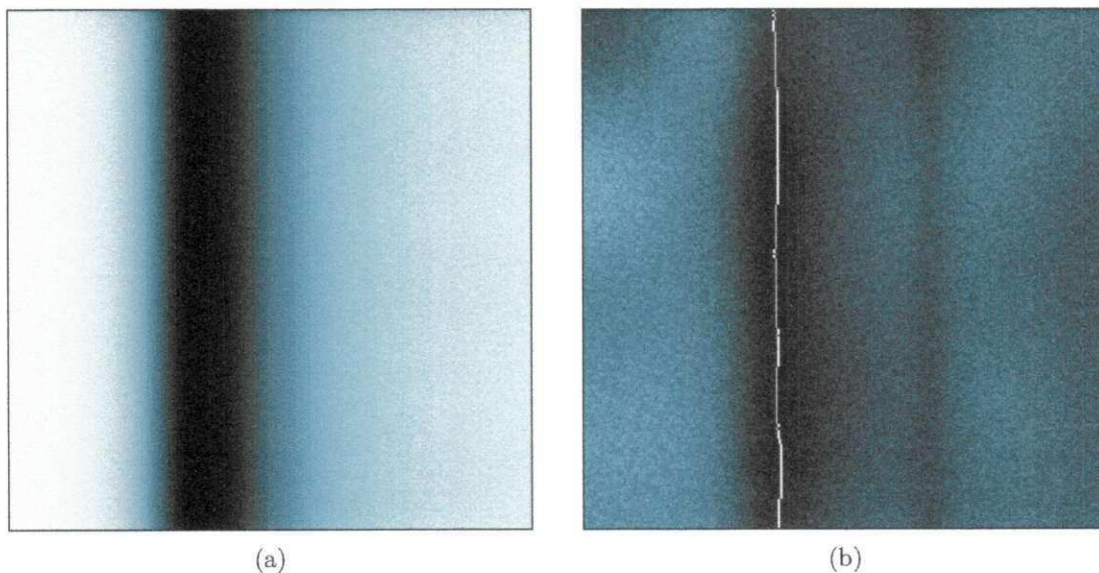


Figura 29 – Imagens SPR geradas utilizando o modelo de Fresnel: (a) Imagem SPR ideal e (b) imagem SPR degradada com a linha de ressonância determinada pelo algoritmo de colônia de formigas.

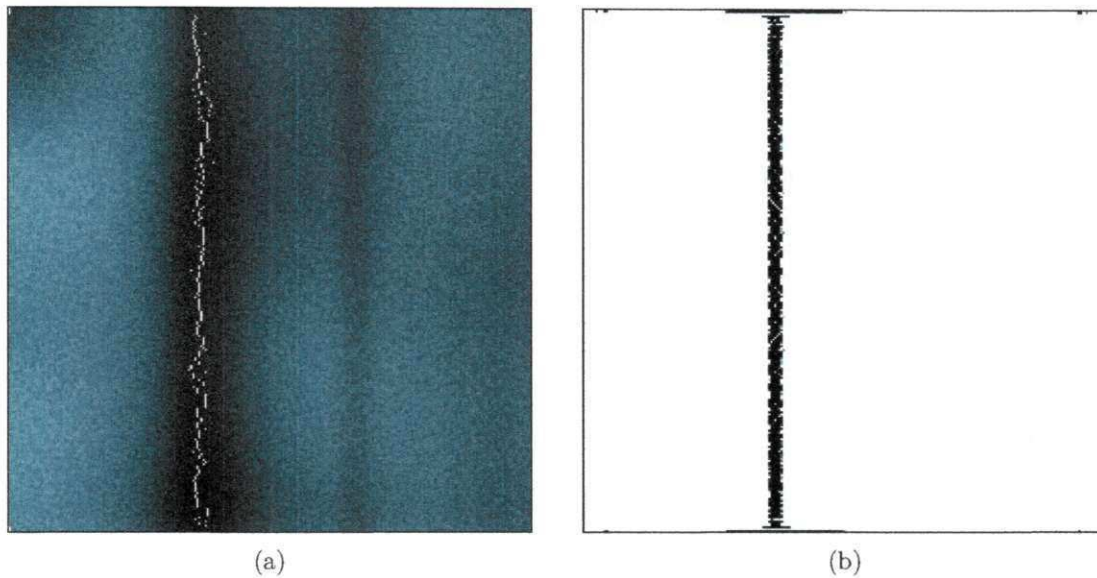


Figura 30 – Determinação da condição de ressonância usando (a) método do centróide e (b) transformada de Radon.

6.4 Resultados Experimentais

Testes experimentais foram conduzidos para avaliar a aplicabilidade do algoritmo de colônia de formigas a uma imagem SPR real. O equipamento utilizado foi o mesmo descrito na subseção 4.4.1. Nos testes experimentais, diferentes analitos foram utilizados proporcionando índices de refração efetivos diferentes para a terceira camada do sistema de múltiplas camadas. As substâncias utilizadas como analito foram soluções de água degaseificada e deionizada (H_2O) e solução de hipoclorito (HYPO-S) a concentrações de 100%-0% (água pura) e 50%-50% (50% de H_2O e 50% de HYPO-S).

Inicialmente, foi obtida uma imagem de refletividade para H_2O e para hipoclorito contidos na célula de fluxo em regime permanente. As imagens obtidas para refletividade da superfície são exibidas na Figura 31. O algoritmo de colônia de formigas foi aplicado às imagens obtidas e a maior parte do feromônio ficou concentrada em uma única linha. Os resultados obtidos estão exibidos na Figura 32.

6.4.1 Discussão

Nos dois casos (estudos de simulação e experimentais), os valores dos parâmetros utilizados no algoritmo foram $A = 512$, $\varphi_0 = 1$, $c_{(y,x)}$ = intensidade do pixel (entre 0 e 255), $v = 5$, $\alpha = 1$, $\rho = 1$, $\gamma = 1$ e $\beta = 0,01$. Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que o algoritmo desenvolvido pode ser usado para determinar a posição de ressonância sem nenhum passo de pré-processamento, mesmo quando a qualidade da imagem é baixa e sem a necessidade de normalização se a distribuição gaussiana na fonte

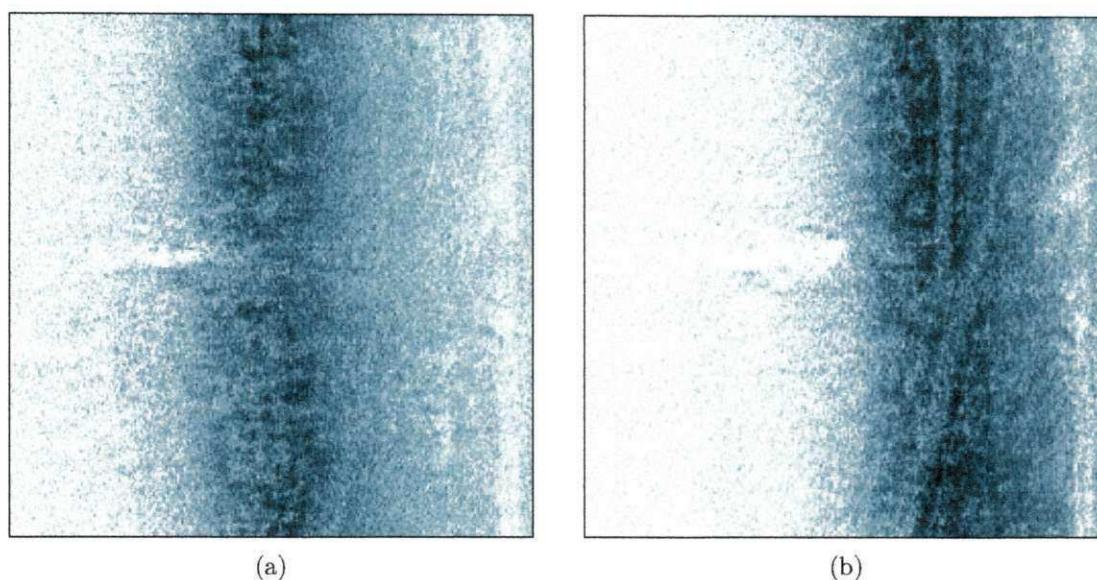


Figura 31 – Imagens SPR experimentais para: (a) água pura e (b) 50%-50% água-hipoclorito.

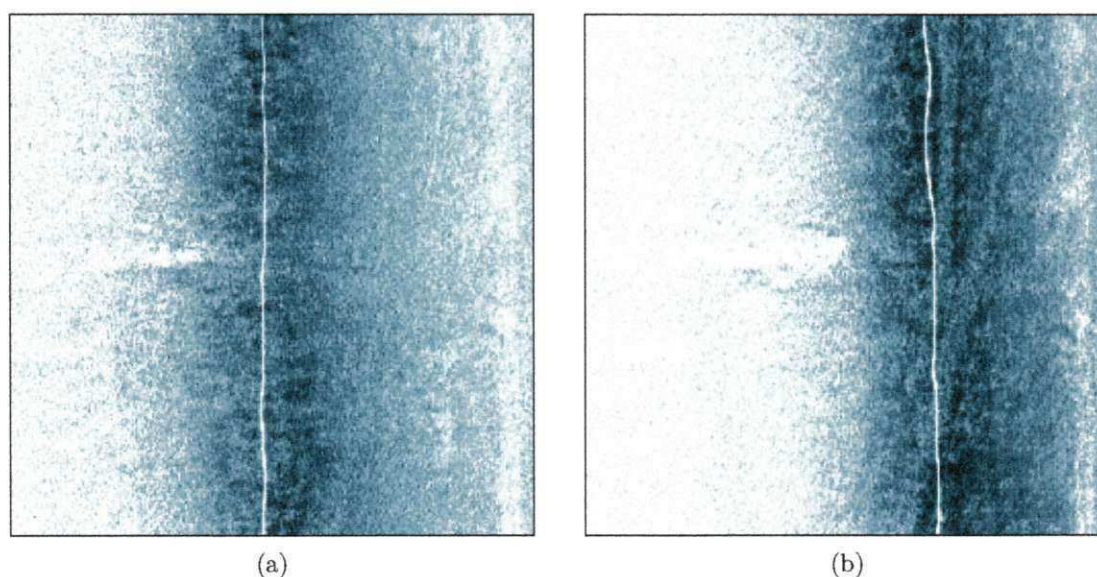


Figura 32 – Resultados experimentais para: (a) água pura e (b) 50%-50% água-hipoclorito.

de luz é suficientemente larga. Sob as mesmas condições, vários dos métodos descritos na literatura não proporcionam bons resultados. É importante mencionar que a maioria deles requer algum passo de pré-processamento para melhorar a qualidade dos dados obtidos. No entanto, se os dados obtidos forem de boa qualidade, o uso de outros métodos é mais recomendado, visto que o tempo de processamento do algoritmo desenvolvido é grande.

6.5 Conclusão

Neste capítulo, foi apresentado um algoritmo metaheurístico com base no comportamento de formigas para determinar a posição de ressonância a partir de imagens de baixa qualidade. A imagem SPR é tratada como uma matriz de transição de estados e o algoritmo de colônia de formigas é utilizado para determinar o melhor caminho entre os extremos da imagem. A solução apresentada é efetiva quando a qualidade da imagem é muito baixa, mas requer um tempo de processamento elevado. O algoritmo desenvolvido foi testado por meio de simulações e testes experimentais para demonstrar sua efetividade no processamento de dados SPR. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a aplicação do algoritmo produz resultados satisfatórios para a determinação da posição de ressonância até mesmo quando a qualidade da imagem é muito baixa e a resolução do sensor é limitada.

7 Considerações Finais

Neste capítulo, são apresentadas as considerações finais do trabalho. Nas seções seguintes: é apresentada uma síntese do trabalho desenvolvido; são levantadas algumas considerações importantes, tais como vantagens e limitações dos métodos desenvolvidos; e elencadas possíveis atividades futuras para continuação do trabalho.

7.1 Síntese

Neste trabalho, foram apresentadas contribuições, na forma de estratégias de processamento, à determinação da condição ressonante em sensores ópticos baseados na ressonância de plasmons de superfície. Foram apresentadas três contribuições: i) um método para rastreamento da condição ressonante baseado em aproximação da curva SPR por uma função cossenoidal; ii) a construção de um regressor paramétrico linear para ajuste da curva SPR como aprimoramento para solução da equação de Kurihara *et al.* [23]; e iii) um algoritmo com base no comportamento de formigas para determinar a faixa de ressonância em imagens. Todas as abordagens foram testadas por meio de simulações e os resultados tanto de simulação quanto experimentais serviram para validar os métodos desenvolvidos.

7.2 Conclusões

O método de rastreamento baseado em uma aproximação por função cossenoidal faz uma aproximação das curvas SPR por uma única senoide e utiliza a diferença de fase entre as senoides aproximadas para determinar a diferença entre as posições de mínimo das curvas SPR. Uma grande vantagem do método é a sua robustez, já que ele tem, implicitamente, um filtro de altíssima qualidade, pois a aproximação por uma única senoide elimina os ruídos em todas as frequências diferentes da frequência da senoide. Além da capacidade de rejeição a ruído, o método é rápido em termos computacionais, exigindo poucas operações para a obtenção de resultados.

O regressor paramétrico linear é utilizado solucionar equação desenvolvida por Kurihara *et al.* utilizando o método dos mínimos quadrados linear. A utilização do regressor possibilita uma solução mais simples e com melhor desempenho computacional e não depende da escolha inicial dos parâmetros. Comparada com a estimativa utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt, a estimativa utilizando o regressor apresenta um erro médio quadrático de aproximação maior. No entanto, em ambos os casos, os erros médios quadráticos de aproximação são significativamente baixos, na faixa de $0,1 \times 10^{-3}$,

não havendo ganho considerável de precisão. Além disso o ganho em velocidade deve ser levado em conta, visto que o uso do regressor leva a uma solução pelo menos 60 vezes mais rápida que a obtida com o uso do algoritmo de Levenberg-Marquardt. Em situações de nível de ruído elevado, o erro de estimação obtido com o uso do método dos mínimos quadrados linear e o regressor é grande, resultando em uma curva estimada muito diferente da verdadeira, porém, os uso de métodos aprimorados para solução dos mínimos quadrados linear, a exemplo do uso de variáveis instrumentais, serve para contornar este problema.

O algoritmo desenvolvido com base no comportamento de formigas é específico para aplicação em imagens. Ele é efetivo para extrair a condição em imagens com alto nível de degradação, e pode ser aplicado diretamente nos dados obtidos do sensor de imagem sem necessidade da etapa de filtragem. Outra vantagem considerável, é a não necessidade de compensar a forma gaussiana da fonte de luz. Sua principal desvantagem é o tempo de processamento relativamente elevado necessário para sua convergência, o que faz com que outros métodos sejam preferíveis.

7.3 Continuação da pesquisa

Uma lista de possíveis trabalhos futuros, dando continuidade ou utilizando o presente trabalho, é apresentada a seguir:

- Implementação do algoritmo recursivo para a utilização do regressor linear tendo em vista a análise dos impactos da recursividade e do ganho em tempo de processamento.
- Implementação de outras estratégias aprimoradas de solução dos mínimos quadrados (*e.g.* regressor estocástico) e comparação entre elas.
- Alterar o algoritmo de colônia de formigas com base no tempo para um algoritmo com base em transições, aumentando a sua eficiência computacional.

Referências

- 1 REVOLTELLA, R. P.; LARICCHIA-ROBBIO, L.; LIEDBERG, B. Comparison of conventional immunoassays RIA, ELISA with surface plasmon resonance for pesticide detection and monitoring. *Biotherapy*, Kluwer Academic Publisher, Netherlands, v. 11, p. 135 – 145, June 1998. Citado 2 vezes nas páginas 1 e 2.
- 2 SHANTILATHA, R.; VARMA, S.; MITRA, C. K. Designing a simple biosensor. In: MALHOTRA, B. D.; TURNER, A. P. F. (Ed.). *Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensors*. 1. ed. Sara Burgerhartstraat 25, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 2005. v. 5, p. 1–36. Citado na página 1.
- 3 PILIARIK, M.; HOMOLA, J. SPR sensor instrumentation. In: HOMOLA, J. (Ed.). *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. 1. ed. Berlin: Springer, 2006, (Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, v. 4). p. 95–116. Citado na página 1.
- 4 ROGERS, K. R.; MULCHANDANI, A. *Affinity Biosensors: Techniques and Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998. Citado na página 1.
- 5 WANG, T.-J.; TU, C.-W.; LIU, F.-K. Integrated-optic surface-plasmon-resonance biosensor using gold nanoparticles by bipolarization detection. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, v. 11, n. 2, p. 493 – 499, March-April 2005. Citado na página 1.
- 6 WANG, S.-F. A small-displacement sensor using total internal reflection theory and surface plasmon resonance technology for heterodyne interferometry. *Sensors*, Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland, v. 9, n. 4, p. 2498–2510, April 2009. Citado na página 2.
- 7 OLIVEIRA, L. C.; PEREIRA, E. G.; OLIVEIRA, R. C.; MORAIS, M.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. SPR sensor for tampering detection in biofuels. In: *2015 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC 2015)*. Pisa, Italy, 2015. Citado na página 2.
- 8 RAETHER, H. *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. 1. ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1988. (Springer Tracts in Modern Physics, v. 111). Citado 2 vezes nas páginas 5 e 6.
- 9 HOMOLA, J.; YEEA, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier, v. 54, n. 2, p. 3 – 15, January 1999. Citado na página 5.
- 10 REZENDE, S. M. *Materiais e Dispositivos Eletrônicos*. Editora Livraria da Física, 2004. ISBN 9788588325272. Citado na página 5.
- 11 THIRSTRUP, C.; ZONG, W.; BORRE, M.; NEFF, H.; PEDERSEN, H. C.; HOLZHÜETER, G. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier, v. 100, n. 3, p. 298 – 308, March 2004. Citado 2 vezes nas páginas 7 e 32.

- 12 PAUL, S. Surface plasmon resonance imaging for biosensing. *IET Nanobiotechnology*, Institution of Engineering and Technology, v. 3, p. 71–80(9), September 2009. ISSN 1751-8741. Citado na página 8.
- 13 OLIVEIRA, L.; MOREIRA, C. da S.; THIRSTRUP, C.; MELCHER, E.; LIMA, A.; NEFF, H. A surface plasmon resonance biochip that operates both in the angular and wavelength interrogation modes. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, v. 62, n. 5, p. 1223–1232, May 2013. ISSN 0018-9456. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 33.
- 14 HODGSON, A.; HAQ, S. Water adsorption and the wetting of metal surfaces. *Surface Science Reports*, v. 64, n. 9, p. 381 – 451, 2009. ISSN 0167-5729. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 35.
- 15 THIRSTRUP, C.; ZONG, W. Data analysis for surface plasmon resonance sensors using dynamic baseline algorithm. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier Inc, v. 106, n. 2, p. 796 – 802, May 2005. ISSN 0925-4005. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 16.
- 16 CRESCENZO, G. D.; WOODWARD, L.; SRINIVASAN, B. Online optimization of surface plasmon resonance-based biosensor experiments for improved throughput and confidence. *Journal of Molecular Recognition*, John Wiley & Sons, Ltd., v. 21, n. 4, p. 256–266, 2008. ISSN 1099-1352. Citado na página 13.
- 17 SOUSA, T. A. T.; OLIVEIRA, L. C.; LOUREIRO, F. C. C.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Evaluating the signal processing chain employed in surface plasmon resonance biosensing. In: *2014 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*. Montevideo, Uruguai, 2014. p. 1606–1611. Citado na página 14.
- 18 JOHANSEN, K.; STÅLBERG, R.; LUNDSTRÖM, I.; LIEBERG, B. Surface plasmon resonance: instrumental resolution using photo diode arrays. *Measurement Science and Technology*, v. 11, n. 11, p. 1630. Citado na página 15.
- 19 HU, J.; ZHAO, X. An improved centroid algorithm for a surface plasmon resonance bioanalyzer using microprocessors. In: *Symposium on Photonics and Optoelectronics, 2009*. Wuhan, China, 2009. p. 1–4. Citado na página 16.
- 20 ZHAN, S.; WANG, X.; LIU, Y. Fast centroid algorithm for determining the surface plasmon resonance angle using the fixed-boundary method. *Measurement Science and Technology*, v. 22, n. 2, p. 025201. Citado na página 16.
- 21 FONTANA, E. Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media. *Applied Optics*, OSA, v. 45, n. 29, p. 7632–7642, October 2006. Citado na página 17.
- 22 CHINOWSKY, T. M.; JUNG, L. S.; YEE, S. S. Optimal linear data analysis for surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier Inc, v. 54, n. 1–2, p. 89 – 97, 1999. ISSN 0925-4005. Citado na página 17.
- 23 KURIHARA, K.; NAKAMURA, K.; SUZUKI, K. Asymmetric SPR sensor response curve-fitting equation for the accurate determination of SPR resonance angle. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier Inc, v. 86, n. 1, p. 49 – 57, 2002. ISSN 0925-4005. Citado 4 vezes nas páginas 17, 18, 38 e 55.

- 24 MARQUARDT, D. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, v. 11, n. 2, p. 431–441, 1963. Citado na página 17.
- 25 TOBIŠKA, P.; HOMOLA, J. Advanced data processing for SPR biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 107, n. 1, p. 162 – 169, 2005. ISSN 0925-4005. Proceedings of the 7th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors EUROPT(R)ODE VII. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 38.
- 26 C.KARL, W.; PIEN, H. High-resolution biosensor spectral peak shift estimation. *IEEE Transactions on Signal Processing*, Elsevier Inc, v. 53, n. 12, p. 4631–4639, December 2005. ISSN 1053-587X. Citado na página 17.
- 27 HASTINGS, J. Optimizing surface-plasmon resonance sensors for limit of detection based on a Cramer-Rao bound. *Sensors Journal*, IEEE, v. 8, n. 2, p. 170–175, February 2008. ISSN 1530-437X. Citado na página 18.
- 28 WANG, Z.; DIAMOND, J.; HOU, R.; WANG, K.; SONG, L.; SU, Y.; ZHENG, Z.; ZHU, J. An accurate and precise polynomial model of angular interrogation surface plasmon resonance data. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 151, n. 2, p. 309 – 319, 2011. ISSN 0925-4005. Citado na página 18.
- 29 CHEN, H.; WANG, X. Study on the performance promotion of the surface plasmon resonance analytical system. *Instrumentation Science & Technology*, v. 40, n. 2-3, p. 226–237, 2012. Citado na página 18.
- 30 XIE, Z.; YUHANG, W.; ZHENG, Z. Improving the sensitivity of SPR sensing using map information fusion algorithm. In: *2011 Symposium on Photonics and Optoelectronics (SOPO)*. 2011. p. 1–5. ISSN 2156-8464. Citado na página 18.
- 31 SEREDA, A.; MOREAU, J.; CANVA, M.; MAILLART, E. High performance multi-spectral interrogation for surface plasmon resonance imaging sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 54, n. 0, p. 175 – 180, 2014. ISSN 0956-5663. Citado na página 18.
- 32 GHASEMI, F.; ZHOU, H.; ADIBI, A. Closed-form relations for resonance detection error using statistical analysis of amplitude noise. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, IEEE, v. 21, n. 4, p. 1–8, 2015. Citado na página 18.
- 33 OWEGA, S.; POITRAS, D. Local similarity matching algorithm for determining SPR angle in surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 123, n. 1, p. 35 – 41, 2007. ISSN 0925-4005. Citado na página 18.
- 34 SOUZA FILHO, C. A.; LIMA, A. M. N.; MOREIRA, C. S.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Line shape analysis and extended instrumental operation of surface plasmon resonance sensors. *Plasmonics*, v. 5, n. 3, 2010. ISSN 1557-1955. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 38.
- 35 KARABCHEVSKY, A.; KARABCHEVSKY, S.; ABDULHALIM, I. Fast surface plasmon resonance imaging sensor using radon transform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier Inc, v. 155, n. 1, p. 361 – 365, July 2011. ISSN 0925-4005. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 51.

- 36 GENG, J.; ZHANG, E.; YU, X. A scanning surface plasmon resonance sensor based on the phase shift algorithm. *Measurement Science and Technology*, IOP Publishing, v. 23, n. 4, p. 045105, Mar 2012. ISSN 0957-0233. Citado na página 19.
- 37 PEREIRA, E. G.; OLIVEIRA, L. C.; MORAIS, M. R. A.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Improved data extraction algorithm for biosensors utilizing surface plasmon resonance sensing. In: *Proceedings of the 2014 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*. Montevideo, Uruguai, 2014. p. 1105–1110. Citado na página 21.
- 38 JOHNSON, P.; CHRISTY, R. Optical constants of the noble metals. *Phys. Rev. B*, American Physical Society, v. 6, p. 4370–4379, December 1972. Citado na página 28.
- 39 MOREIRA, C. S.; NETO, A. G. B.; LIMA, A. M.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Exchangeable low cost polymer biosensor chip for surface plasmon resonance spectroscopy. *Procedia Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 1479 – 1482, 2009. ISSN 1876-6196. Proceedings of the Eurosensors XXIII conference. Citado na página 34.
- 40 CHYOU, J.-J.; CHU, C.-S.; CHIEN, F.-C.; LIN, C.-Y.; YEH, T.-L.; HSU, R. C.; CHEN, S.-J. Precise determination of the dielectric constant and thickness of a nanolayer by use of surface plasmon resonance sensing and multiexperiment linear data analysis. *Applied Optics*, OSA, v. 45, n. 23, p. 6038–6044, 2006. Citado na página 38.
- 41 SOUSA, T. A. T.; LIMA, A. M. N. Spr sensors biological layer characterization by using prior knowledge in the neural network design. In: *2014 IEEE International Conference on Computational Intelligence and Virtual Environments for Measurement Systems and Applications (CIVEMSA 2014)*. Ottawa, Canada, 2014. Citado na página 38.
- 42 RAO, C.; TOUTENBURG, H. *Linear Models: Least Squares and Alternatives*. Springer, 1999. (Springer series in statistics). ISBN 9780387988481. Citado 2 vezes nas páginas 39 e 42.
- 43 PEREIRA, E. G.; OLIVEIRA, L. C.; MORAIS, M. R. A.; LIMA, A. M. N.; NEFF, H. Implementation of a FPGA-based data acquisition and processing system for image sensors employed in SPR biosensing. In: *2014 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*. Montevideo, Uruguai, 2014. p. 884–889. Citado na página 47.
- 44 PEREIRA, E. G.; LIMA, A. M. N.; MORAIS, M. Determining the surface plasmon resonance dip from low quality images by using the ant colony optimization algorithm. In: *2014 IEEE International Conference on Computational Intelligence and Virtual Environments for Measurement Systems and Applications (CIVEMSA 2014)*. Ottawa, Canada, 2014. Citado na página 48.
- 45 DORIGO, M.; STUTZLE, T. *Ant Colony Optimization*. MIT Press, 2004. Citado na página 48.
- 46 PEREIRA, E. G.; LIMA, A. M. N.; MORAIS, M. R. A. Determinação da ressonância de plasmons de superfície usando algoritmo de colônia de formigas. In: *Anais do XII Simpósio Brasileiro de Automação Inteligente - SBAI 2015*. Natal - RN, 2015. Citado na página 48.