



Universidade Federal de Campina Grande  
Centro de Engenharia Elétrica e Informática  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica



# Contribuição ao estudo de técnicas de extração de parâmetros para bio-sensores ópticos

Tiago Abreu Tavares de Sousa

*Dissertação de Mestrado submetida à Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Elétrica*

Área de Conhecimento: Processamento de Informação

Orientador:

Antonio Marcus Nogueira Lima

Campina Grande, Paraíba, Brasil

©Tiago Abreu Tavares de Sousa, Março de 2013

# Dissertação de Mestrado

*Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica*

---

Tiago Abreu Tavares de Sousa

Aluno

---

Antonio Marcus Nogueira Lima

Orientador

Campina Grande, Paraíba, Brasil

Março de 2013

*Dedico à minha família.*

# Agradecimentos

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por todas as graças que recebo e sempre recebi, mesmo não sendo merecedor.

Agradeço também à minha mãe, Maria Auxiliadora, e a meu pai, José Tavares, exemplos e motivações para todo meu esforço em alcançar o sucesso, sempre com honra e honestidade.

Agradeço também aos meus irmãos, Tales Abreu e Milena Abreu, com quem aprendi a partilhar, a me doar em ajuda ao próximo, e a brigar. Assim como a toda minha família, alicerces que sempre me sustentou, estimulou e orientou.

Agradeço ao Professor Antonio Marcus, pela oportunidade, orientação e pela confiança em mim depositada.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço aos amigos, não mais colegas, que conquistei na UFCG: Ayslan, Diego, Gregory, Nustenil, Pablo, Roberto, Vágner, Victor (vulgo vitrola) e Vinícius, que muitas vezes pararam suas atividades para me ajudar, conversar ou só tomar um café.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje, de forma especial a amigos e irmãos que fiz na Igreja.

*“Ave Maria, cheia de graça, o Senhor é convosco. Bendita sois vós entre as mulheres.*

*Bendito é o fruto do vosso ventre, Jesus.”*

(Anjo Gabriel)

# Resumo

O objetivo do presente trabalho é a caracterização da camada na qual ocorrem as interações bio-químicas de um bio-sensor óptico baseado no fenômeno da ressonância de plasma de superfície em termos do seu índice de refração e da sua espessura. Essa caracterização foi baseada na curva característica do fenômeno de ressonância de plasma de superfície e de seus parâmetros morfológicos, bem como numa extensão do modelo de Fresnel para fontes de luz policromáticas. Tendo em vista que a geração da curva característica do fenômeno de ressonância de plasma requer o tratamento do sinal bruto obtido do sensor de imagem, o presente trabalho também contemplou uma avaliação dos algoritmos de processamento digital de sinais que permitem minimizar a influência do ruído, maximizando a qualidade da determinação dos atributos principais dessa curva. A determinação do índice de refração e da espessura do analito foi formulada como um problema de otimização não linear, em cuja solução utilizou-se uma rede neuronal. No treinamento da rede neural utilizou-se um modelo computacional cujos parâmetros foram ajustados a partir de dados experimentais. A rede neural foi concebida para explorar o conhecimento prévio obtido na fase caracterização, contemplando efeitos lineares e não lineares, tendo em vista a sensibilidade da curva característica do fenômeno de ressonância de plasma de superfície aos seus parâmetros morfológicos. A extensão do modelo considerando luz policromática resulta em uma maior proximidade das curvas simulada e experimental, inclusive de seus parâmetros morfológicos. Contudo essa consideração implica em uma perda de sensibilidade da curva. As técnicas de processamento de sinais aplicadas a curvas SPR devem ser aplicadas em uma combinação específica para maior eficiência. A utilização da rede neural permitiu extrair o índice de refração e a espessura do analito dos dados experimentais.

**Palavras Chave:** Ressonância de Plasma de Superfícies, Bio-sensor, Processamento de sinais, Rede Neural.

# Abstract

The objective of this study is to characterize the last layer (in which bio-chemical interactions occurs) of an optical biosensor based on the phenomenon of plasmon resonance surface in terms of its refractive index and thickness. This characterization was based on the characteristic curve of the surface plasmon resonance phenomenon and its morphological parameters, as well as an extension of the model Fresnel for polychromatic light sources. The generation of the characteristic curve of the plasmon resonance phenomenon requires to treat the raw signal obtained by the image sensor, this work also contemplated a evaluation of digital signal processing algorithms that allows to minimize the influence of noise, maximizing quality the determination of the main attributes. The determination of the refractive index and thickness of analyte was formulated as a nonlinear optimization problem in which solution was achieved with neural network. The neural network training was performed with a computational model whose parameters were adjusted from experimental data. The neural network was designed to explore prior knowledge obtained in the characterization step, considering linear and nonlinear effects, in view of the sensitivity characteristic curve of the phenomenon of surface plasmon resonance to its morphological parameters. The model was extended to consider the polychromatic light, resulting in a theoretical curve closer to the experimental one, including closer morphological parameters. However this consideration implies in a loss of curve sensitivity . The techniques of signal processing applied to SPR curves must be applied in a specific combination for greater efficiency. A neural network can estimate simultanously the analyte refractive index and thickness, even whn trained with simulated data.

**Key words:** Surface Plasmon Resonance, Biosensor, Signal Processing, Neural Network.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> . . . . .	II
<b>Resumo</b> . . . . .	IV
<b>Abstract</b> . . . . .	V
<b>Índice</b> . . . . .	VI
<b>Índice de Tabelas</b> . . . . .	IX
<b>Índice de Figuras</b> . . . . .	X
<b>1 Introdução Geral</b> . . . . .	1
1.1 Objetivo Geral . . . . .	3
1.2 Objetivos Específicos . . . . .	3
1.3 Organização do Trabalho . . . . .	3
<b>2 Fundamentação Teórica</b> . . . . .	5
2.1 Fenômeno da ressonância de plasma de superfície . . . . .	6
2.2 Modos de interrogação . . . . .	16
2.3 Morfologia da curva SPR . . . . .	17
2.4 Sensorgrama . . . . .	20
2.5 Estado da arte . . . . .	21
2.5.1 Técnicas de ajuste de dados . . . . .	21
2.5.2 Método de interrogação angular . . . . .	22
2.5.3 Método de interrogação espectral . . . . .	23
2.5.4 Estimação de parâmetros . . . . .	23
2.5.5 Parâmetros morfológicos . . . . .	23

---

2.6	Considerações sobre o Estado da Arte . . . . .	24
2.7	Redes Neurais . . . . .	25
2.7.1	Treinamento . . . . .	26
2.7.2	Avaliação . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Modelo Matemático e Estudo de Sensibilidade . . . . .</b>	<b>30</b>
3.1	Introdução . . . . .	30
3.2	O modelo de simulação - limitação e melhoria . . . . .	30
3.3	Sensibilidade dos parâmetros morfológicos ao índice de refração da camada sensível . . . . .	35
3.4	Sensibilidade dos parâmetros morfológicos à espessura da camada sensível . . . . .	38
3.5	Resumo do Capítulo . . . . .	40
<b>4</b>	<b>Plataforma Experimental . . . . .</b>	<b>41</b>
4.1	O SPREETA . . . . .	43
4.2	O Módulo de controle . . . . .	47
4.3	O Módulo de aquisição e processamento de dados . . . . .	49
4.4	Procedimentos experimentais . . . . .	50
4.5	Resumo do capítulo . . . . .	51
<b>5</b>	<b>Processamento do Sinal . . . . .</b>	<b>53</b>
5.1	Caracterização das fontes de ruído . . . . .	53
5.2	Técnicas de Minimização de Ruído . . . . .	56
5.2.1	Minimização do ruído temporal - no domínio do tempo . . . . .	58
5.2.2	Minimização do ruído temporal - no domínio da frequência . . . . .	59
5.2.3	Minimização do ruído espacial . . . . .	60
5.2.4	Avaliação das técnicas . . . . .	61
5.3	Considerações finais . . . . .	66
<b>6</b>	<b>Extração dos Parâmetros . . . . .</b>	<b>67</b>
6.1	Redes neurais . . . . .	67
6.2	Informações morfológicas . . . . .	69
6.3	Utilização do conhecimento prévio . . . . .	70
6.4	Definição da rede neural de múltiplos conhecimentos prévios . . . . .	72

---

6.4.1	Escolha do fator de regularização ( $\gamma$ ) . . . . .	73
6.4.2	Escolha do número de neurônios ocultos . . . . .	73
6.4.3	Escolha das variáveis de treinamento . . . . .	74
6.5	Considerações Finais. . . . .	75
<b>7</b>	<b>Conclusões e Perspectivas . . . . .</b>	<b>79</b>
7.1	Conclusões . . . . .	79
7.2	Trabalhos futuros . . . . .	80
	<b>Referências Bibliográficas . . . . .</b>	<b>82</b>

# Índice de Tabelas

2.1	Grandezas de interesse aos bio-sensores SPR. . . . .	12
3.1	Parâmetros das curvas SPR experimental e simulada para um amostra de água, ver Figura 3.1 . . . . .	32
3.2	Parâmetros das curvas SPR experimental e simulada considerando espalhamento espectral da luz para um amostra de água, ver Figura 3.4 . . . . .	34
6.1	Informações a serem utilizadas no treinamento da Rede Neural para o índice de refração $n_3$ . . . . .	70
6.2	Informações a serem utilizadas no treinamento da Rede Neural para a espessura $d_3$ . . . . .	70
6.3	Erro médio da rede neural para diferentes valores de $\gamma$ . . . . .	73
6.4	Erro percentual médio erro percentual máximo da rede neural para combinações de diferentes técnica no cálculo dos parâmetros morfológicos. . . . .	74

# Índice de Figuras

2.1	Configurações proposta por a) Otto e b) Kretschmann-Raether . . . . .	5
2.2	Refração da Luz com ângulo de incidência $\alpha$ de um meio com índice $n_1$ para um de índice $n_2$ . . . . .	7
2.3	Modelo SPR e curvas características . . . . .	10
2.4	Ilustração do complexo de quatro camadas utilizado nos cálculos do sistema de Fresnel . . . . .	11
2.5	Camada biológica formada sobre a camada de ouro. . . . .	12
2.6	Curva característica do fenômeno SPR no modo AIM (simulação) e parâmetros relevantes: FWHM, Linha Base Dinâmica, Espessura, Assimetria, dip e valor de ressonância. A faixa de ângulos de incidência $[\theta_I, \theta_F]$ depende da configuração utilizada: bio-chip, luz excitante, entre outros. . . . .	17
2.7	Curva característica do fenômeno SPR no modo AIM (simulação) e parâmetros relevantes: FWHM, LBD, Espessura, Assimetria, dip e valor de ressonância. . . . .	20
2.8	Representação da variação do ângulo de ocorrência do mínimo (ângulo de ressonância) em um sensorgrama (a) Curvas SPR (Refletividade X ângulo) rotacionada $90^\circ$ no sentido anti-horário; (b) Sensorgrama teórico. . . . .	21
2.9	Modelo de camadas com o adicional $2^*$ ao filme metálico com espessura variante, variando $\epsilon_2$ . . . . .	22
2.10	Esquema do neurônio natural (a) e neurônio artificial (b). . . . .	25
2.11	Rede Neural Artificial simples, com apenas duas variáveis de entrada, duas de saída e sem neurônios intermediários (camada oculta). . . . .	26
3.1	Curva SPR simulada para a água (azul) e Curva SPR adquirida experimentalmente para água (verde) . . . . .	31

3.2	Intensidade luminosa do LED medida com espectrômetro USB4000 da <i>Ocean Optcis</i> . . . . .	33
3.3	Comparação das curvas simuladas considerando o espalhamento espectral da luz e sem considerar, bem como a variação da sensibilidade à variação dos parâmetros. . . . .	33
3.4	Curva SPR simulada para a água considerando o espalhamento espectral da luz excitante (azul) e Curva SPR adquirida experimentalmente para água (verde) . . . . .	34
3.5	Simulação da resposta SPR para diferentes substâncias na camada sensível conservando sua espessura: $d_3 = 50nm$ . . . . .	35
3.6	Variação da Energia da curva e seu valor de Linha Base (FWHM e Dinâmica) com o índice de refração da camada sensível: $d_3 = 50nm$ . . . . .	36
3.7	Variação da condição de ressonância com o índice de refração da camada sensível: $d_3 = 50nm$ . Calculada por diferentes métodos. . . . .	37
3.8	Variação da espessura e assimetria da curva SPR com o índice de refração da camada sensível: $d_3 = 50nm$ . Calculada por diferentes métodos. . . . .	37
3.9	Simulação da resposta SPR para diferentes espessuras da camada sensível com a mesma substância: $n_3 = 1.35RIU$ . . . . .	38
3.10	Variação da Linha Base (FWHM e Dinâmica) com a espessura da camada sensível: $n_3 = 1.35RIU$ . . . . .	39
3.11	Variação da condição de ressonância com a espessura da camada sensível: $n_3 = 1.35RIU$ . Calculada por diferentes métodos. . . . .	39
3.12	Variação da espessura e assimetria da curva SPR com a espessura da camada sensível: $n_3 = 1.35RIU$ . Calculada por diferentes métodos. . . . .	40
4.1	SPREETA: Bio-sensor SPREETA e periféricos. . . . .	41
4.2	Bio-sensor VIR e periféricos. . . . .	41
4.3	Bio-sensor PPBIO. . . . .	41
4.4	Diagrama de blocos da plataforma experimental. . . . .	44
4.5	Diagrama do sistema de aquisição de dados. . . . .	45

4.6	Esquema do SPREETA com seus componentes. 1 - LED; 2 - Polarizador; 3 - Célula de Fluxo; 4 - termistor; 5 - superfície sensível; 6 - espelho; 7 - arranjo de fotodiodos. . . . .	45
4.7	Diagrama de tempo dos sinais de controle e saída do SPREETA. . . . .	47
4.8	(a) Estrutura física do SPREETA e (b) Diagrama de Blocos. . . . .	48
4.9	Programa em LabView da NI (a) Aquisição dos dados; (b) Pré-processamento (filtros temporal e espacial); e (c) Processamento e apresentação dos dados do SPREETA. . . . .	49
4.10	Interface do programa desenvolvido para adquirir, pre-processar, apresentar e gravar os dados do SPREETA. . . . .	50
5.1	Diagrama de blocos do arranjo fotodetector. (SPREETA, 2000) . . . . .	54
5.2	Diagrama do blocos do sistema. . . . .	57
5.3	Sensorgramas estimados de experimentos com água e PBS realizados com o Spreeta. . . . .	62
5.4	Comparação de diferentes técnicas de redução do ruído temporal. Os valores para $L_t = 0$ correspondem à curva sem nenhum tratamento. . . . .	63
5.5	Comparação de diferentes técnicas de redução do ruído espacial aplicadas antes e depois de obter a curva SPR. Os valores para $L_s = 0$ correspondem à curva sem nenhum tratamento. O filtro Savitzky-Golay não está definido quando o grau $< 2L_s + 1$ . . . . .	63
5.6	Comparação de diferentes técnicas de redução do ruído frequencial aplicadas antes e depois de obter a curva SPR. . . . .	64
5.7	Estudo das possíveis combinações das técnicas de remoção de ruído. Na legenda: O tipo de ruído tratado, a técnica utilizada e o parâmetro que levou ao melhor resultado. . . . .	65
5.8	Resultado da sequência de pré-processamento da curva SPR na curva experimental. Da esquerda para a direita: curva bruta; após tratamento temporal; após tratamento espacial; após tratamento frequencial. . . . .	66

6.1	Variação dos parâmetros morfológicos da curva SPR com os valores de $n_3$ e $d_3$ . Foram simuladas 10.000 curvas com $n_3$ variando de 1,3 a 1,4 a um passo de $10^{-3}$ e $d_3$ variando de $1nm$ a $100nm$ a um passo de $1nm$ calculados os parâmetros morfológicos para cada das curvas. . . . .	68
6.2	O melhor resultado de uma rede neural com ativação sigmóide e treinamento <i>backpropagation</i> . . . . .	69
6.3	Estrutura da rede neural com múltiplos conhecimentos prévios. Na camada escondida os neurônios até $j1$ são não-lineares e os demais são lineares. . . . .	71
6.4	Resultados suavizados da utilização um ajuste de curvas baseado em rede neural. Para ajuste da rede foram utilizados os parâmetros morfológicos da curva calculados com base em uma linha de base dinâmica e na técnica do primeiro momento (centróide). . . . .	75
6.5	Resultados suavizados da utilização um ajuste de curvas baseado em rede neural. Para ajuste da rede foram utilizados os parâmetros morfológicos da curva calculados com base em uma linha de base dinâmica e na técnica de ajuste polinomial. . . . .	75
6.6	Resultados suavizados da utilização um ajuste de curvas baseado em rede neural. Para ajuste da rede foram utilizados os parâmetros morfológicos da curva calculados com base em uma linha de base FWHM e na técnica do primeiro momento (centróide). . . . .	76
6.7	Resultados suavizados da utilização um ajuste de curvas baseado em rede neural. Para ajuste da rede foram utilizados os parâmetros morfológicos da curva calculados com base em uma linha de base FWHM e na técnica de ajuste polinomial. . . . .	76
6.8	Resultado de rede neural treinada com curvas simuladas sem ruído e aplicada a curvas simuladas com ruído. . . . .	78
6.9	Resultados obtidos com a rede neural aplicada aos dados experimentais. . . . .	78

# 1

## Introdução Geral

A alta sensibilidade, baixo tempo de resposta, baixo custo, fácil manuseio e portabilidade dos equipamentos bio-sensores têm garantido a esses grande expansão no mercado. Um exemplo são os bio-sensores para monitoramento da Glicose, que em 2008 movimentaram aproximadamente 8,8 bilhões de dólares no mercado mundial (Oliveira, 2011).

O *Graduate Institute of Management Science de Taiwan* (2009), estimou o mercado de bio-sensores em 2007 movimentando 10,8 bilhões de dólares com crescimento anual estimado em 10,4%. O *Global Industry Analysts, Inc.* (2010) prevê um mercado de 17,3 bilhões de dólares em 2015. Essa previsão leva em consideração até mesmo a lenta penetração de bio-sensores em mercados já consolidados como teste de pH, segurança industrial e sistemas de monitoramento de gás. O crescimento é atribuído as novas aplicações de bio-sensores que estão surgindo ou sendo expandidas (Sadana e Sadana, 2011).

Bio-sensores classificados como ópticos se sobressaem sobre os demais por seu tamanho reduzido, a velocidade de resposta, a facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético, boa biocompatibilidade e não-necessidade de elementos ativos na biocamada (Moreira, Lima, Neff, Neto e Loureiro, 2011)

Homola (Homola, 2003) destaca, dentre os bio-sensores ópticos, o bio-senoreamento SPR e de fluorescência sobre as demais técnicas. A segunda é mais sensível e seletiva, contudo a técnica SPR possibilita a mais alta sensibilidade e seletividade sem a presença de marcadores.

O bio-sensor SPR tem grande versatilidade de aplicações já que sua camada biológica pode ser formada para imobilizar as mais diversas substâncias. Determinada uma reação a ser analisada o a dificuldade de utilização do bio-sensor SPR consiste em encontrar uma

combinação de substâncias sensíveis à reação que se adiram ao ouro. Para detectar vírus, por exemplo, é necessário encontrar substâncias que se liguem ao ouro e ao anticorpo que reage com o vírus de interesse.

Boecker (D., Zybin, Horvatic, Grunwald e Niemax, 2007) ressaltou a importância do bio-sensor SPR na detecção de biomoléculas desde a primeira vez que a técnica foi utilizada, apesar de suas limitações na época.

A técnica ainda não é completamente dominada, ainda possuindo limitações não solucionadas:

1. A alta sensibilidade do bio-sensor SPR implica em uma baixa robustez do equipamento a ruído, sendo importante minimizar o efeito desse ruído, intrínseco a qualquer medição, antes de obter a grandeza sensoriada.
2. A estrutura necessária ao fenômeno SPR envolve um complexo específico de camadas ainda não completamente caracterizado. As grandezas que influenciam no fenômeno se relacionam de tal forma que devem ser quantificadas juntas, de forma a minimizar o erro de ambas.
3. Identificar deteriorações no complexo de camadas que influenciem o resultado do sensor.
4. A cinética de formação da camada na qual ocorrem as interações bio-químicas não é completamente dominada. Ainda é um problema determinar se a formação está completa.
5. Utilizar o fenômeno SPR para um refractômetro para medir índice de refração absoluto. Os sensores SPR normalmente medem apenas variações do índice de refração, mas há a necessidade de medir o valor absoluto para líquidos e sólidos (Liang, Miranto, Granqvist, Sadowski, Viitala, Wang e Yliperttula, 2010).
6. Utilizar o sensor SPR para medir o índice de refração complexo, isto é, o índice de refração e o coeficiente de extinção (absorção) (Luna-Moreno, Monzón-Hernández, Noé-Arias e Regalado, 2012).

Este trabalho apresenta contribuições a respeito de minimização do ruído (1) e caracterização do complexo de camadas (2). Contudo um avanço na caracterização das camadas do complexo representa também um avanço na solução dos demais problemas.

## 1.1 Objetivo Geral

A seletividade e sensibilidade de um bio-sensor, SPR ou não, depende de uma correta formação de uma camada de imobilização da substância sensoriada. Isto porque a reação com a substância imobilizadora que será sensoriada, não a substância em si.

Caracterizar esta camada quanto ao seu índice de refração e sua espessura através de uma análise da curva resposta do bio-sensor SPR, chamada curva SPR, significa caracterizar a substância imobilizada. A correta identificação da substância pode ser feita apenas com o índice de refração, mas esta grandeza também é influenciada pela espessura da camada. A identificação desta espessura ainda permite determinar quando a camada de imobilização está pronta, podendo-se dar início ao sensoriamento.

Portanto objetiva-se determinar a espessura e o índice de refração da camada sensível do bio-sensor simultaneamente, de forma a considerar a influencia de uma grandeza sobre a outra.

## 1.2 Objetivos Específicos

Para alcançar o objetivo, o trabalho foi dividido nos seguintes objetivos específicos:

- Simular e estudar a resposta do bio-sensor através do modelo já consolidado baseado nas equações de Fresnel.
- Caracterizar o modelo matemático identificando suas limitações e como superá-las.
- Aprimorar e utilizar o módulo de aquisição de dados baseado no bio-sensor SPREETA.
- Utilizar técnicas de processamento de sinais para estudar e minimizar os ruídos inerentes à aquisição de dados do bio-sensor.
- Utilizar técnicas de estimação de parâmetros para determinar o índice de refração e a espessura da camada sensível através da comparação das curvas simulada e experimental.

## 1.3 Organização do Trabalho

A presente dissertação está organizada da seguinte forma:

- **Capítulo 2 - Fundamentação Teórica.** Este capítulo apresenta de forma simplificada e resumida os conhecimentos necessários à compreensão dos capítulos seguintes da dissertação. Discute-se o princípio SPR, o complexo de camadas, o modelo matemático, os diferentes modos de interrogação, a morfologia da curva resposta (curva SPR), o sensorgrama e os bio-sensores disponíveis no Laboratório de Bio-Sensores (LABIO) da UFCG.
- **Capítulo 3 - Modelo Matemático e Estudo de Sensibilidade.** Este capítulo apresenta resultados obtidos trabalhando com as equações de Fresnel: simulações, limitações do modelo, melhorias realizadas e estudo de sensibilidade aos parâmetros de interesse.
- **Capítulo 4 - Plataforma Experimental.** Este capítulo descreve toda a plataforma experimental. O bio-sensor utilizado, seu controlador, o software de processamento e o procedimento experimental são descritos neste capítulo.
- **Capítulo 5 - Processamento do Sinal.** Este capítulo trata do resultado do estudo do ruído inerente ao processo, aplicando técnicas de suavização da curva e filtragem do ruído.
- **Capítulo 6 - Extração de Parâmetros.** Este capítulo apresenta os métodos numéricos utilizados na extração dos parâmetros de interesse.
- **Capítulo 7 - Conclusões e Perspectivas.** Este descreve os principais resultados e conclusões da dissertação, bem como das perspectivas de trabalhos futuros.

# 2

## Fundamentação Teórica

Desde o início do século XX um fenômeno de difração anormal em grades de difração foi observado e estudado por Wood (Wood, 1902). Entretanto, somente na década 60 Kretschmann (Kretschmann e Raether, 1968) e Otto (Otto, 1968) exploraram a “reflexão total frustrada” em arranjos experimentais, por intermédio dos quais geravam-se ondas de plasma superficiais. Otto propôs uma estrutura na qual o filme metálico é separado do prisma por uma distância da ordem do comprimento de onda da luz incidente, ver Figura 2.1a. Kretschmann utilizou substratos de vidro para depositar o metal sobre o prisma, ver Figura 2.1b. A configuração mais utilizada é a apresentada por Kretschmann-Raether devido a uma maior facilidade de instrumentação (Oliveira, 2011).

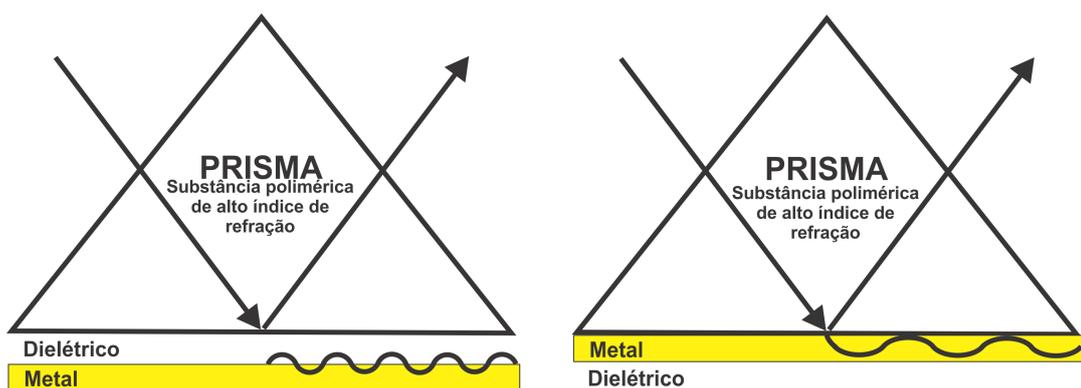


Figura 2.1: Configurações proposta por a) Otto e b) Kretschmann-Raether

A ressonância de plasma de superfície (*Surface Plasmon Resonance - SPR*) é uma oscilação da densidade de carga que pode existir na interface de um meio metálico e um dielétrico. Essa oscilação é uma onda eletromagnética superficial, por isso denominada de

onda de plasma de superfície (Surface Plasmon Wave - SPW). Uma SPW é uma onda TM-polarizada (o vetor magnético é perpendicular à direção de propagação da onda e paralelo ao plano da interface).

O fenômeno SPR é excitado incidindo um feixe luminoso sobre o meio metálico da interface metal/dielétrico. A existência das ondas de plasma superficiais depende da polarização e do comprimento de onda da luz incidente, bem como das dimensões físicas e das características ópticas e elétricas dos dois meios. Tipicamente essa superfície metálica é um fino filme de ouro, prata ou dióxido de titânio.

O feixe luminoso refletido pela superfície contém informações da SPW que podem ser utilizadas para caracterizar a camada dielétrica. Deste modo, conhecendo-se as condições de existência de uma SPW, é possível caracterizar o meio dielétrico desde que as propriedades do filme metálico sejam conhecidas. Esta possibilidade permite desenvolver bio-sensores ópticos de alta sensibilidade.

O sensor que explora o fenômeno da ressonância de plasma de superfície, nomeado neste trabalho por bio-sensor SPR, utiliza a camada dielétrica como meio transdutor. Qualquer variação das grandezas químicas e biológicas das substâncias presentes na camada altera suas propriedades ópticas, conseqüentemente altera a SPW. Um sistema elétrico simples capta o sinal óptico refletido pelo interface metal/dielétrico e o converte em sinal elétrico analógico e, posteriormente digital.

Esse método de transdução pode ser realizado em tempo real, é livre de marcadores, permite alta especificidade da substância analisada, além de alta sensibilidade e resolução, necessita de uma pequena amostra do analito e a sua superfície pode ser preparada para as mais diversas finalidades, conferindo aos bio-sensores SPR uma flexibilidade em sua área de atuação.

## 2.1 Fenômeno da ressonância de plasma de superfície

Um feixe luminoso que incide em uma interface entre dois meios com diferentes índices de refração sofre reflexão e/ou refração. Sendo o meio de origem com índice de refração maior que o do outro meio, verifica-se um maior grau de reflexão, se o ângulo de incidência difere de  $90^\circ$ . Ou seja, uma parte do feixe é refletida e permanece no meio de origem e a outra é refratada e penetra no meio de menor índice. Contudo existe um ângulo crítico de incidência

da luz a partir do qual a reflexão deve ser total. Esse fenômeno é conhecido como reflexão interna total (TIR)(Filho, 2006).

O fenômeno TIR não é observado quando um feixe de luz devidamente polarizada incide sobre uma interface metal/dielétrico em condições específicas. Nessas condições deve ocorrer o fenômeno SPR, que, de forma simplificada é a penetração de parte da radiação no meio de menor índice de refração, o que cria um campo elétrico evanescente na região de incidência do feixe luminoso.

### O campo evanescente

Seja  $E$  uma onda eletromagnética de amplitude  $E_0$ , com frequência angular  $\omega$  que se propaga no meio de índice de refração  $n$ , temos que  $E$  é uma onda viajante apenas se o expoente em (2.1) for complexo (Schasfoort e Tudos, 2008).

$$E = E_0 e^{j\omega t - j(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r})} = E_0 e^{j\omega t - \underbrace{(jk_x x + jk_y y + jk_z z)}_{j\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}}}. \quad (2.1)$$

A magnitude do vetor de onda  $\mathbf{k}$  é dada por

$$k = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2} = n \frac{2\pi}{\lambda} = n \frac{\omega}{c}, \quad (2.2)$$

sendo sua direção paralela à propagação da onda,  $\mathbf{r}$  o vetor posição e  $j = \sqrt{-1}$ ,  $\lambda$  o comprimento de onda e  $c$  a velocidade de propagação no vácuo.

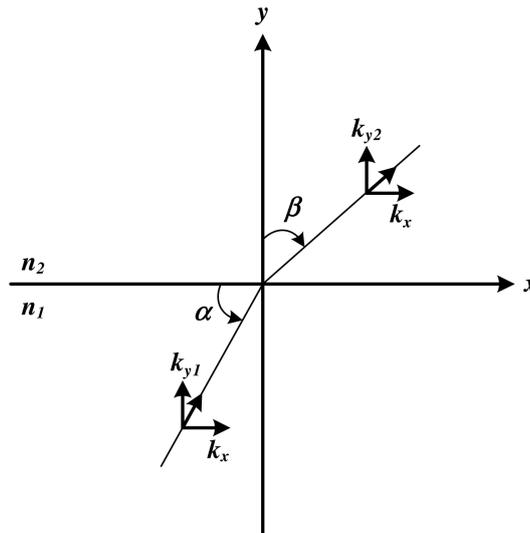


Figura 2.2: Refração da Luz com ângulo de incidência  $\alpha$  de um meio com índice  $n_1$  para um de índice  $n_2$

Sejam dois meios, um metálico de índice de refração  $n_1$  e um dielétrico com índice  $n_2$ , uma onda propagando-se no meio metálico atingindo a interface com ângulo  $\alpha$  e após a refração propaga-se no meio dielétrico com ângulo  $\beta$ , como mostra na Figura 2.2. Considere-se a direção de propagação tal que  $k_z = 0$  para tornar o problema bi-dimensional. Esta consideração não causa perda de generalidade (Schasfoort e Tudos, 2008). Para essa situação a lei de Snell pode ser aplicada, ou seja:

$$n_1 \sen \alpha = n_2 \sen \beta. \quad (2.3)$$

Sabendo que  $k_{x_1} = k_1 \sen \alpha$  e  $k_{x_2} = k_2 \sen \beta$ , conclui-se que (2.2) implica em

$$k_{x_1} = n_1 \frac{\omega}{c} \sen \alpha \quad \text{e} \quad k_{x_2} = n_2 \frac{\omega}{c} \sen \beta$$

e

$$k_{x_1} \frac{c}{\omega} = n_1 \sen \alpha \quad \text{e} \quad k_{x_2} \frac{c}{\omega} = n_2 \sen \beta$$

Da Lei de Snell, (2.3), obtém-se

$$k_{x_1} \frac{c}{\omega} = k_{x_2} \frac{c}{\omega}$$

e portanto

$$k_{x_1} = k_{x_2} = k_x. \quad (2.4)$$

Também é possível concluir que (2.2) implica em

$$\begin{aligned} k_2^2 &= k_x^2 + k_{y_2}^2 = n_2^2 \left( \frac{2\pi}{\lambda} \right)^2, \\ k_1^2 \sen^2 \alpha + k_{y_2}^2 &= n_2^2 \left( \frac{2\pi}{\lambda} \right)^2, \\ n_1^2 \left( \frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \sen^2 \alpha + k_{y_2}^2 &= n_2^2 \left( \frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \end{aligned}$$

e

$$k_{y_2}^2 = n_1^2 \left( \frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \left( \frac{n_2^2}{n_1^2} - \sen^2 \alpha \right) \quad (2.5)$$

No caso em que  $n_1 > n_2$  existe  $\alpha$  tal que  $\sen \alpha > \frac{n_2}{n_1}$  e a parte à direita da igualdade (2.5) é negativa, conseqüentemente,  $k_y$  é puramente imaginário. Com  $K_y = jk_y$  puramente real a expressão (2.1), para o meio 2, representa uma onda viajante apenas na direção paralela à interface, ou seja,

$$E_2 = E_0 e^{-K_y y} e^{j\omega t - jk_x x}, \quad (2.6)$$

cuja amplitude decai exponencialmente com a penetração da onda no meio (direção  $y$ ). Esse é um campo evanescente, com uma onda de superfície.

É possível calcular a profundidade de penetração da onda no meio 2 através de (2.6). Definindo essa profundidade como a distância que o campo tem intensidade  $1/e$  da intensidade na superfície, temos a profundidade de penetração no meio  $i$  é dada por:  $1/K_y i$ . Essa penetração é da ordem de metade do comprimento de onda da luz incidente. O campo eletromagnético está presente apenas próximo à interface, assim o campo só é influenciado por mudanças nas propriedades dielétricas do material na região próxima à interface. Propriedades estas que variam com os materiais utilizados, o processo de fixação das duas camadas, suas espessuras e a temperatura (Filho, 2006).

A temperatura influencia todas as camadas individualmente, variando as grandezas relevantes de cada camada. O modelo utilizado não inclui esta influência, contudo ela será mantida constante durante os experimentos permitindo que todo o ambiente e o material utilizado no experimento estejam na mesma temperatura.

### O índice de refração

Para analisar o efeito da ressonância de plasma, é preciso solucionar um problema de eletromagnetismo para um campo eletromagnético na condição de contorno entre dois meios diferentes. Através das equações de Maxwell pode-se encontrar o vetor da onda da interface metal-dielétrico ( $\vec{k}_{sp}$ ), cujo módulo depende da parte real da permissividade elétrica do condutor  $\varepsilon_{mr}$  e do índice de refração do meio dielétrico  $n_d$ , ver (2.7) (Filho, 2006).

$$k_{sp} = ||\vec{k}_{sp}|| = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\varepsilon_{2r} n_3^2}{\varepsilon_{2r} + n_3^2}} \quad (2.7)$$

Como podemos ver na equação  $k_{sp}$  é bastante sensível a mudanças no meio dielétrico.

A componente do feixe de luz incidente  $k_x$  na direção de  $k_{sp}$  é dada por (2.2):

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin \theta \quad (2.8)$$

Sendo  $n_1$  o índice de refração do substrato no qual o feixe luminoso está presente antes de encontrar a interface metal/dielétrico,  $\varepsilon_{2r}$  a parte real da constante dielétrica da camada metálica,  $n_3$  o índice de refração do dielétrico,  $\lambda$  o comprimento de onda do feixe de luz incidente e  $\theta$  o ângulo de incidência desse feixe luminoso (ver Figura 2.3).

A relação entre constante dielétrica e índice de refração de uma radiação eletromagnética é dada por

$$\eta = \sqrt{\epsilon_r \mu_r},$$

sendo  $\epsilon_r$  a permissividade relativa do material e  $\mu_r$  a permeabilidade. Para a maioria dos materiais  $\mu_r$  é próximo à unidade nas frequências visíveis, valendo a aproximação  $n = \sqrt{\epsilon_r}$ .

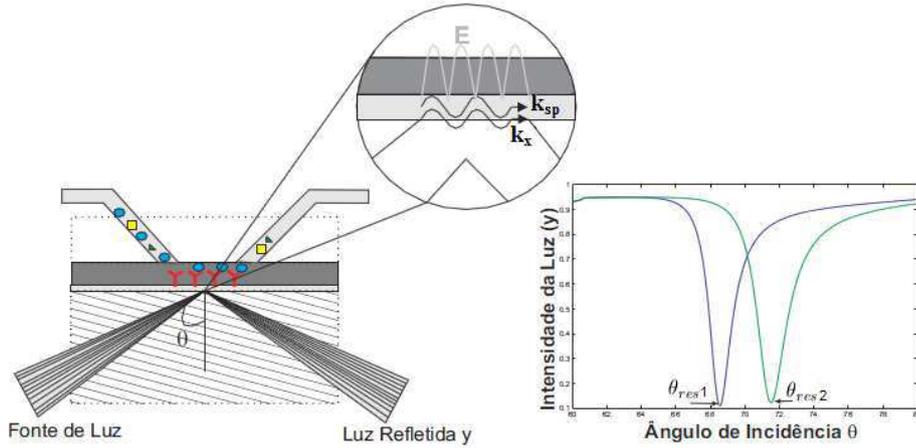


Figura 2.3: Modelo SPR e curvas características

Na condição de ressonância ( $\theta = \theta_R$ ) o vetor de onda  $k_x$  é igual a  $k_{sp}$ . Nesta condição, parte da energia do feixe de luz é absorvida pela onda de plasma causando uma diminuição na intensidade da luz refletida.

Igualando (2.7) a (2.8) pode-se obter o valor do índice de refração do meio dielétrico, apresentado em (2.9).

$$n_3 = \sqrt{\frac{\epsilon_{2r}(n_1 \sen \theta_R)^2}{\epsilon_{2r} - (n_1 \sen \theta_R)^2}} \quad (2.9)$$

Através da análise da intensidade da luz refletida em função do ângulo de incidência, pode-se encontrar o ângulo de ressonância  $\theta_R$  que está associado ao ponto mínimo da curva ilustrada na Figura 2.3.

Quando a substância a ser medida passa pelo biocatalizador fixando-se no elemento sensível, existe uma alteração no índice de refração do meio dielétrico, que é pronunciada pelo deslocamento da posição do mínimo da curva SPR de  $\theta_{R1}$  para  $\theta_{R2}$ . Este deslocamento está ilustrado na Figura 2.3.

Considerando que o elemento sensor de índice de refração  $n_3$  é um meio semi-infinito, obtém-se (2.9). Um modelo de multi-camadas é mais adequado, porém verifica-se a necessi-

dade do conhecimento da espessura do elemento sensor (bio) químico, que geralmente é um valor desconhecido (Filho, 2006). Sendo a determinação da espessura da camada sensível, bem como o índice de refração da mesma, um objetivo deste trabalho.

### O complexo de camadas

No bio-sensor SPR é essencial a existência de um complexo de camadas propício à fixação da substância analisada e à ocorrência do fenômeno em questão. Além das camadas já citadas existem as camadas externas: um substrato óptico de elevado índice de refração no qual se propaga o feixe luminoso antes de atingir o filme metálico e o meio no qual a substância analisada se encontra, geralmente ar ou água. Enfim, uma estrutura de quatro camadas, apresentada na Figura 2.4, forma o complexo de camadas sob estudo. Essas camadas são:

- Meio 1: Um material substrato óptico com índice de refração elevado (real)  $n_{1re}$  e espessura  $d_1$ , que pode ser considerada infinita.
- Meio 2: Fino filme de metal, com índice de refração complexo conhecido  $n_{2re} + jn_{2im}$ . A espessura  $d_2$  deve ser muito menor que o comprimento de onda da luz.
- Meio 3: A camada dielétrica, onde ocorre a transdução. Índice de refração complexo  $n_{3re} + jn_{3im}$  e espessura  $d_3$ . Para interações biomoleculares  $n_{3im} \sim 0$ .
- Meio 4: Camada, normalmente água ou ar, com índice de refração real  $n_{4re}$ . A espessura  $d_4$  é considerada infinita.

As faixas de valores médios das grandezas de interesse são apresentadas na Tabela 2.1 (Neff, Zong, Lima, Borre e Holz Hüter, 2009). Contudo os valores de índice de refração dependem do comprimento de onda da luz incidente.

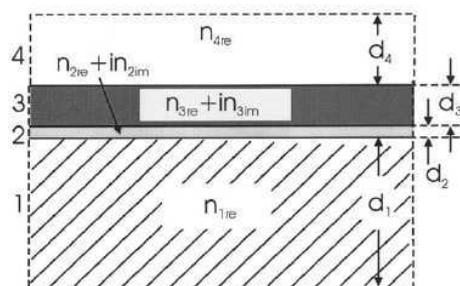


Figura 2.4: Ilustração do complexo de quatro camadas utilizado nos cálculos do sistema de Fresnel

Destas camadas dependem a sensibilidade e seletividade do bio-sensor SPR. Por exemplo a espessura do filme metálico, bem como sua composição são estudados na literatura, seja na busca pela espessura ótima da camada ou por um metal (ou combinação de metais) que resulte na maior sensibilidade. A camada dielétrica também é alvo dos pesquisadores, contudo mesmo determinar se a camada está completamente formada é um desafio.

Meio	Valores Médios	
1. Substrato	$n_1 = 1,526$	$d_1 = \infty$
2. Filme de Ouro	$n_2 = 0.101 + j3.787$	$d_2 \sim 50nm$
3. Camada Sensível (Transdutora)	$n_3 = 1,33 \sim 1,38$	$d_3 < 1nm$ até $d_3 > 400nm(\infty)$
4. Água	$n_4 = 1,33.$	$d_4 = \infty$

A camada dielétrica deve ser preparada de acordo com a substância em estudo, sendo específica para cada aplicação. Ao se analisar determinado antígeno no sangue, por exemplo, a camada de imobilização apresentada na Figura 2.5 é necessária. O processo de formação dessa camada consiste em:

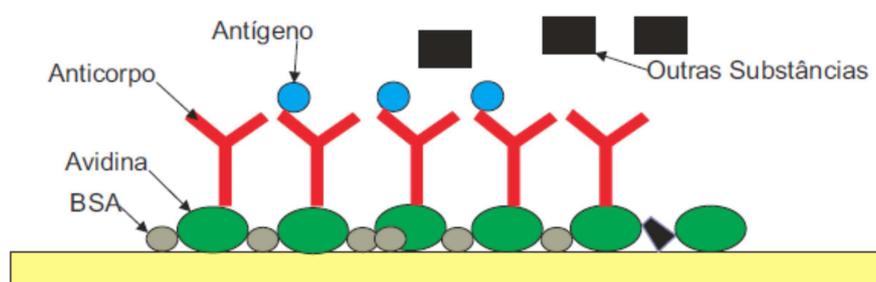


Figura 2.5: Camada biológica formada sobre a camada de ouro.

Sobre um filme metálico de ouro é depositado uma substância que se liga fortemente ao ouro, como a proteína Avidina. Uma substância bloqueante como a proteína BSA (Bovine Serum Albumin) é então colocada para preencher os espaços vazios e evitar que substâncias indesejadas se fixem à camada de ouro. Então anticorpo é fixado à Avidina. O anticorpo se liga somente ao antígeno específico, de forma que a solução que passa através da célula de fluxo entra em contato com a camada previamente preparada, apenas o antígeno que se deseja medir é agregado ao anticorpo e as demais substâncias são eliminadas. Dessa forma apenas a substância a ser analisada altera grandezas físicas ou químicas da camada dielétrica, que por sua vez são convertidas pelo transdutor físico-químico em um sinal elétrico (Filho, 2006).

Contudo, a fixação de cada uma dessas substâncias não ocorre de forma homogênea ou determinística, sendo necessário um monitoramento para determinar quando a camada está formada. Monitoramento este que é um dos desafios propostos pelo presente documento: estimar a espessura da camada dielétrica e usá-la como parâmetro para determinar quando

a camada dielétrica está formada, sendo possível a realização correta de medições.

### Refletividade

Qualquer direção de polarização da onda incidente é uma combinação linear de dois modos de polarização da luz, que são o modo transverso elétrico (TE) e transverso magnético (TM). Estes modos de polarização dão identificados pelo campo que vibra na direção perpendicular ao plano de incidência. No modo TE o campo elétrico é perpendicular ao plano de incidência e o campo magnético paralelo. No modo TM o campo magnético é perpendicular ao plano de incidência e o campo elétrico paralelo.

Apenas um campo elétrico com uma componente perpendicular à interface metal/dielétrico pode induzir o efeito SPR. Somente a luz TE polarizada tem essa componente perpendicular do campo elétrico. Assim a discussão neste tópico se restringirá à luz TE polarizada.

Qualquer interface entre dois meios tem coeficientes de reflexão  $r_p$  complexos para luz incidente p-polarizada descritos pelas equações de Fresnel (Schasfoort e Tudos, 2008)

$$r_p = \frac{E_i}{E_r} = |r_p|e^{j\phi} = \left| \frac{\tan(\alpha - \beta)}{\tan(\alpha + \beta)} \right| e^{j\phi} \quad (2.10)$$

Sendo  $E_i$  e  $E_r$  os campos elétricos incidente e refletido, respectivamente,  $\alpha$  o ângulo de incidência, e  $\beta$  o ângulo refletido, como representado na Figura 2.2,  $\phi$  é a mudança de fase que ocorre entre o campo incidente e o campo refletido. Fase esta que depende do índice de refração dos materiais envolvidos.

A refletância é definida como a taxa das intensidades refletidas e é calculada por:

$$R_p = |r_p|^2 \quad (2.11)$$

### O modelo multi-camada

O sistema de equações de Fresnel permite o cálculo dos coeficientes de reflexão e refração de uma onda óptica incidente, com ângulo de incidência conhecido, em um sistema com  $N$  camadas de diferentes materiais, ou seja,  $N - 1$  interfaces. E tem sido utilizado para analisar as características e a excitação óptica da ressonância de plasma de superfície (SPR) (Neff, Zong, Lima, Borre e Holzhueter, 2009).

É possível calcular os coeficientes de reflexão e refração através da aplicação repetida da equação de Fresnel (2.10). A relação a seguir modela um sistema com  $N$  camadas com

constante dielétrica  $\varepsilon_i$  e espessura  $d_i$ . As camadas 1 e  $N$  são o substrato (ou um prisma) e o meio externo (ex. água ou ar) respectivamente.

$$r_p = \frac{\left(M_{11} + M_{12} \frac{k_{y,N}}{\varepsilon_N}\right) \frac{k_{y,1}}{\varepsilon_1} - \left(M_{21} + M_{22} \frac{k_{y,N}}{\varepsilon_N}\right)}{\left(M_{11} + M_{12} \frac{k_{y,N}}{\varepsilon_N}\right) \frac{k_{y,1}}{\varepsilon_1} + \left(M_{21} + M_{22} \frac{k_{y,N}}{\varepsilon_N}\right)} \quad (2.12)$$

sendo  $\mathbf{M}$  a matriz de transferência:

$$\mathbf{M} = \mathbf{M}_2 \cdot \mathbf{M}_3 \cdot \dots \cdot \mathbf{M}_{N-1} \quad (2.13)$$

com

$$\mathbf{M}_i = \begin{bmatrix} \cos(k_{y,i} d_i) & \frac{-j\varepsilon_i}{k_{y,i}} \sin(k_{y,i} d_i) \\ \frac{-jk_{y,i}}{\varepsilon_i} \sin(k_{y,i} d_i) & \cos(k_{y,i} d_i) \end{bmatrix} \quad (2.14)$$

Com  $k_{y,i}$  expresso de análogo a (2.5)

$$k_{y,i} = n_1 \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\left(\frac{n_i^2}{n_1^2} - \sin^2 \alpha\right)} \quad (2.15)$$

O vetor de onda  $k_{y,i}$  depende do ângulo  $\alpha$  e do índice de refração  $n_i$ , a matriz transferência  $\mathbf{M}$  depende das espessuras  $d_i$ , portanto  $r_p$  é função de  $\alpha$ , de  $n_i$  e de  $d_i$ , com  $i = 1, 2, \dots, N$ .

A refletância para o caso multi-camada é calculada por (2.11), assim como o caso para uma única interface.

O sistema real não é tão simples quanto descrito acima. As simplificações realizadas implicam em limitações nas equações de Fresnel, como as degenerações descritas por de Bruijn (de Bruijn, Altenburg, Kooyman e Greve, 1991) e Phelps (Phelps e Taylor, 1996). Essas equações serão trabalhadas em busca de uma maior semelhança com o caso real, incluindo, por exemplo, o espalhamento espectral da luz de excitação do fenômeno. Contudo esta inclusão implica em mais uma simplificação ao considerar que os diferentes comprimentos de onda têm caráter aditivo no valor final. Essa simplificação possibilitou que valores de refletância fossem calculados para cada ângulo de incidência e cada comprimento de onda e para depois serem considerados em uma única curva de refletividade (2.16), como sugerido por (Meléndez, Carr, Bartholomew, Taneja, Yee, Jung e Furlong, 1997). A refletância ( $r_p(\theta, n_1(\lambda), n_2(\lambda), n_3(\lambda), d)$ ) é calculada para diferentes comprimentos de onda através das equações de Fresnel e a refletividade ( $R(\theta)$ ) resultante considerando uma sobreposição dos valores de refletância ponderados pela intensidade da luz naquele comprimento de onda.

$$R(\theta) = \frac{\int_{\lambda_I}^{\lambda_F} r(\theta, n_1(\lambda), n_2(\lambda), n_3(\lambda), d_3) \rho(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_I}^{\lambda_F} \rho(\lambda) d\lambda}, \quad (2.16)$$

sendo  $\lambda_I$  e  $\lambda_F$  os limites superior e inferior, respectivamente, dos comprimentos de onda considerados no espalhamento espectral da luz e  $\rho(\lambda)$  a curva intensidade versus  $\lambda$  da luz excitante do fenômeno SPR. Normalmente essa curva tem a forma de uma gaussiana. Mais uma vez é importante ressaltar que os índices de refração  $n_1(\lambda)$ ,  $n_2(\lambda)$  e  $n_3(\lambda)$  dependem do comprimento de onda da luz incidente. Pode-se considerar as dependências das constantes dielétricas  $\epsilon_1 = \epsilon_{1R} + j\epsilon_{1I}$  e  $\epsilon_2 = \epsilon_{2R} + j\epsilon_{2I}$  com o comprimento de onda  $\lambda$  descritas pelos polinômios de quarto grau (Oliveira, Moreira, Thirstrup, Melcher, Lima e Neff, 2013):

$$\begin{aligned} \epsilon_{1R}(\lambda) &= c_{4R}^1 \lambda^4 + c_{3R}^1 \lambda^3 + c_{2R}^1 \lambda^2 + c_{1R}^1 \lambda + c_{0R}^1, \\ \epsilon_{2R}(\lambda) &= c_{4R}^2 \lambda^4 + c_{3R}^2 \lambda^3 + c_{2R}^2 \lambda^2 + c_{1R}^2 \lambda + c_{0R}^2, \\ \epsilon_{2I}(\lambda) &= c_{4I}^2 \lambda^4 + c_{3I}^2 \lambda^3 + c_{2I}^2 \lambda^2 + c_{1I}^2 \lambda + c_{0I}^2, \end{aligned}$$

A constante dielétrica dependente do comprimento de onda  $\lambda$  é a raiz quadrada do índice de refração complexo num material não-magnético (material com permeabilidade próxima à unidade). Seja a constante dielétrica complexa  $\epsilon$  de parte real  $\epsilon_R$  e parte imaginária  $\epsilon_I$ :

$$\epsilon = \epsilon_R + j\epsilon_I = (\eta + j\kappa)^2,$$

a parte real do índice de refração  $\eta$  indica a velocidade e relação de velocidade no meio em questão com a velocidade no vácuo e a parte imaginária  $\kappa$  indica a perda por absorção durante a propagação da onda eletromagnética através do material.

A conversão entre índice de refração e constante dielétrica (Wooten, 1972) é dada por:

$$\begin{aligned} \epsilon_R &= \eta^2 - \kappa^2 & \epsilon_I &= 2\eta\kappa \\ \eta &= \sqrt{\frac{\sqrt{\epsilon_R^2 + \epsilon_I^2} + \epsilon_R}{2}} & \kappa &= \sqrt{\frac{\sqrt{\epsilon_R^2 + \epsilon_I^2} - \epsilon_R}{2}}. \end{aligned}$$

Por não haver absorção óptica  $\epsilon_{1I} = 0$ . Os coeficientes são determinados por interpolação numérica de um conjunto de dados experimentais. Para determinar a constante dielétrica do ouro a base de dados experimentais se baseia em (Johnson e Christy, 1972). O substrato foi considerado pouco sensível à variação do comprimento de onda e esta propriedade não foi considerada para a camada sensível.

## 2.2 Modos de interrogação

A excitação SPR pode ser monitorada de cinco formas diferentes (Moreira, 2009): angular, comprimento de onda, intensidade, fase e polarização. Cada uma implica diferentes dispositivos associados e uma operação do bio-sensor específica:

**Modo de interrogação angular** ou AIM (*Angular Interrogation Mode*): com fonte luminosa monocromática (comprimento de onda constante), um diodo laser normalmente, e um elemento foto-detector ou uma câmera CCD para detectar o sinal refletido na saída do dispositivo. É necessário apenas que varie o ângulo de incidência do feixe luminoso a fim de encontrar o ângulo no qual ocorreu menor reflexão da luz, o ângulo de ressonância. Essa informação basta para que calculemos o índice de refração do meio através de 2.9.

**Modo de interrogação de comprimento de onda** ou WIM (*Wavelength Interrogation Mode*): com fonte de entrada policromática (fonte halógena ou um diodo de luz branca, normalmente) e um espectrômetro para detectar o sinal refletido. O ângulo de incidência da luz é mantido constante, detectando o comprimento de onda no qual há menor reflexão. Esse valor influi no valor da permissividade do metal ( $\epsilon_2$ ), então o índice de refração do meio sensível pode ser calculado por:

$$n_3 = \sqrt{\sqrt{\epsilon_{3r}^2 + \epsilon_{3i}^2} + \epsilon_{3r}/2} \quad (2.17)$$

sendo:

$$\epsilon_3 = \frac{\epsilon_{2r}n_1^2(\text{sen } \theta)^2 + \epsilon_{2r} - n_1^2(\text{sen } \theta)^2 + \epsilon_{2i}n_1^2(\text{sen } \theta)^2}{(\epsilon_{2r} - n_1^2(\text{sen } \theta)^2)^2 + \epsilon_{2i}^2} - i \frac{\epsilon_{2i}n_1^4(\text{sen } \theta)^4}{(\epsilon_{2r} - n_1^2(\text{sen } \theta)^2)^2 + \epsilon_{2i}^2}$$

**Modulação de Intensidade** (*Intensity Modulation*): A intensidade luminosa após as interações com a onda de plasma de superfície é mensurada e analisada.

**Mensuração de Fase** (*Phase Change Measurement*): a interação da luz com a SPW altera sua fase, essa mudança de fase pode ser monitorada para identificação da substância.

**Mensuração de Polarização** (*Polarization Measurement*): A luz incidente é resultado de uma combinação particular de feixes de luz TM e TE polarizados. Após a interação com a SPW a polarização da luz é monitorada.

Os modos com maior precisão e por isso mais utilizados são o AIM e o WIM. Em ambos esses modos têm sua sensibilidade variando com o comprimento de onda da luz incidente. Para o modo de interrogação angular o bio-sensor SPR é mais sensível à variação da espessura e do índice de refração com um menor comprimento de onda da luz incidente. O contrário ocorre para a interrogação espectral, a sensibilidade aumenta com o aumento do comprimento de onda. (Homola, 1997; Kooyman, Kolkman, Gent e Greve, 1988; Yeatman, 1996).

## 2.3 Morfologia da curva SPR

A curva SPR tem a forma apresentada na Figura 2.6. Há reflexão máxima (tendendo a reflexão total) da luz quando o parâmetro monitorado, ângulo ( $\theta$ ) ou comprimento de onda ( $\lambda$ ) se distancia da condição de ressonância  $\theta_R$  ou  $\lambda_R$ . Próximo a esta condição há uma queda significativa no valor refletido, contudo no caso real o zero não é atingido como na teoria. A redução na intensidade refletida não é simétrica em relação à diferença do parâmetro monitorado para a ressonância:  $R(\theta_R + \Delta\theta) \neq R(\theta_R - \Delta\theta)$  ou  $R(\lambda_R + \Delta\lambda) \neq R(\lambda_R - \Delta\lambda)$ .

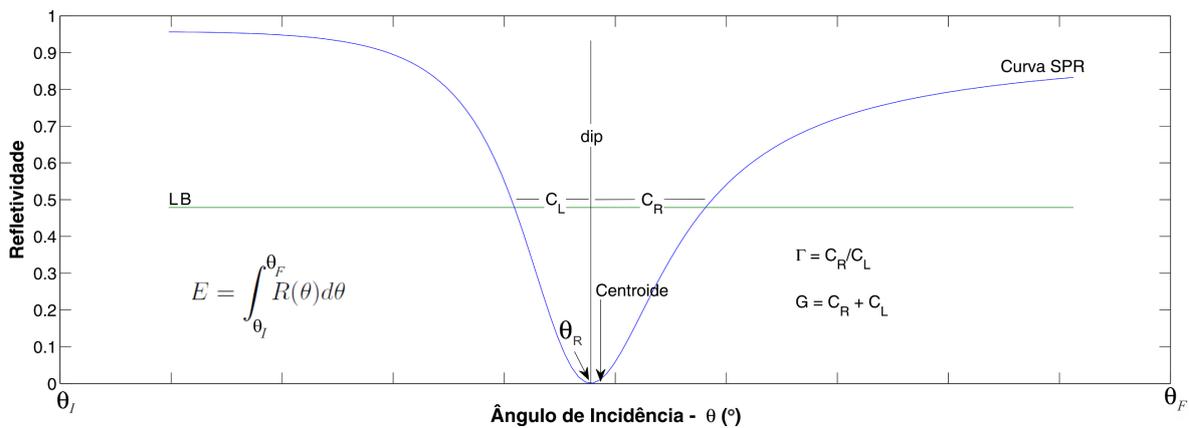


Figura 2.6: Curva característica do fenômeno SPR no modo AIM (simulação) e parâmetros relevantes: FWHM, Linha Base Dinâmica, Espessura, Assimetria, dip e valor de ressonância. A faixa de ângulos de incidência  $[\theta_I, \theta_F]$  depende da configuração utilizada: bio-chip, luz excitante, entre outros.

Diferentes grandezas podem ser extraídas da curva SPR e podem ser utilizadas para caracterizar a sua morfologia, ver Figura 2.6 para o modo AIM. A curva tem a mesma forma no modo WIM e os mesmos parâmetros morfológicos, apenas o eixo das abscissa que varia de  $[\lambda_I, \lambda_F]$ . Estas grandezas são:

**Energia da curva ( $E$ )**

A energia da curva é calculada pela integral

$$E = \int_{\theta_I}^{\theta_F} R(\theta)d\theta \text{ (AIM)} \quad \text{ou} \quad E = \int_{\lambda_I}^{\lambda_F} R(\lambda)d\lambda \text{ (WIM)}$$

**Profundidade da curva ( $dip$ )**

Mensura a diminuição da luz refletida na condição de ressonância em relação à condição de reflexão total da luz. Em condições ideais a reflexão na ressonância é nula, de forma que o  $dip$  é máximo, mas em condições reais esse valor é em torno de 0,4 a 0,6.

**Ângulo de ressonância ( $\theta_R$ ) - Modo AIM**

O ângulo no qual ocorre o mínimo da curva é o ângulo de ressonância  $\theta_R$ , esse valor nos permite calcular o índice de refração do meio sensível através de (2.9). Uma das técnicas mais utilizadas para encontrar o mínimo é o ajuste polinomial da curva. Essa técnica é utilizada porque não há garantia de que um ponto da curva que deseja-se analisar incide exatamente na região sensível de um fotodetector. Muito provavelmente isso não ocorre, podendo o mínimo, por exemplo, não ser medido por estar fisicamente situado entre dois detectores, ou apenas parcialmente detectado. Com uma técnica de regressão ou interpolação regiões da curva não medidas podem ser calculadas através das regiões conhecidas.

Uma técnica de regressão muito utilizada é o ajuste polinomial. Através da técnica de mínimos quadráticos é calculado o polinômio  $P(\theta)$  que melhor se ajusta à região da curva SPR na qual a refletividade  $R(\theta) < LB$ . Encontrado o polinômio  $P(\theta)$  seu mínimo é calculado através da primeira derivada e este é o ângulo de ressonância  $\theta_R$  da curva SPR tal que

$$\frac{d}{d\theta}P(\theta)_{\theta=\theta_R} = 0.$$

O ângulo de ressonância também pode ser considerado como sendo o centro geométrico ou centróide da curva (calculado pela técnica do Primeiro Momento). Com menor sensibilidade a ruído esse parâmetro difere do ângulo de valor de mínimo da curva SPR, mas seu desvio com variações do meio é similar ao desvio do mínimo. O algoritmo é aplicado a valores que estão abaixo de um limiar pré-estabelecido, conhecido como linha base (LB). Quando considera-se o sinal luminoso amostrado por uma câmera com resolução finita de

$N$  pixels de valor  $X(n)$  e ângulo médio  $\theta(n)$  ( $n = 1, \dots, N$ ), então o valor do centróide é calculado considerando-se apenas os pontos que estão abaixo da linha base:

$$\theta_R = \frac{\sum_{n=1}^N \theta(n) [LB - \min(X(n), LB)]}{\sum_{n=1}^N [LB - \min(X(n), LB)]},$$

Para o modo WIM esse parâmetro é o comprimento de onda em que o mínimo ocorre ( $\lambda_R$ ).

### Linha base ( $LB$ )

Valor limite para descartar parte da curva, assume-se que os pixels com valores abaixo dessa linha base são menos significativos.

Para calcular a Linha Base os dois métodos mais utilizados são o ponto médio entre o máximo e o mínimo da curva (FWHM - *full width at half maximum*) ou a linha base dinâmica, este método consiste em encontrar  $P_B$  tal que a razão entre as áreas da curva abaixo de  $P_B$  e acima de  $P_B$  no intervalo  $\Delta\theta$  definido seja constante  $\gamma$ , ou seja:

$$\gamma A_0 = \gamma \int_{\theta_0}^{\theta_1} (LB - P(\theta)) d\theta = A_1 = \int_{\theta_1}^{\theta_2} (LB - P(\theta)) d\theta \quad (2.18)$$

sendo  $P(\theta)$  a curva SPR,  $P_B$  o valor da linha base dinâmica,  $\theta_1$  e  $\theta_2$  tais que  $P(\theta_1) = P(\theta_2) = P_B$  e  $\theta_0 = \theta_1 - \Delta\theta$ , ver Figura 2.7.  $\Delta\theta$  e  $\gamma$  são escolhidos.

O método da linha base dinâmica (Thirstrup e Zong, 2005), apesar de mais complexo adiciona uma robustez a ruído que o FWHM não tem.

### Largura da curva ( $\Gamma$ )

A distância entre os dois pontos que cruzam a linha de FWHM é definida como largura da curva  $\Gamma$ . Também são calculadas as distâncias na horizontal entre o ângulo do valor de mínimo  $\theta_R$  e os ângulos nos quais a curva cruza a linha de FWHM à esquerda  $\theta_{FWHM}^L$  e à direita  $\theta_{FWHM}^R$  do mínimo.

$$C_L = \theta_R - \theta_{FWHM}^L$$

$$C_R = \theta_{FWHM}^R - \theta_R$$

$$\Gamma = C_R + C_L$$

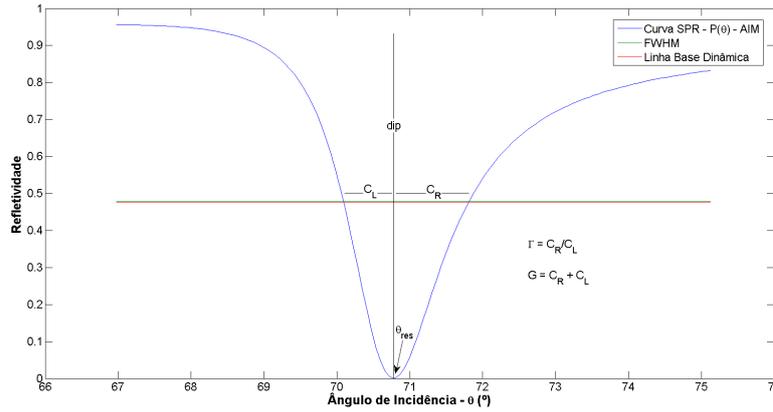


Figura 2.7: Curva característica do fenômeno SPR no modo AIM (simulação) e parâmetros relevantes: FWHM, LBD, Espessura, Assimetria, dip e valor de ressonância.

### Assimetria da curva ( $G$ )

A forma da curva também é estudada pela sua assimetria:

$$G = C_R/C_L$$

A influência de variações do meio sensível na morfologia da curva ( $\Gamma$  e  $G$ ) é estudada em (Filho, 2006; Filho, Lima, Moreira, Thirstrup e Neff, 2010).

Uma análise do comportamento desses parâmetros em função da espessura e o índice de refração da camada sensível é apresentada no capítulo 3.

## 2.4 Sensorgrama

O sensorgrama é a apresentação da grandeza sensoriada em um gráfico versus o tempo. No caso do sistema SPR essa grandeza é a posição do mínimo da curva.

No sensorgrama da Figura 2.8b nenhuma variação no mínimo da curva ocorre até o instante  $t_1$ , quando outra substância é aplicada no bio-sensor e o processo de adesão das moléculas no ouro é iniciado, variando o índice de refração, conseqüentemente ângulo de ocorrência do mínimo até o instante  $t_2$ .

Um artifício para construção do sensorgrama consiste em rotacionar a curva SPR  $90^\circ$  no sentido anti-horário (Figura 2.8a), isso forma diretamente um ponto do sensorgrama (Figura 2.8b), a variação é linear com a massa acumulada na adesão. Na figura a curva de refletividade  $R(t_1)$  do instante  $t_1$  varia até a curva  $R(t_2)$ , gerando o sensorgrama da esquerda (Schasfoort e Tudos, 2008).

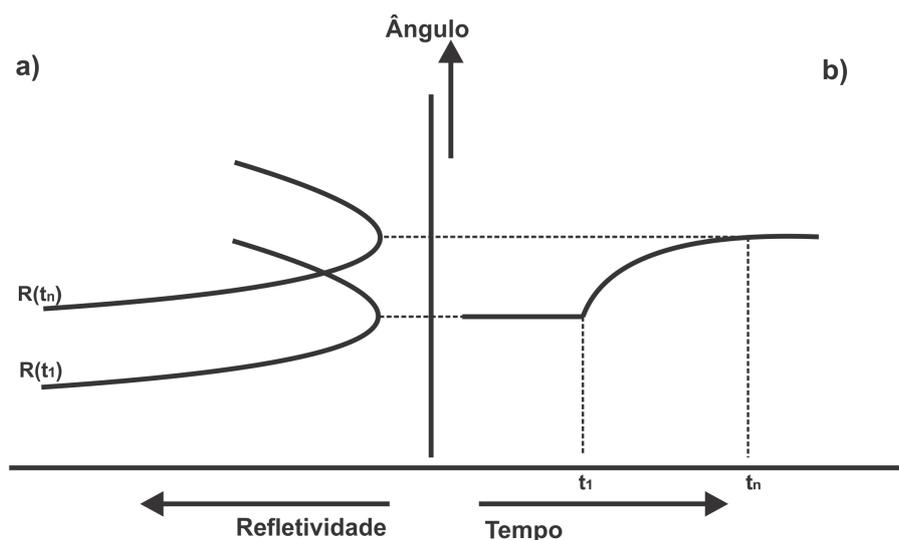


Figura 2.8: Representação da variação do ângulo de ocorrência do mínimo (ângulo de ressonância) em um sensorgrama (a) Curvas SPR (Refletividade X ângulo) rotacionada  $90^\circ$  no sentido anti-horário; (b) Sensorgrama teórico.

Contudo o sensorgrama é dado em índice de refração versus tempo, de modo que o valor de ângulo ainda deve ser convertido para índice de refração.

Vale ressaltar que como parte do pré-processamento de formação da curva SPR experimental toda curva resposta do bio-sensor SPR deve ser dividida ponto-a-ponto pela curva de referência para a célula seca do mesmo sensor. Por esta razão o índice de refração mensurado é um índice relativo, medido em fração de índice de refração ou *unidade de índice de refração* - RIU (*Refractive Index Unit*).

## 2.5 Estado da arte

Caracterizar a camada dielétrica quanto ao seu índice de refração e sua espessura tem sido um importante assunto de pesquisa nos últimos anos, de forma que algumas técnicas de fazê-lo já foram apresentadas, porém todas em dois ou mais passos de medição. Algumas delas serão apresentadas aqui.

### 2.5.1 Técnicas de ajuste de dados

Algoritmos de ajustes de dados são utilizados para ajustar os parâmetros ópticos da camada sensível até que a curva SPR experimental esteja o mais próximo possível à curva SPR teórica obtida com as equações de Fresnel.

- Segundo Phelps e Taylor (Phelps e Taylor, 1996) as equações de Fresnel são um bom modelo do sistema SPR se a camada dielétrica (transdutora) for de uma espessura menor que 2nm , sendo possível determinar a permissividade relativa e a espessura da camada através de métodos de minimização por mínimos quadrados (Levenberg-Marquardt, por exemplo). Para isso é necessária uma precisão de 12-bits e um nível de ruído menor que 0,5%.

## 2.5.2 Método de interrogação angular

Utilizando a interrogação angular (AIM) é possível determinar o índice de refração do analito através da variação de um dos parâmetros fixos do sistema: o índice de refração da solução na qual os experimentos ocorrem (uso de dois solventes diferentes); o comprimento de onda da fonte luminosa; ou a espessura do metal.

Uma infinidade de combinações de valores de espessura e índice de refração podem gerar a mesma variação na curva SPR, para determinar a combinação única que caracteriza a camada de transdutora as seguintes propostas foram sugeridas:

- Utilizar diferentes soluções como solvente (camada 4, ver Figura 2.4), cada um com uma constante dielétrica específica e conhecida, cada solvente implica em um conjunto de soluções possíveis para os valores de espessura  $d_3$  e índice de refração  $n_3$ , mas a intersecção dos conjuntos solução permite determinar uma resposta única para o problema (de Bruijn, Altenburg, Kooyman e Greve, 1991).

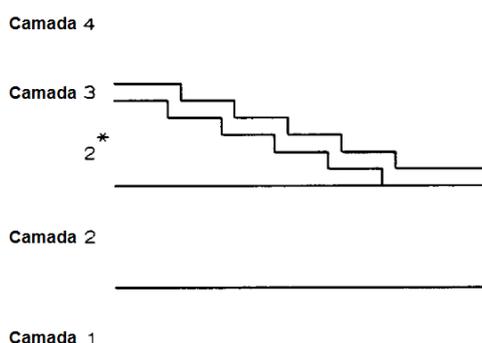


Figura 2.9: Modelo de camadas com o adicional 2\* ao filme metálico com espessura variante, variando  $\epsilon_2$ .

- de Bruijn (de Bruijn, Altenburg, Kooyman e Greve, 1991) ainda sugere variar a espessura da camada metálica (camada 2), ver Figura 2.9, para obtenção de diferentes curvas SPR que possibilitam a caracterização da camada sensível ao serem cruzadas.

- Feixes luminosos de diferentes comprimentos de onda também podem ser utilizados para excitar o fenômeno SPR, de modo a obter respostas diferentes no modo AIM para a mesma configuração das camadas, havendo apenas uma possível combinação dos parâmetros de interesse (Peterlinza e Georgiadis, 1996) e (Zhang e Wang, 2009).

### 2.5.3 Método de interrogação espectral

No modo de interrogação espectral (WIM) os parâmetros de interesse podem ser determinados alternando o ângulo de incidência do feixe luminoso entre dois valores conhecidos.

- Com uma idéia análoga à variação do comprimento de onda da luz incidente no modo AIM esse método consiste na variação do ângulo de incidência no modo WIM (Johnston, Karlsen, Jung e Yee, 1995).

### 2.5.4 Estimação de parâmetros

Assumindo algumas condições e através dos métodos corretos de análise é possível mensurar múltiplos parâmetros independentes em troca de uma perda na relação sinal-ruído.

- Chinowsky, Jung e Yee encontraram uma técnica de análise linear que permite determinar a espessura da camada sensível com uma razão sinal-ruído ótima (teoricamente). Outros parâmetros de interesse independentes, como o índice de refração também podem ser determinados ao custo de uma redução na relação sinal ruído (Chinowsky, Jung e Yee, 1999).

Essas técnicas ainda não concluíram o assunto, cada uma requer um nível de liberdade nos bio-sensores que nem sempre existe, como a variação de parâmetros determinados na construção do equipamento. Uma abordagem mais generalista precisa ser estudada.

### 2.5.5 Parâmetros morfológicos

O ângulo de ressonância não é o único parâmetro da curva SPR relacionado com as características das camadas do bio-sensor. Assimetria, centróide (Piliarik e Homola, 2009) e largura da curva são outras características da curva que variam, portanto uma análise dessas grandezas possibilita a caracterização da camada sensível. A forma da curva SPR é um promissor objeto de estudo sobre o fenômeno da ressonância de plasma de superfície, dada

sua relativa simplicidade (Zhan, Xiaoping Wang e Liu, 2011). Ainda possibilitam estudos sobre a temperatura do bio-sensor (Filho, Lima, Moreira, Thirstrup e Neff, 2010).

O problema já foi estudado em diversas áreas como o algoritmo para determinar a distribuição do campo eletromagnético na estrutura multi-camada proposto por Shalabney e Abdulhalim (Shalabney e Abdulhalim, 2010). A proposta aqui é estudar o mesmo problema na área de controle e estimação de parâmetros.

## 2.6 Considerações sobre o Estado da Arte

A caracterização detalhada da camada sensível do bio-sensor SPR depende da determinação de grandezas de difícil determinação e independentes. Muitas propostas foram feitas com técnicas para essa caracterização, contudo tais técnicas possuem limitações de incerteza e aplicação.

Técnicas que requerem dois ângulos de incidência do feixe luminoso, por exemplo, ou feixes de diferentes comprimentos de onda esbarram em limitações experimentais. Em alguns casos o ângulo de incidência da luz é fixo ou o feixe luminoso possui apenas um comprimento de onda, não havendo liberdade de variação dessas grandezas no experimento.

Algumas técnicas de ajuste de curvas se aplicam melhor para curvas SPR simétricas e estreitas (Chyou, Chu, Chien, Lin, Yeh, Hsu e Chen, 2006), características nem sempre presentes nessas curvas.

Chinowsky e Yee (Chinowsky e Yee, 1998) avaliaram a capacidade de elaboradas técnicas propostas para a caracterização da camada sensível, concluindo que estas possuem um nível de incerteza muito dependente da dispersão da camada e do solvente ao redor, a utilização de feixes luminosos de diferentes frequências (Peterlinza e Georgiadis, 1996) é uma destas técnicas. Eles também propuseram outra técnica, mas suas limitações foram evidenciadas por Chyou *at al.* (Chyou, Chu, Chien, Lin, Yeh, Hsu e Chen, 2006), sendo a principal delas a limitação na presença de ruído colorido ou ruído branco com elevada variância.

A alta sensibilidade do fenômeno SPR, evidenciada em vários estudos (Homola, 1997; Kooyman, Kolkman, Gent e Greve, 1988; Yeatman, 1996; Shalabney e Abdulhalim, 2010; Koyo e Watanabe, 2012; Homola, Koudela e Yee, 1999), acentua as limitações das técnicas apresentadas. A sensibilidade também torna necessária uma precisa caracterização do analito, o que permanece com um desafio para os pesquisadores. Desafio este que será trabalhado

sobre uma abordagem de controle e identificação de sistemas.

## 2.7 Redes Neurais

A ciência se desenvolveu e ainda desenvolve observando a natureza. Desta vez o elemento observado e estudado foi o neurônio humano, que será intitulado neste trabalho como *neurônio natural*

Neurônios naturais recebem o sinal através de estímulos nervosos de outros neurônios (sinapses) recebidas pelos dendritos da célula, ver Figura 2.11a. Quando o sinal recebido é suficiente para *ativar* o neurônio este emite um sinal através do axônio, este, através de uma nova sinapse repassa o sinal para o próximo neurônio outra célula que será estimulada. A “capacidade de processamento” do neurônio reside na decisão de ser ativado ou não.

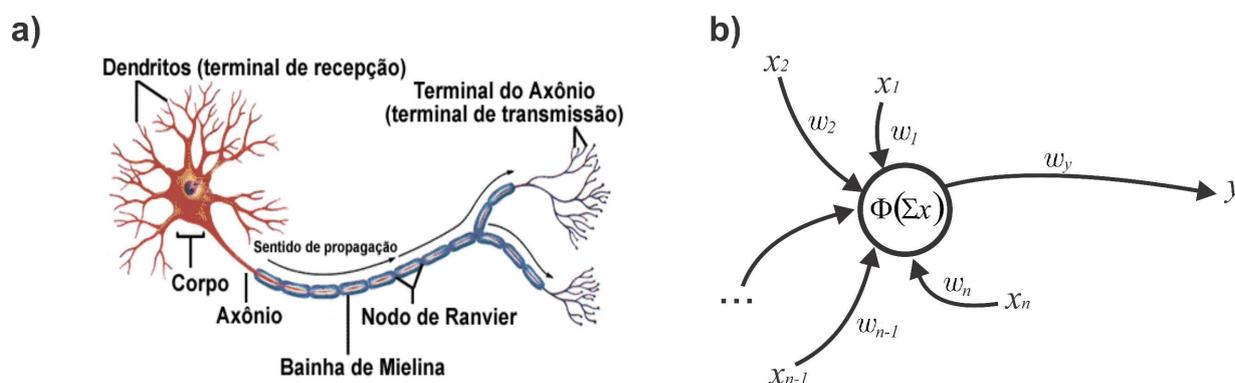


Figura 2.10: Esquema do neurônio natural (a) e neurônio artificial (b).

Apesar da alta complexidade do neurônio natural ele é modelado em um neurônio artificial (ver Figura 2.11b) considerando apenas os sinais (sinapses) de entrada  $x_i$  que são ponderadas por pesos  $w_i$  previamente calculados (nível de energia do sinal), uma função de ativação  $\Phi(\cdot)$  que “decide” se o neurônio será ativado ou não. A ativação consiste em gerar um valor de saída em uma faixa definida. Se o neurônio for ativado um valor de saída é ponderado por  $w_y$  produzindo uma nova sinapse de saída  $y$ . É comum o peso da variável de saída ser uma função unitária.

Uma rede neural artificial combina neurônios artificiais para processar a informação. A função de ativação  $\Phi(\cdot)$  de cada neurônio é previamente definida de acordo com o comportamento dos dados a serem tratados, podendo, por exemplo, ser uma função linear ou uma função sigmóide. A rede pode combinar neurônios com diferentes funções de ativação. Os pesos de entrada e saída dos neurônios devem ser calculados para obter a saída desejada para

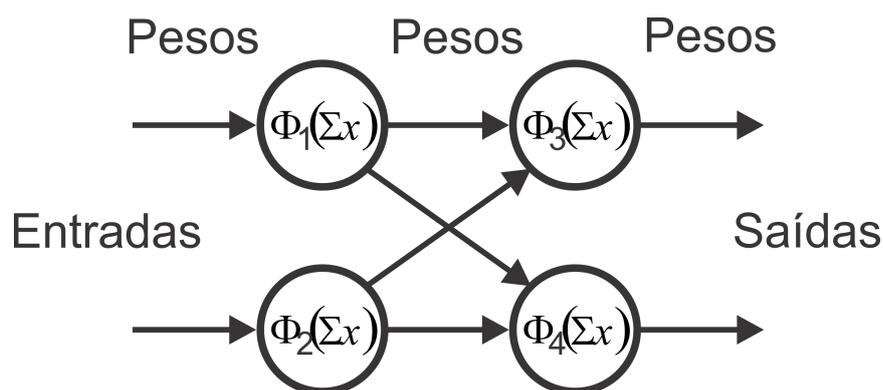


Figura 2.11: Rede Neural Artificial simples, com apenas duas variáveis de entrada, duas de saída e sem neurônios intermediários (camada oculta).

uma entrada específica. Quanto maior o valor absoluto de um peso do neurônio artificial maior será a influência da entrada que este pondera. Os pesos podem ser negativos.

O cálculo dos pesos é nomeado como *aprendizado* ou *treinamento* da rede.

### 2.7.1 Treinamento

Para treinar a rede é necessário um conjunto de dados de entrada e saída e a definição de uma função erro, um erro comum é:

$$E(k) = \frac{1}{2} \sum^S (y_T(k) - y_R(k))^2, \quad (2.19)$$

sendo  $k$  o número da amostra cujo erro está sendo calculado, portanto  $E(k)$  o erro da amostra  $k$  e  $S$  o número de saídas da rede,  $y_T$  a saída da rede em treinamento e  $y_R$  o dado de saída do conjunto de treinamento.

O treinamento pode ser em batelada ou online.

#### O treinamento em batelada

O treinamento em batelada utiliza todos os dados de treinamento em cada iteração de treinamento, calculando o erro de todas as amostras:

$$E_b = \sum E(k) \quad (2.20)$$

Um exemplo de algoritmo de treinamento em batelada é o gradiente descendente. Neste método o gradiente é calculado:

$$G = \frac{\partial E}{\partial w_{io}} = \frac{\partial E}{\partial y_{To}} \frac{\partial y_{To}}{\partial w_{io}}$$

sendo  $i$  o índice do neurônio de entrada que o peso multiplica e  $o$  o índice do neurônio de saída relacionado, para  $A$  o número de amostras de treinamento, tem-se:

$$\frac{\partial E}{\partial y_{To}} = \sum_{k=0}^A (y_{To}(k) - y_{Ro}(k))$$

$$\frac{\partial y_{To}}{\partial w_{io}} = \frac{\partial}{\partial w_{io}} = \sum w_{io} x_i = x_i$$

Logo,

$$\frac{\partial E}{\partial w_{io}} = x_i \sum_{k=0}^A (y_{To}(k) - y_{Ro}(k))$$

O algoritmo consiste em:

1. Inicializar todos os pesos em valores aleatórios e pequenos.
2. Para cada peso ajustar  $\Delta w_{io} = 0$ ;
3. Calcular os valores de saída da rede  $y_{To}$ ;
4. Calcular  $\Delta w_{io} = \Delta w_{io} + x_i \sum_{k=0}^A (y_{To}(k) - y_{Ro}(k))$
5. Ajustar o peso:  $w_{io} = w_{io} + \mu \Delta w_{io}$ ;
6. Se  $\Delta w_{io}$  for suficientemente pequeno ou zero: parar, se não voltar ao passo 2.

### O treinamento online

No método de treinamento online os pesos são atualizados após analisada cada amostra. O gradiente para cada ponto pode ser considerado uma aproximação ruidosa do gradiente geral, e os pesos são ajustados amostra a amostra.

O algoritmo online tem como vantagens:

- Geralmente é mais rápido, especialmente quando há amostras similares;
- Pode ser aplicado quando o conjunto de treinamento não é fixo, novos dados são adquiridos ao longo do experimento;
- É melhor aplicado para casos não-estacionários (quando o melhor modelo varia gradualmente com tempo).

Um conhecido algoritmo de treinamento é o algoritmo *backpropagation*, esse algoritmo só pode ser utilizado quando os neurônios puderem ser ordenados em camadas e seus sinais são enviados para a camada mais externa isto é: “forward” enquanto o erro se propaga para a camada mais interna: “backward”.

O treino começa com pesos aleatórios e tem o objetivo de ajustá-los de forma a minimizar o erro (2.19).

O algoritmo consiste em:

1. Inicializar todos os pesos  $w$  em valores aleatórios;
2. Aplicar a rede calculando todos os valores da camada escondida  $y^e$  e da camada de saída  $y^s$ ;
3. Para cada neurônio da camada de saída calcular o erro com base no valor dos dados de treinamento  $y^R$ :

$$\delta_k = y_k^s(1 - y_k^s)(y_k^s - y_k^R)$$

4. Para cada neurônio de saída calcular o erro:

$$\delta_j = y_j^e(1 - y_j^e) \sum_{k=1}^S \delta_k w_{jk}$$

sendo  $w_{jk}$  os pesos da camada escondida para a camada de saída e  $S$  o número de neurônios da camada de saída.

5. Calcular, para a camada de saída:  $\Delta_{jk} = -\mu \delta_k y_j$ ;
6. Calcular, para a camada de oculta:  $\Delta_{ij} = -\mu \delta_j x_i$ ;
7. Atualizar  $w = w + \Delta w$ .

Os erros  $\delta_k$  e  $\delta_j$  são calculados aplicando a regra da cadeia ao gradiente do erro com cada peso, análogo ao algoritmo do gradiente descendente. A dedução é trabalhosa e não faz parte do escopo deste trabalho.

Para maiores informações sobre redes neurais, sugere-se uma consulta ao (Haykin, 2001).

## 2.7.2 Avaliação

A aleatoriedade na inicialização dos pesos implica em uma infinidade de possíveis resultados da etapa de treinamento. Em uma rede com cinco neurônios na camada de entrada, 10 na camada oculta e 2 na camada de saída, por exemplo, pode ter aproximadamente cem pesos a serem calculados na etapa de treinamento, e a inicialização envolve uma aleatoriedade em cada um destes cem pesos, o que implica em incontáveis possibilidades para esses pesos após a finalização do treinamento.

Para avaliar se uma determinada rede obteve valores próximos ao esperado "por sorte" um método baseado no experimento de Monte Carlo foi adotado. O método de Monte Carlo

consiste em calcular um valor determinístico a partir de um número finito de experimentos aleatórios.

Por exemplo: Dada uma região quadrada de lateral 2, um círculo de raio unitário é inscrito. Um ponto aleatoriamente gerado no interior do quadrado tem probabilidade de pertencer ao círculo proporcional à razão das áreas das figuras. Para um quadrado de lado 2, tem-se área  $A_q = 4$ . Para o círculo de raio unitário tem-se área  $A_c = \pi 1^2 = \pi$ . O experimento de Monte Carlo consiste em gerar um número grande de pontos aleatoriamente e calcular a razão dos pontos pertencentes ao interior do círculo  $P_c$  e o total de pontos  $P_q$ . Assim, o valor de  $\pi$  pode ser calculado por

$$\frac{P_c}{P_q} = \frac{A_c}{A_q} = \frac{\pi}{4} \Rightarrow \pi = 4 \frac{P_c}{P_q}$$

. Em aproximadamente 20% dos casos trinta mil pontos gerados aleatoriamente são suficientes para calcular o valor de  $\pi$  com 0,07% de precisão.

Para determinar quando "um número grande de pontos" foi alcançado calcula-se a razão  $P_c/P_q$  até que sua variação com a adição de pontos seja reduzida. Contudo esse método é sujeito a erros já que sempre há a possibilidade de o menos provável ocorrer, ou seja, no caso do cálculo do valor de  $\pi$ : haver uma maior ocorrência de pontos no interior do círculo que o esperado.

De forma análoga, a avaliação da rede neural consistirá em repetir o treinamento e aplicar a rede um conjunto de dados diferente do conjunto de treinamento, os dados de validação, até que o erro resultante de um treinamento varie menos que  $10^{-2}$  do valor de erro médio. A grande quantidade de pesos calculados implica em probabilidade quase nula de resultado tendencioso.

Para maiores referências sobre o método de Monte Carlo consultar (Kroese, Taimre e Botev, 2011).

# 3

## Modelo Matemático e Estudo de Sensibilidade

### 3.1 Introdução

As equações de Fresnel são o melhor modelo para estudar o fenômeno SPR. Apesar de serem uma simplificação clássica de um fenômeno quântico os resultados das equações de Fresnel podem ser utilizados para uma análise teórica do fenômeno. Neste capítulo estão apresentados os resultados de algumas simulações e análises baseadas nesse modelo, bem como algumas de suas limitações e ajustes para uma maior semelhança com o dado experimental.

### 3.2 O modelo de simulação - limitação e melhoria

Uma simulação precisa depende da precisão dos dados do bio-sensor. Para o modelo de Fresnel esses dados são: o comprimento de onda da luz excitante ( $\lambda$ ), e os índices de refração e espessuras das camadas do modelo, no caso quatro camadas: o substrato ( $n_1, d_1$ ), o filme de ouro ( $n_2, d_2$ ), a camada sensível ( $n_3, d_3$ ) e o meio externo ( $n_4, d_4$ ).

Desses dados as espessuras do substrato e do meio externo ( $d_1$  e  $d_4$ ) são consideradas infinitas por serem muito maior que as demais. A literatura tem informações sobre o comprimento de onda  $\lambda = 830nm$  da luz incidente, sobre o índice de refração  $n_3$  (Johnson e Christy, 1972) e a espessura do ouro  $d_3 = 50nm$ . Como meio externo utilizamos a água  $n_4 = 1,33RIU$ . As informações da camada sensível ( $n_3, d_3$ ), variam de acordo com o experimento, é o que deseja-se determinar.

Para adquirir informações sobre o meio substrato ( $n_1$ ) foi necessário realizar um experimento simples de óptica em um SPREETA com parte de sua carcaça removida. O experimento consiste na incidência de um feixe luminoso no meio substrato do SPREETA em um ângulo conhecido ( $\theta_{in}$ ). O feixe incidente na superfície do substrato é refratado, atravessa o substrato e é outra vez refratado ao sair do substrato. Conhecendo o ponto de saída e de entrada do feixe no substrato, pode-se calcular o ângulo do feixe refratado no substrato ( $\theta_r$ ). A lei de Snell-Descartes relaciona os dois ângulos pelos índices de refração de seus meios:

$$n_1 \sen \theta_i = n_2 \sen \theta_r \quad (3.1)$$

Considerando o ar com índice de refração ideal  $n_1 = 1RIU$  e medido  $\theta_{in} = 22,1^\circ$  e calculado  $\theta_r = 14,6^\circ$ , obtemos  $n_2 = 1,4826RIU$ .

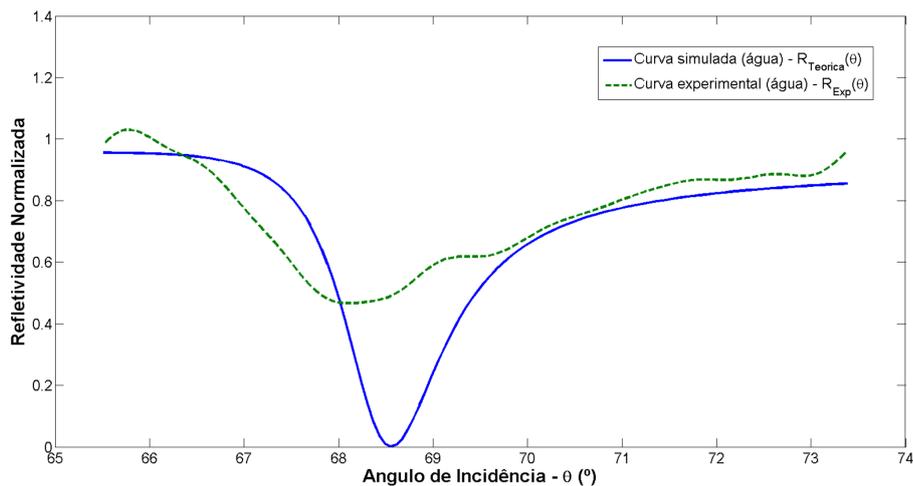


Figura 3.1: Curva SPR simulada para a água (azul) e Curva SPR adquirida experimentalmente para água (verde)

Com esses dados a curva SPR obtida através de simulação não condiz com o caso simulado. Na Figura 3.1 está apresentada uma curva experimental adquirida para água deionizada e dessalinizada e a curva teórica considerando a camada sensível como água ( $n_3 = 1.33$ ), para este caso a espessura  $d_3$  não é importante, pois temos as camadas sensível e externa iguais. Contudo a curva simulada ainda difere muito da curva experimental, sendo insuficiente para descrever a resposta adquirida com o SPREETA, isso se comprova ao analisarmos os parâmetros morfológicos da curva apresentados Tabela 3.1. A técnica de ajuste polinomial, neste

Tabela 3.1: Parâmetros das curvas SPR experimental e simulada para um amostra de água, ver Figura 3.1

Parâmetro	Método	Curva Experimental		Curva Teórica	
		$LB_{FWHM}$	$LB_{Dinamica}$	$LB_{FWHM}$	$LB_{Dinamica}$
Ângulo de Ressonância ( $\theta_{res}$ )	Mínimo Bruto	68,1233°		68,5505°	
	Centróide	68,5139°	68,2570°	68,6308°	68,6315°
	Mínimo de $P(\theta)$	68,5132°	68,2747°	68,6370°	68,6413°
Profundidade ( $dip$ )	Mínimo Bruto	0,5634		0,9552	
	Centróide	0,5480	0,5613	0,9498	0,9498
	Mínimo de $P(\theta)$	0,5156	0,5400	0,9066	0,9084
Linha Base		0,7484	0,6244	0,4780	0,4806
Largura ( $\Gamma$ )		2,9803°	2,1425°	1,4123°	1,4123°
Assimetria ( $G$ )	Mínimo Bruto	2,2996	2,2216	1,5741	1,5741
	Centróide	1,3889	1,6824	1,2453	1,2429
	Mínimo de $P(\theta)$	1,3901	1,6244	1,2234	1,2084

trabalho foi calculada com polinômio de grau dois, um grau mais elevado, neste caso, não representou melhor ajuste.

Uma análise da luz emitida pelo diodo laser do equipamento SPREETA foi necessária para encontrar a limitação da simulação. A luz excitante do fenômeno além de estar um pouco deslocada na frequência possui um espalhamento espectral bastante significativo. A grande quantidade de reflexões e refrações que o feixe luminoso sofre, apesar de contemplados na matriz de transferência utilizada no modelo (2.14), ampliam a influência dos feixes não considerados no modelo. Utilizando o espectrômetro USB4000 da *Ocean Optics* (detector TCD1304AP com leitura comprimento de onda de 200 a 1100 nm com sensibilidade de 60 fótons/count em 600nm e tempo de integração de 3,8ms a 10s) foi possível medir a luz emitida pelo LED do SPREETA, ver Figura 3.2

Considerar, através de 2.16, o espalhamento espectral da luz apresentado an Figura 3.2 implica em uma perda de sensibilidade da curva, como apresentado nas curvas da Figura 3.3. Entretanto a proximidade da curva simulada com espalhamento espectral da luz e a curva obtida experimentalmente revela que todos os comprimentos de onda da luz incidente devem ser considerados, ver Figura 3.4. Embora ainda diferente da resposta obtida com o SPREETA, ajustes de calibração considerando imperfeições de captação da luz por parte do arranjo de fotodiodos (atenuação e relação pixel-ângulo) foram realizados para aproximar os resultados. A curva simulada foi normalizada pelo seu valor máximo em seguida deslocada para a posição que mais se aproxima da curva experimental, ver Figura 3.4.

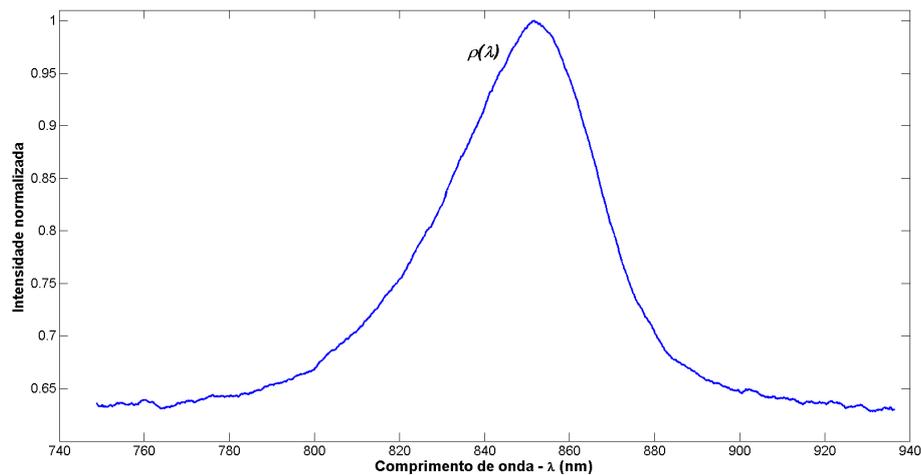


Figura 3.2: Intensidade luminosa do LED medida com espectrômetro USB4000 da Ocean Optics

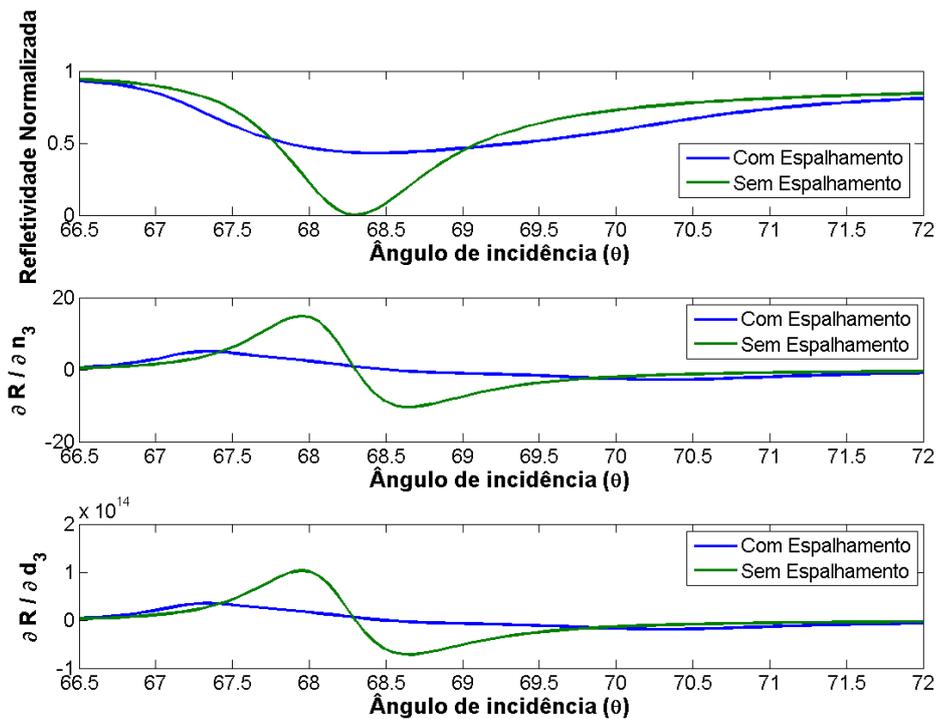


Figura 3.3: Comparação das curvas simuladas considerando o espalhamento espectral da luz e sem considerar, bem como a variação da sensibilidade à variação dos parâmetros.

Para comparar as curvas experimental e simulada seus parâmetros morfológicos são apresentados na Tabela 3.2. Ao considerar a influência de todos os comprimentos de onda da luz todos os parâmetros morfológicos da curva teórica estão mais próximos da curva experimental, principalmente os valores de profundidade e linha base, em especial para o

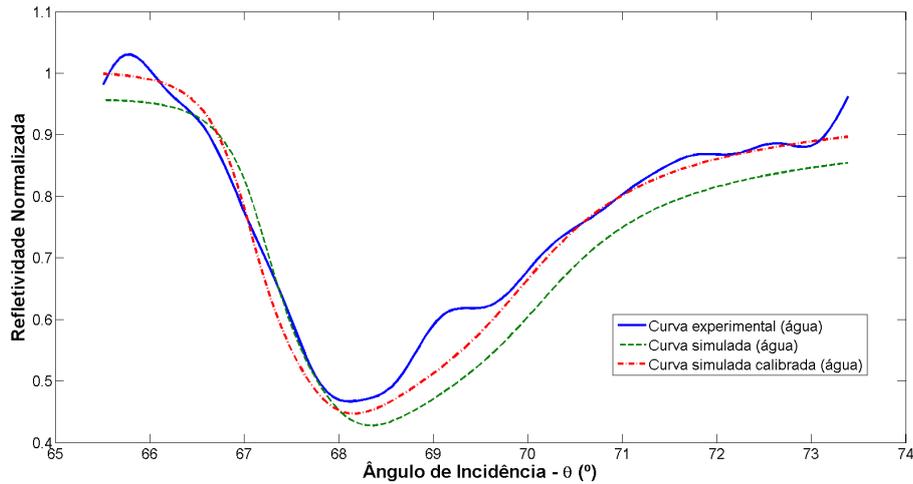


Figura 3.4: Curva SPR simulada para a água considerando o espalhamento espectral da luz excitante (azul) e Curva SPR adquirida experimentalmente para água (verde)

Tabela 3.2: Parâmetros das curvas SPR experimental e simulada considerando espalhamento espectral da luz para um amostra de água, ver Figura 3.4

Parâmetro	Método	Curva Experimental		Curva Teórica	
		$LB_{FWHM}$	$LB_{Dinamica}$	$LB_{FWHM}$	$LB_{Dinamica}$
Ângulo de Ressonância ( $\theta_{res}$ )	Mínimo Bruto	68,1233°		68,3670°	
	Centróide	68,5139°	68,2570°	68,6936°	68,6101°
	Mínimo de $P(\theta)$	68,5132°	68,2747°	68,6711°	68,6020°
Profundidade ( $dip$ )	Mínimo Bruto	0,5634		0,5287	
	Centróide	0,5480	0,5613	0,5145	0,5188
	Mínimo de $P(\theta)$	0,5156	0,5400	0,5098	0,5170
Linha Base		0,7484	0,6244	0,6920	0,6204
Largura ( $\Gamma$ )		2,9803°	2,1425°	3,2644°	2,7031°
Assimetria ( $G$ )	Mínimo Bruto	2,2996	2,2216	1,9981	1,7901
	Centróide	1,3889	1,6824	1,3063	1,2305
	Mínimo de $P(\theta)$	1,3901	1,6244	1,3436	1,2455

método da linha base dinâmica. Já os valores de largura e assimetria tiveram variação mais significativa para o método de linha de base FWHM.

Por ser mais próximo da resposta experimental esse modelo será utilizado nas próximas seções para análise da influência de variações na camada sensível: índice de refração e espessura.

### 3.3 Sensibilidade dos parâmetros morfológicos ao índice de refração da camada sensível

A curva SPR foi simulada variando o índice de refração da camada sensível e mantendo constante as demais grandezas que influenciam na resposta, ver Figura 3.5. Uma análise desses resultados, pode contribuir para analisar o comportamento dos parâmetros morfológicos da curva com a variação da grandeza de interesse, estudo análogo ao realizado por (Filho, 2006; Filho, Lima, Moreira, Thirstrup e Neff, 2010). A variação dos parâmetros calculados nas Tabelas 3.1 e 3.2 são calculadas e apresentadas graficamente em função de  $n_3$ .

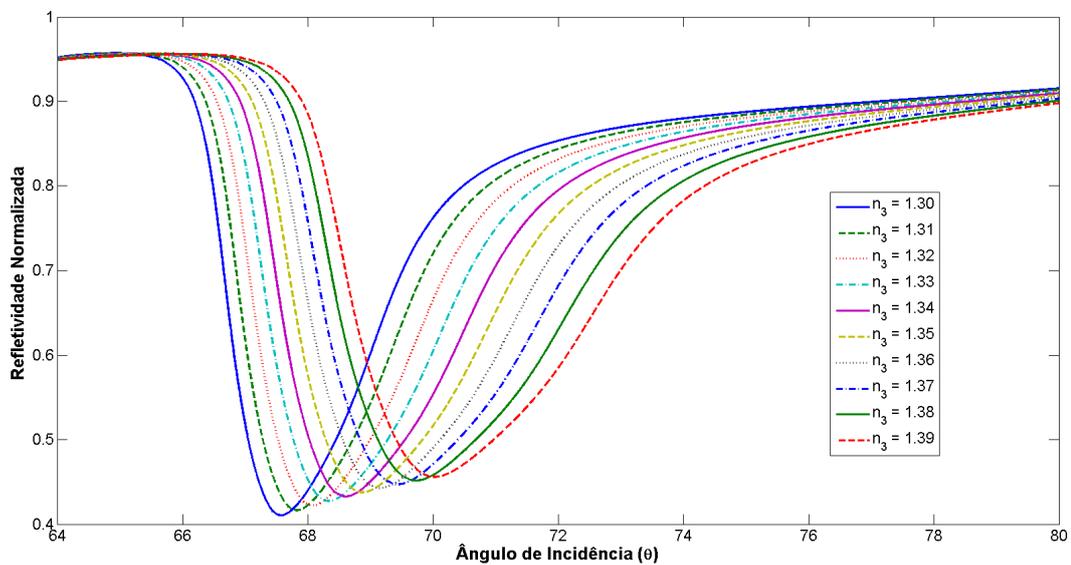


Figura 3.5: Simulação da resposta SPR para diferentes substâncias na camada sensível conservando sua espessura:  $d_3 = 50nm$ .

As curvas a seguir foram calculadas para o fenômeno SPR simulado com  $n_3$  variando de  $1,33RIU$  a  $1,34RIU$  a um passo de  $10^{-4}RIU$  e a espessura constante em  $50nm$ . As simulações consideraram uma resolução e precisão de amostragem maior que as disponíveis no SPREETA. Isso possibilita uma maior proximidade a resultado contínuo dos dados analisados. As simulações foram realizadas para uma faixa de ângulo de incidência  $64^\circ$  a  $80^\circ$  com um passo de  $0,25^\circ$ . Neste estudo de sensibilidade todos os valores foram normalizados para ter média zero e desvio unitário de acordo com (3.2).

$$X_i = (X_i - \bar{X})/\delta X \quad (3.2)$$

sendo  $\bar{X}$  o valor médio de  $X_i$  e  $\delta X$  seu desvio.

O sinal apresenta uma energia variante com o índice de refração da camada sensível. Quanto maior o índice menor a energia do sinal, como apresentado na Figura 3.6. A variação é aparentemente linear.

O método da Linha Base Dinâmica apresenta limitações se a faixa de ângulos capturadas não for grande o suficiente. Essa faixa deve incluir o valor  $\theta_0$  (ver Figura 2.7), caso contrário será impossível definir a área  $A_0$  desejada, sendo necessário redefinir os valores escolhidos de  $\gamma$  e/ou  $\Delta\theta$  (2.18). Por se tratar de simulações a opção de aumentar a faixa de ângulos simulada permitiu escolhermos  $\gamma = 1$  e  $\Delta\theta = 2^\circ$ .

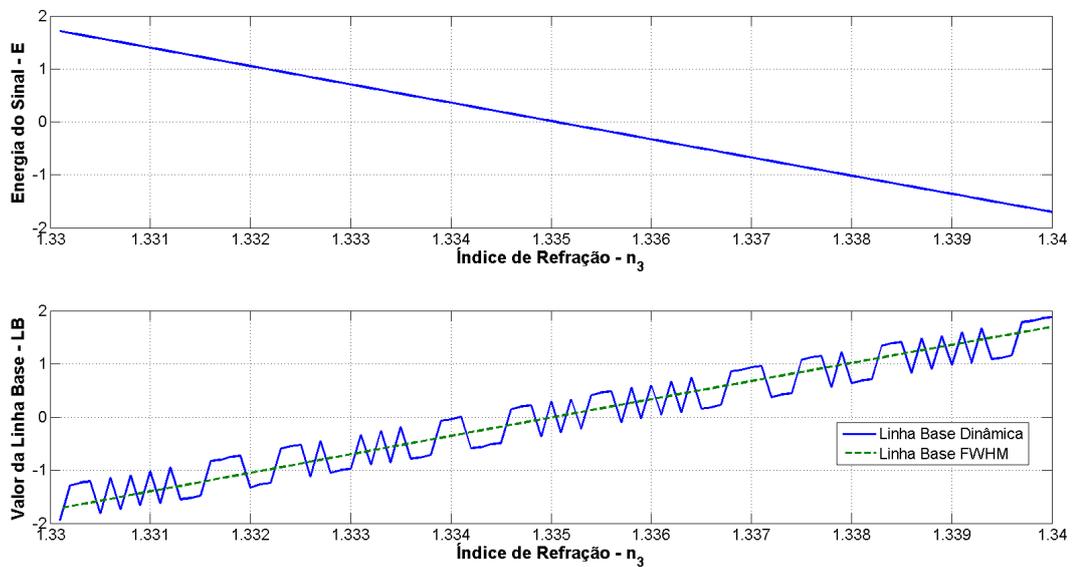


Figura 3.6: Variação da Energia da curva e seu valor de Linha Base (FWHM e Dinâmica) com o índice de refração da camada sensível:  $d_3 = 50nm$ .

Nestas condições observa-se um comportamento bastante similar entres os valores de linha base calculados pelos métodos de FWHM e a linha base dinâmica. Ambos crescentes com o índice de refração, como apresentado na Figura 3.6. A precisão finita de simulação das curvas é uma provável explicação para a linha base dinâmica não variar de forma monótona. A simulação foi realizada com precisão finita por falta de maior recurso computacional.

Uma observação das curvas na Figura 3.5 indica o crescimento do ângulo de ressonância e decréscimo da profundidade com o aumento do índice de refração, como apresentado nas curvas da Figura 3.7. Observa-se também que o valor de ressonância calculado a partir de dados abaixo da linha base dinâmica varia de forma monótona apesar de a linha base não variar desta forma.

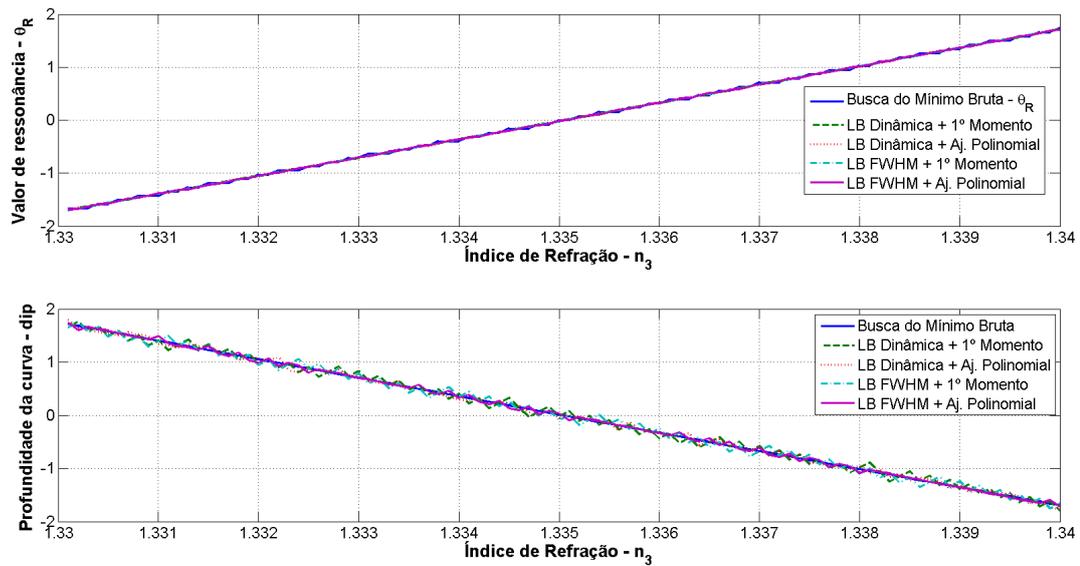


Figura 3.7: Variação da condição de ressonância com o índice de refração da camada sensível:  $d_3 = 50nm$ . Calculada por diferentes métodos.

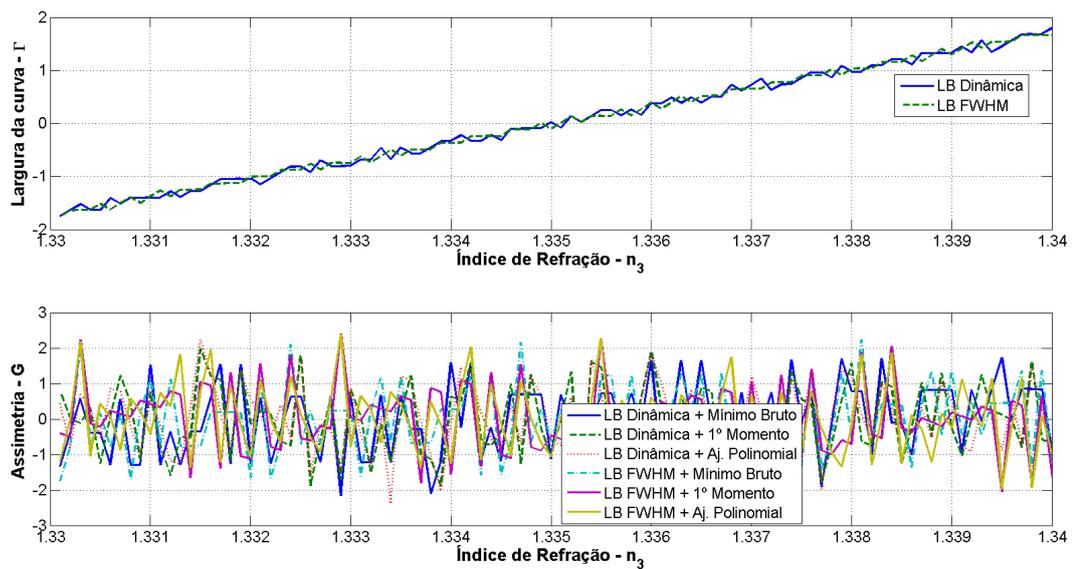


Figura 3.8: Variação da espessura e assimetria da curva SPR com o índice de refração da camada sensível:  $d_3 = 50nm$ . Calculada por diferentes métodos.

A largura da curva é crescente com o índice de refração. Sobre a assimetria pouco se pode afirmar, ver Figura 3.8.

### 3.4 Sensibilidade dos parâmetros morfológicos à espessura da camada sensível

Um estudo da influência da espessura  $d_3$  da camada sensível sobre a curva SPR também foi realizado, da mesma forma que foi feito com o índice de refração.

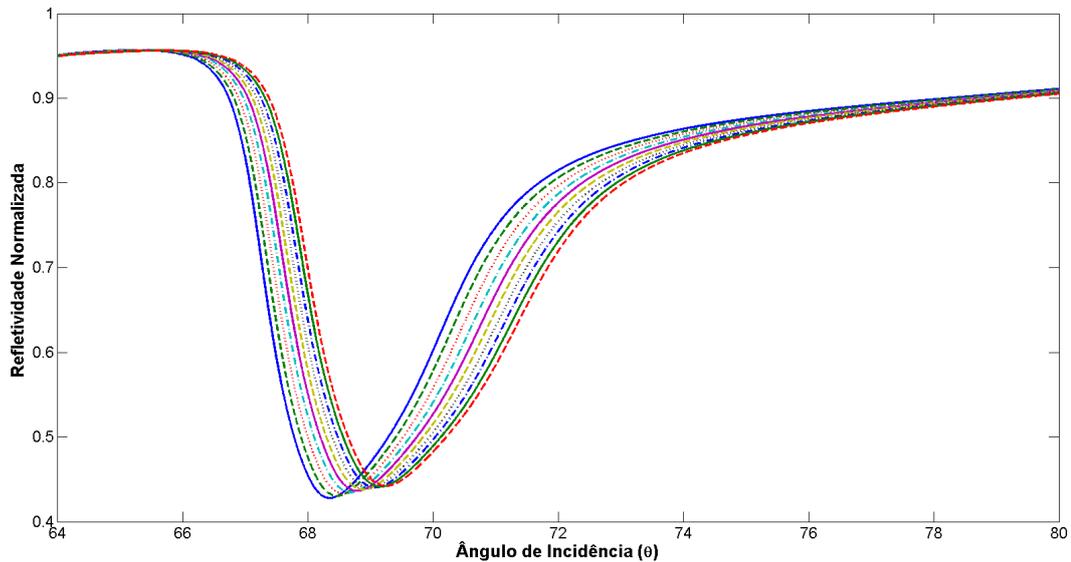


Figura 3.9: Simulação da resposta SPR para diferentes espessuras da camada sensível com a mesma substância:  $n_3 = 1.35RIU$ .

Variando a espessura da camada de  $1nm$  a  $100nm$  com um passo de  $1nm$ , cem curvas foram calculadas para um mesmo índice de refração da camada:  $n_3 = 1.35RIU$ . Dez dessas curvas estão apresentadas na Figura 3.9. As mesmas técnicas utilizadas anteriormente foram aplicadas a estas curvas. Neste estudo de sensibilidade todos os valores foram normalizados para ter média zero e desvio unitário de acordo com (3.2).

O comportamento da curva com o aumento da espessura da camada foi bastante similar ao comportamento da mesma com o índice de refração: crescente para o valor de linha base (Figura 3.10), para o ângulo de ressonância (Figura 3.11) e para a largura da curva (Figura 3.12); decrescente para a energia (Figura 3.10), o *dip* (Figura 3.11). Para a assimetria não foi observada nenhuma relação (Figura 3.12).

Parâmetros que variam linearmente com o índice de refração têm uma concavidade quando a espessura da camada é variada. Uma maior sensibilidade desses parâmetros às variações de  $n_3$  do que às variações de  $d_3$  pode ser percebida. Apesar de a curva ser mais sensível à espessura da camada (ver Figura 3.3), esse valor varia em escalas nanométricas, sendo menos

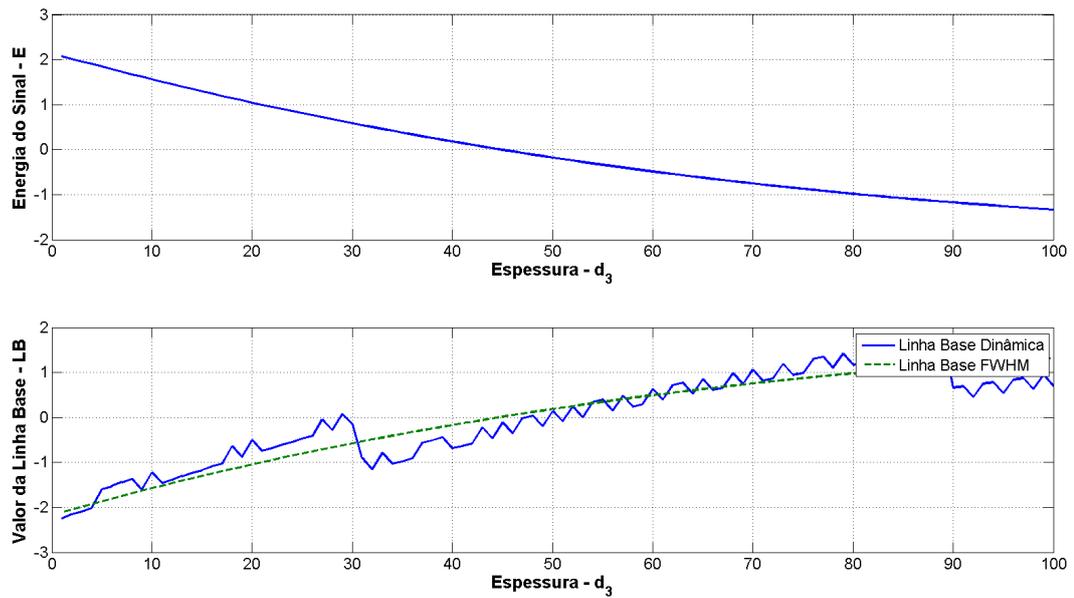


Figura 3.10: Variação da Linha Base (FWHM e Dinâmica) com a espessura da camada sensível:  $n_3 = 1.35RIU$ .

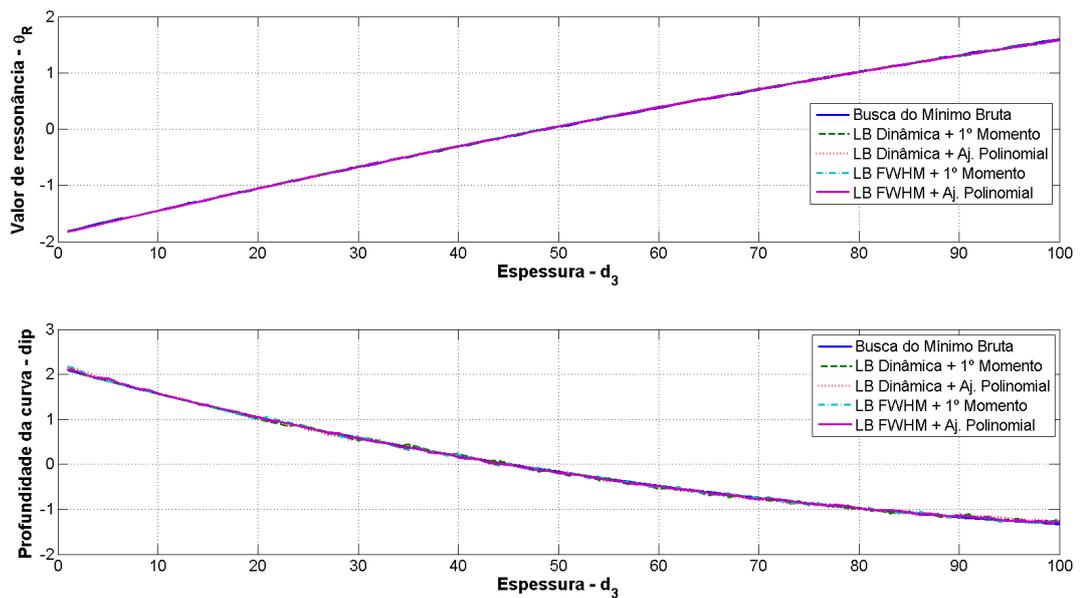


Figura 3.11: Variação da condição de ressonância com a espessura da camada sensível:  $n_3 = 1.35RIU$ . Calculada por diferentes métodos.

influyente.

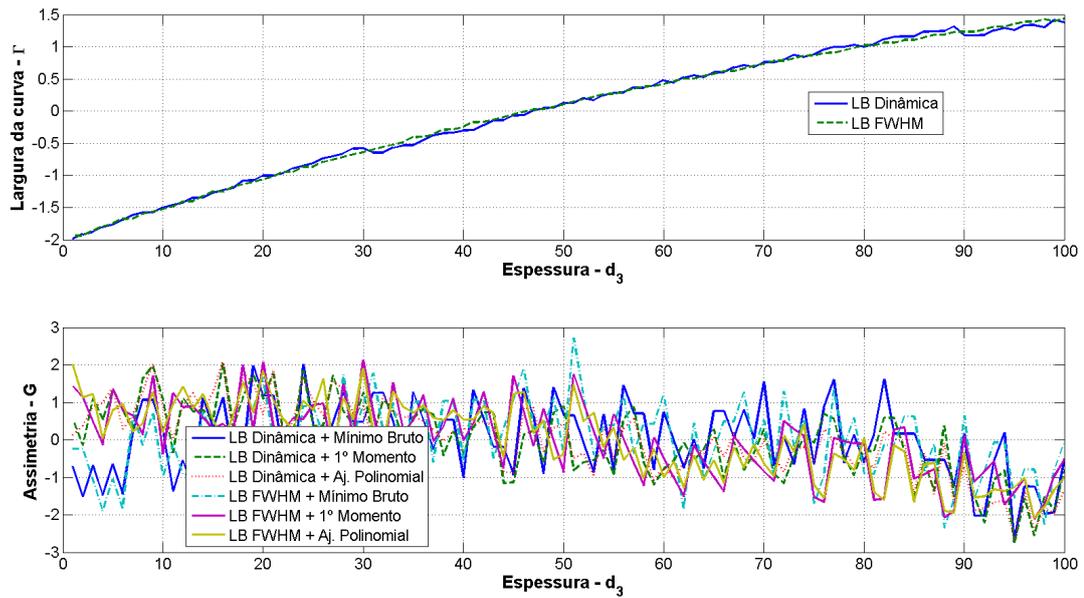


Figura 3.12: Variação da espessura e assimetria da curva SPR com a espessura da camada sensível:  $n_3 = 1.35RIU$ . Calculada por diferentes métodos.

### 3.5 Resumo do Capítulo

A fonte de luz não emite onda apenas na frequência desejada. Considerar esse espalhamento espectral da luz no modelo do fenômeno SPR implica em curvas próximas das adquiridas experimentalmente tanto em amplitude como em valores de mínimo, de largura e de linha base. Contudo essa consideração implica em uma menor sensibilidade da curva às grandezas que pretende-se determinar, implicando em uma maior faixa de erro.

Apesar das melhorias acrescentadas pelo ajuste com relação à luz ainda é necessário uma calibração da curva experimental a fim de corrigir erros inerentes do sensor óptico de captura, um arranjo de fotodiodos.

O crescimento dos parâmetros morfológicos da curva com as grandezas de interesse ( $n_3$  e  $d_3$ ) ocorre de forma similar, dificultando a determinação simultânea de forma correta, já que uma mesma combinação dessas grandezas pode gerar a mesma variação da curva.

# 4

## Plataforma Experimental

O Laboratório de Bio-sensores (LBIO) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) realiza pesquisas com a técnica SPR desde 2005. Estas pesquisas envolvem a criação de novos bio-sensores tanto como a utilização de modelos comerciais, o segundo apesar de mais simples de manipular não são flexíveis à manipulação. Hoje os pesquisadores do LBIO dispõem dos seguintes equipamentos:

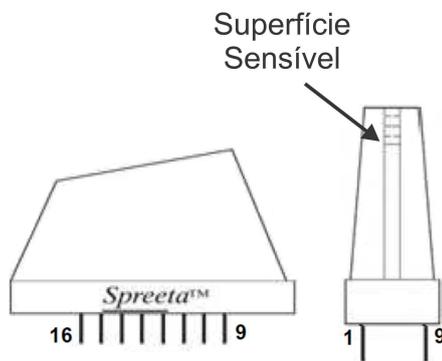


Figura 4.1: SPREETA: Bio-sensor SPREETA e periféricos.

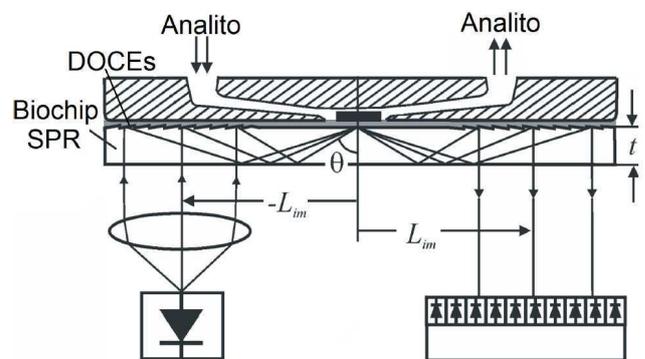


Figura 4.2: Bio-sensor VIR e periféricos.

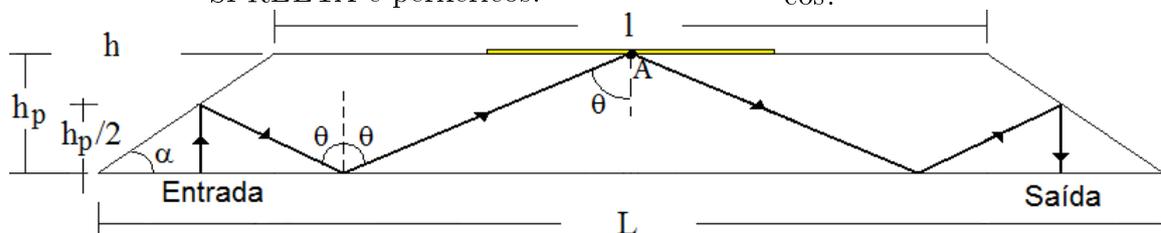


Figura 4.3: Bio-sensor PPBIO.

**Bio-sensor SPREETA.** Instrumentado em 1996 pela *Texas Instruments* (TI), o bio-sensor

SPREETA utiliza a configuração de Kretschmann-Raether no modo AIM. A TI propôs um encapsulamento único em material óptico, de forma a proteger os componentes e oferecer condições propícias para os espelhos, para os arranjos ópticos e para a construção da camada SPR, ver Figura 4.8. Toda essa estrutura de encapsulamento e instrumentação, juntamente com o bio-sensor SPREETA, foi denominada SPREETA, nome diferenciado do bio-sensor apenas pelas letras minúsculas. Apesar do baixo custo e volume, os menores do mercado, essa instrumentação está sujeita a variações de temperatura, o que afeta todos os elementos internos do SPREETA, a posição e a geometria dos componentes, o que pode alterar a posição de ressonância e, conseqüentemente, o desempenho do biosensor. O bio-sensor SPREETA é encapsulado em epoxy modelado (Ciba-Geisy, Loas Angeles, CA) com um LED de AlGaAs de  $830nm$  (Infratech, Garland, TX) e um polarizador para a luz. No encapsulamento também há um sensor de temperatura para detectar e posteriormente corrigir desvios causados pela variação dessa grandeza. Um fino filme de ouro de  $50nm$  compõe a superfície do sensor. Esta superfície fica em contato com um bloco de Teflon<sup>TM</sup> com um canal feito a laser de  $2 \times 10mm$  com  $0,762mm$  de profundidade. O SPREETA é capaz de medir índices de refração na faixa de 1,29 a 1,42 RIU (*Refractive Index Unit* - unidade de índice de refração). (Elkind, Stimpson, Strong, Bartholomew e Melendez, 1999). A instrumentação inclui um arranjo de  $1 \times 128$  fotodiodos. Hoje o SPREETA é produzido e comercializado pela empresa Sensata.

**Bio-sensor VIR.** Proposto em 2003 pela empresa VIR, o bio-sensor VIR utiliza elementos de acoplamento ópticos difrativos ou DOCE (*Diffractive Optical Coupling Elements*) para que feixes luminosos que atingem a superfície do bio-chip perpendicularmente incidam na superfície sensível em diferentes ângulos de incidência, ou seja, o modo AIM, ver Figura 4.2, dispensando sistemas mecânicos e goniômetros para isso. Contudo a fabricação dos elementos DOCE requer um aparato de nano-tecnologia holográfica complexa para a produção do molde inicial. Apenas um biosensor foi construído. Esse biosensor foi doado ao laboratório de Bio-sensores da UFCG, juntamente com componentes que permitiram excitar e instrumentar o fenômeno SPR no bio-sensor. Ao sistema composto por fonte de luz, lentes colimadoras, bio-sensor VIR, célula de fluxo e componentes de instrumentação denomina-se CAMBIO.

A proposta do CAMBIO é utilizar componentes da VIR unido a sistemas eletrônicos de controle e processamento de dados desenvolvidos no LBIO para criar um sistema de bio-sensoriamento totalmente portátil. Com uma unidade de Aquisição e Controle composta de uma interface com a câmera e de controladores de temperatura e de corrente do diodo laser que excita o fenômeno SPR, todos geridos por um micro-controlador ADuC841 programado para adquirir, pré-processar e transmitir os dados da curva SPR para a unidade de processamento. Este pode ser um computador pessoal ou o kit Innovator 1510 (portátil).

**Bio-sensor PPBIO.** Proposto para detecção rápida e possuindo as características de descartabilidade, baixo custo e flexibilidade para ser aplicado a fontes monocromáticas e policromáticas. O bio-sensor PPBIO utiliza um prisma óptico trapezoidal (ver Figura 4.3) fabricado com o polímero COC TOPAS 5013 usando técnicas de moldagem por injeção. Sobre o prisma óptico, uma fina camada de ouro (50 nm de espessura) foi depositada. TOPAS 5013 possibilita uma melhor adsorção de proteínas e outras moléculas (vírus e bactérias, por exemplo) do que a de outros polímeros.

Este bio-sensor pode funcionar tanto com o WIM como com o AIM, mas para o último lentes cilíndricas externas devem ser acrescentadas.

A solução para o problema de caracterização buscada deve ser genérica, baseada na curva característica do fenômeno SPR e independente do bio-chip ou da arquitetura de instrumentação utilizados. Qualquer um dos bio-sensores do LBIO da UFCG serviria para adquirir dados experimentais para análise durante o trabalho. Portanto, baseado no critério de custo, simplicidade de uso e conveniência do laboratório, o bio-sensor SPREETA foi escolhido como base da plataforma experimental, ver Figura 4.4.

Uma bomba transporta o líquido amostra para a célula de fluxo a uma velocidade constante. Na célula de fluxo a amostra entra em contato com a camada de ouro variando a curva SPR do bio-sensor, esta curva pe convertida em digital e processada para determinar as grandezas de interesse.

## 4.1 O SPREETA

Em 1996 a *Texas Instruments* (TI) iniciou a produção e comercialização de um sistema de bio-sensoriamento SPR com um dos menores custos de mercado. O *SPREETA<sup>TM</sup> Evaluation Kit*

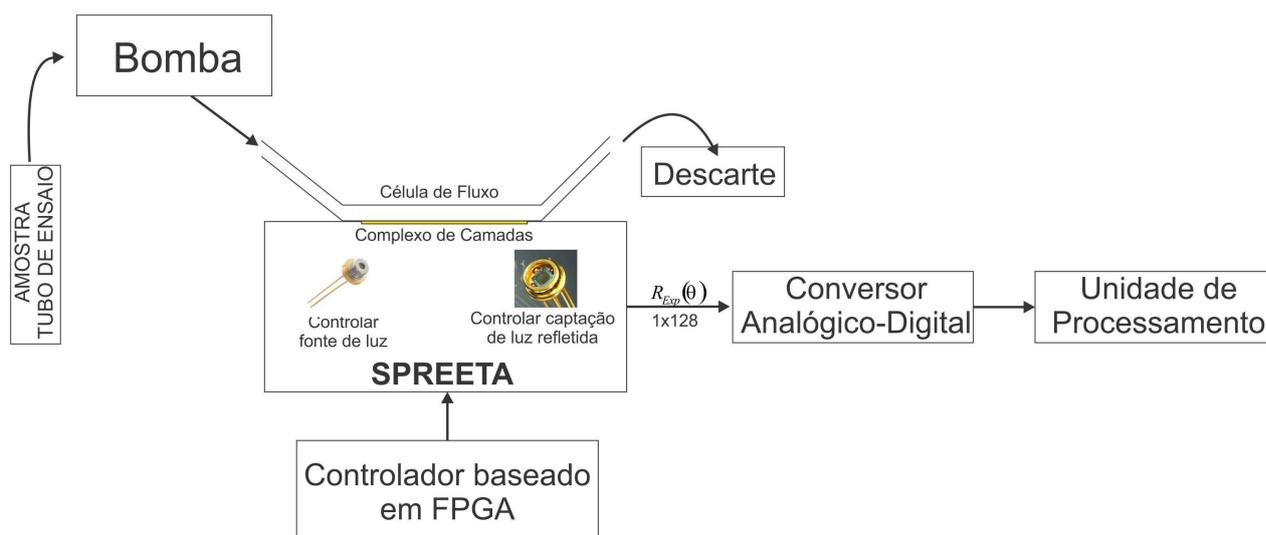


Figura 4.4: Diagrama de blocos da plataforma experimental.

consiste em um kit de desenvolvimento baseado no bio-chip SPREETA, em uma única peça de  $3\text{cm} \times 0,7\text{cm} \times 1,5\text{cm}$  estão encapsulados fonte de luz; esquema polarização, direcionamento e reflexão da luz; bio-chip SPREETA, sensor de temperatura e arranjo de fotodiodos para captação da luz. Esse sistema, contudo, só funciona quando corretamente acionado por um controle externo para gerar os sinais adequados ao seu funcionamento. Um módulo de processamento também é necessário para captura e processamento da resposta.

O kit da TI ainda tem um módulo de controle e aquisição de dados que se comunica com um computador através da porta serial para que o software SPREETA5 possa coletar, processar e apresentar os dados SPR. Contudo esse software é antigo e limitado em aplicação, além de subutilizar os recursos da máquina por precisar do *Microsoft Windows 98* para correto funcionamento.

Por isso os módulos de controle, aquisição e processamento de dados precisaram ser refeitos para melhor aproveitar a tecnologia, ver Figura 4.5. Neste capítulo o sistema de aquisição como o todo será apresentado.

O SPREETA foi projetado para medição quantitativa e em tempo real de interações biomoleculares através do método SPR no modo AIM. O equipamento possui três canais com uma faixa de sensibilidade de  $1,320$  a  $1,368RIU$  a uma resolução de  $5 \times 10^{-6}RIU$ , frequência de operação de  $5$  a  $2000\text{kHz}$  e resolução de  $128\text{pixels}$  (SPREETA, 2000).

Um arranjo de 128 fotodiodos de região sensível de  $63,5\mu\text{m} \times 55,5\mu\text{m}$  espaçadas a  $8\mu\text{m}$  (distância centro-a-centro:  $53,5\mu\text{m}$ ) captura o sinal luminoso refletido pelo complexo de

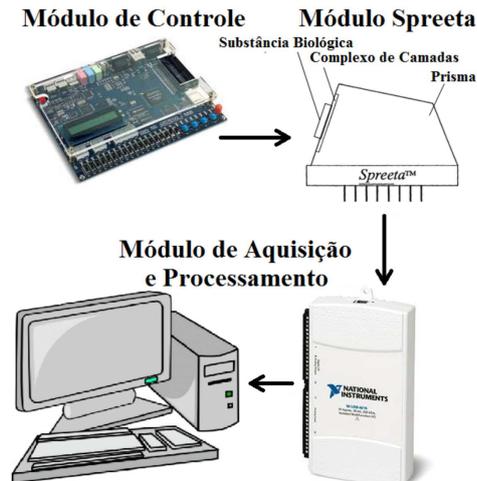


Figura 4.5: Diagrama do sistema de aquisição de dados.

camadas amostrando em 128 *pixels* de valor  $X_i$  ( $i \in [1, N]$ ), para o módulo SPREETA utilizado  $N = 128$ . Um tratamento de dados obtidos do SPREETA5, *software* pertencente ao *SPREETA<sup>TM</sup> Evaluation Kit*, resulta na relação pixel-ângulo dada por (4.1).

$$\theta_i = 3,1522 \times 10^{-5}i^2 - 0,0661i + 73,4533 \quad i = 1, \dots, N \quad (4.1)$$

O dado resposta esperado do SPREETA consiste em  $N$  pares  $[\theta_i, X_i]$ . A relação pixel-ângulo está explicitada na Figura 4.6.

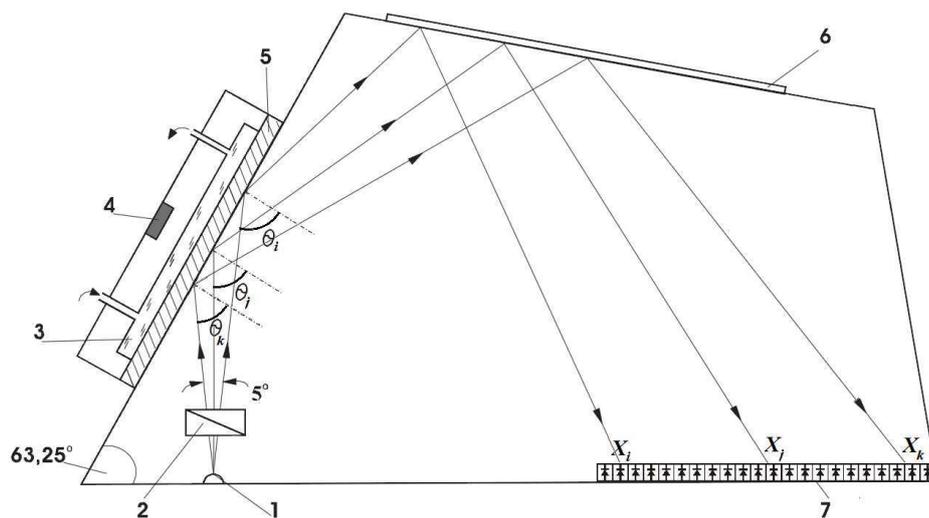


Figura 4.6: Esquema do SPREETA com seus componentes. 1 - LED; 2 - Polarizador; 3 - Célula de Fluxo; 4 - termistor; 5 - superfície sensível; 6 - espelho; 7 - arranjo de fotodiodos.

Apesar de possuir três canais para medição simultânea apenas um terminal de saída

de dados é compartilhado pelos diferentes canais, implicando em uma redução na taxa de amostragem se não houver aumento da frequência de operação ao utilizar mais de um canal.

Um processo rudimentar de *pipeline* é o que permite apenas um terminal de saída serial de dados por parte do SPREETA. Para isso um relógio (*clock*) sincroniza o sistema e sinais de início (*start*) e fim (*stop*) controlam um ciclo de operação. Os sinais de *start* e *stop* são emitidos quando o terminal de entrada *SI* é mantido em nível alto durante um pulso de clock.

Durante um ciclo de operação o arranjo fotodetector converte o sinal luminoso em sinal elétrico, um conversor analógico-digital (CAD) de *8bits* converte esse sinal para um registrador de deslocamento. No ciclo de operação seguinte o registrador de deslocamento fornece um sinal analógico referente à luz captada por cada pixel, sendo a duração desses sinais no terminal de saída equivalente ao período de um pulso. Ao fim de 128 pulsos todos os pixels foram enviados ao módulo de aquisição e no 129º pulso o registrador grava os valores medidos no ciclo atual.

O funcionamento do SPREETA é dividido, temporalmente, em dois ciclos: o ciclo de *reset* e o ciclo de medição. Os 18 primeiros pulsos do *clock* após o sinal de *start* formam o ciclo de reset, neste intervalo de tempo os LEDs devem permanecer desligados para que os fotodetectores sejam zerados, evitando que resquícios da medição anterior influenciem na atual. O ciclo de medição é iniciado no pulso de clock seguinte ao fim do *reset*, com um mínimo de 111 pulsos, tempo necessário para que todos os dados da medição anterior sejam enviados, esse ciclo dura até que o sinal de *stop* aconteça. Durante o ciclo de medição o sinal do LED deve ser controlado para fornecer a potência de excitação.

O fenômeno SPR em cada canal é excitado por um LED diferente, porém todos têm o anodo em comum, de forma que para uma excitação diferente da cada canal apenas o sinal de controle enviado ao catodo pode ser utilizado. O controle fornecido a cada LED é do tipo *on/off*, de forma que para definir a potência de excitação uma alternância de estados ligado/desligado formando uma onda modulação por comprimento de pulso (*Pulse Width Modulation* - PWM).

Para melhor entendimento dos sinais de controle e saída do SPREETA ver diagrama de tempo na Figura 4.7.

O SPREETA possui também uma memória *4KI<sup>2</sup>CEEPROM*. Inicialmente gravada com a configuração de calibração de fábrica esta memória pode ser lida ou reescrita pelo

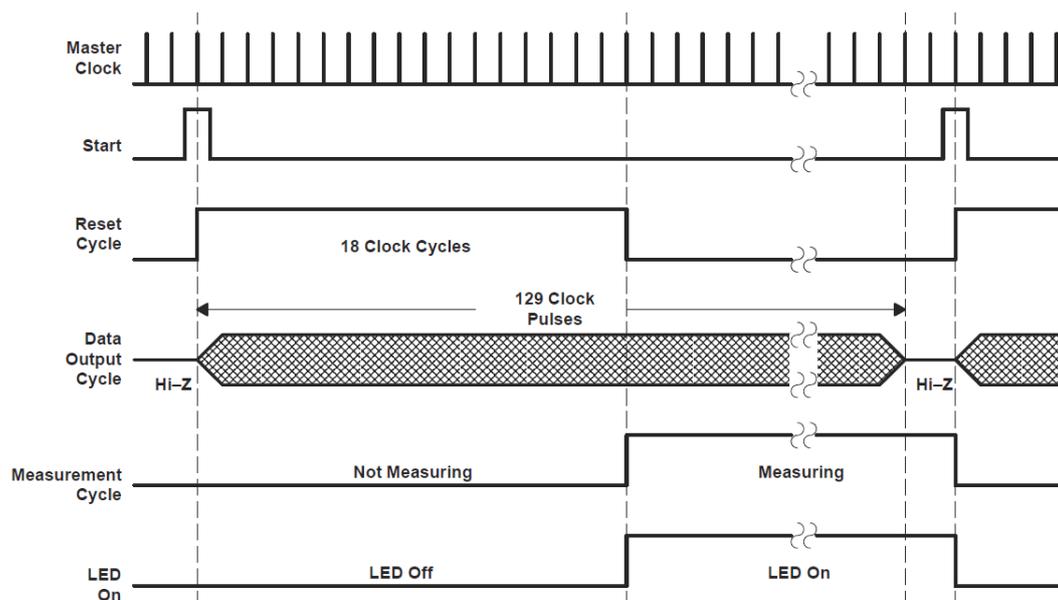


Figura 4.7: Diagrama de tempo dos sinais de controle e saída do SPREETA.

usuário com uma nova calibração através de um barramento duplo bi-direcional. Uma borda de descida na via de dados durante um nível alto do relógio sinaliza o início de uma operação de escrita/leitura e uma borda de subida durante o mesmo semi-período do relógio sinaliza o fim desta operação. O dados enviado durante a comunicação contém a informação de escrita/leitura de acordo com o protocolo  $I^2C$  (*Inter-Integrated Circuit*). A transferência de dados é ilimitada, contudo apenas os últimos  $16bits$  são armazenados de maneira FIFO (*First-in-First-out*).

Hoje o equipamento é fabricada pela empresa *Sensata* em diferentes modelos, de forma que informações do dispositivo de três canais fabricado pela TI não foram encontradas. Com base em *datasheets* de modelos similares e informações de anais e artigos o diagrama de blocos de um modelo de um canal foi ajustado para o SPREETA utilizado, ver Figura 4.8b.

## 4.2 O Módulo de controle

A geração dos sinais de controle do SPREETA é realizada por um *hardware* reconfigurável (Oliveira, Grilo, Lima e Melcher, 2011): um Arranjo de Portas Programável em Campo (FPGA -*Field Programmable Gate Array*). Esse equipamento possibilita um desenvolvimento rápido e de fácil modificação com um tempo de resposta a nível de *hardware*. Para isso foi escolhido o FPGA Altera Cyclone® II 2C35 utilizando o kit de desenvolvimento

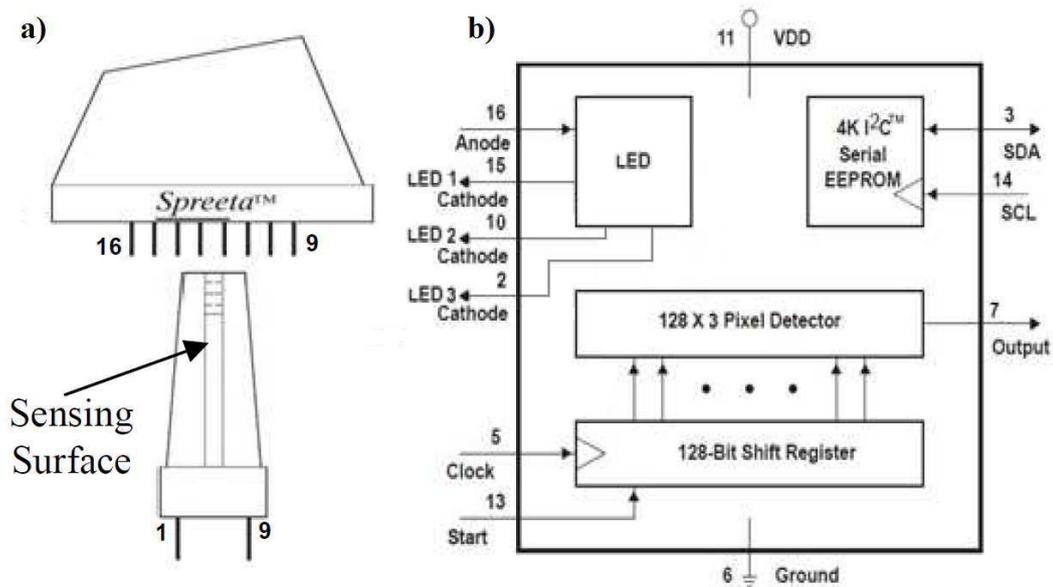


Figura 4.8: (a) Estrutura física do SPREETA e (b) Diagrama de Blocos.

Altera® DE2.

O controlador, descrito em *hardware*, gera todos os sinais de controle garantindo que ocorram condições inválidas, como o pulso de *start* ou *stop* durar mais que um pulso de clock ou o ciclo de operação durar menos que 129 pulsos de clock.

Esse módulo também define a potência luminosa do LED e a frequência de operação do equipamento. Um equilíbrio deve ser encontrado ao definir essa frequência, pois ela também determina o tempo de exposição do elemento fotodetector (uma câmera CCD) à luz. Uma alta frequência de clock implica em pouca exposição dos fotodetectores à luz, sendo necessário maior potência fornecida pela fonte de luz. Para reduzir a potência fornecida ao LED é necessário aumentar o tempo de exposição dos fotodiodos à luz, diminuindo a frequência. A frequência ótima é a que maximiza a resposta dos fotodetectores sem os saturar.

O equilíbrio entre potência e frequência recomendado pelo fabricante é atingido quando a tensão média de resposta dos 128 fotodiodos é de  $2,5V$ , a um ponto de operação do LED de  $1,7V$  e  $20mA$ . Para uma tensão de saída de  $3,3V$  da Altera® DE2, o ciclo de trabalho do LED deve ser ajustado para 51%.

Para uma maior taxa de amostragem de curvas SPR a ciclo mínimo de operação foi escolhido: 129 pulsos de *clock*. O que implica que o LED deve permanecer desligado em 45 pulsos de *clock* após o ciclo de *reset*. Nessas condições a tensão média de saída desejada limita a frequência de operação em  $8,33kHz$  o que implica em uma curva SPR a cada  $15,48$

milissegundos.

Estes ajustes resultaram em uma maior qualidade da curva capturada. Com menor nível de ruído e maior proximidade com a curva teórica. Essas melhorias são perceptíveis inclusive visualmente.

### 4.3 O Módulo de aquisição e processamento de dados

Para receber dados do SPREETA um conversor analógico-digital (CAD) deve ser capaz de converter dados de  $2,5V$  para  $16bits$  que duram  $0,12seg$ . Essa resolução foi escolhida para reduzir o ruído intrínseco ao design do sensor. O dispositivo disponível no laboratório que atende a estas especificações é o NI USB-6210 da *National Instruments*, CAD de  $16bits$  com capacidade de até  $250k$  amostras por segundo.

O CAD escolhido possui uma saída USB e pode ser facilmente gerenciado no *software LabView* da mesma empresa. Além de ser de fácil manuseio a aplicação em *LabView* pode gerada para um sistema embarcado de menor processamento.

O programa (Figura 4.9) criado pode ser dividido em três partes: (a) aquisição de dados; (b) pré-processamento; e (c) processamento e apresentação, ver Figura 4.9.

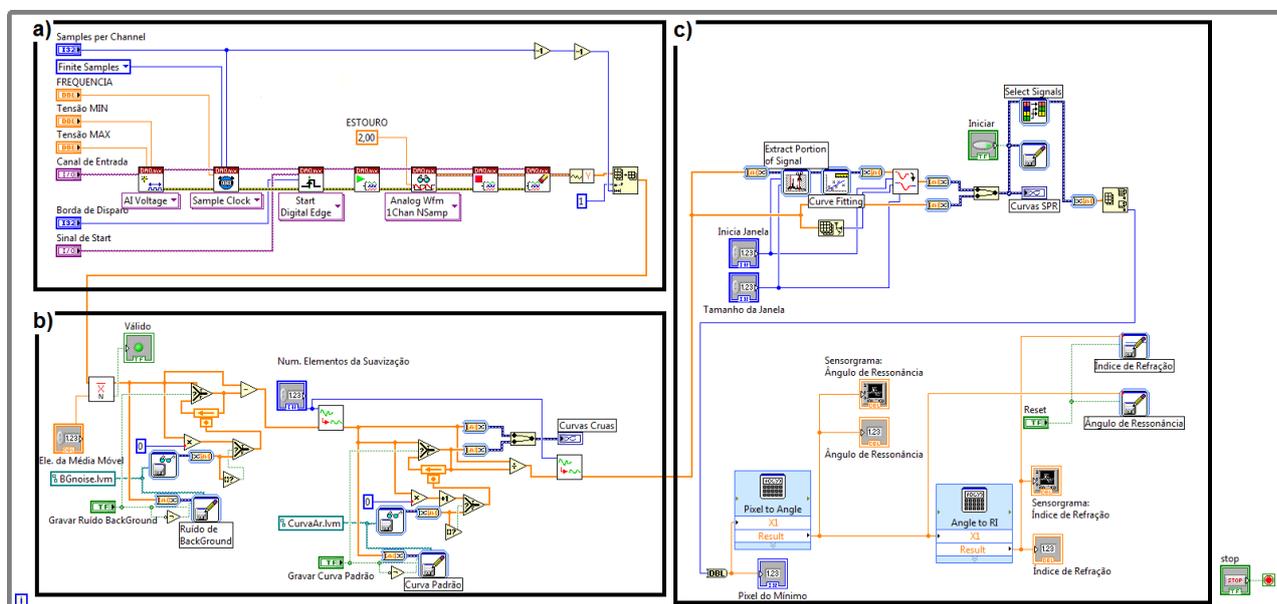


Figura 4.9: Programa em LabView da NI (a) Aquisição dos dados; (b) Pré-processamento (filtros temporal e espacial); e (c) Processamento e apresentação dos dados do SPREETA.

A primeira parte consiste em uma comunicação e controle do CAD NI USB-6210 para ajustar a frequência de amostragem correta, identificar o sinal de *start* enviado ao SPRE-

ETA e agrupar os dados em blocos de  $129 \times 16\text{bits}$ , sendo o último descartado. O pré-processamento é o tratamento dos dados até que a curva SPR seja calculada: adquirir e armazenar a curva de referência (Ar); minimizar os diferentes ruídos (corrente de escuro, ruído temporal e ruído espacial); aplicar uma divisão pixel-a-pixel do sinal pela referência para obtenção da curva SPR e; gravar a curva para posterior análise. A terceira parte seleciona uma porção do sinal captado, a região em torno do mínimo; aplica um ajuste polinomial à porção selecionada; determina o pixel e o ângulo em que ocorreu o valor de mínimo; calcula o índice de refração referente ao ângulo de ressonância encontrado através de (2.9) e; apresenta os dados em uma interface através de um sensorgrama, ver Figura 4.10.

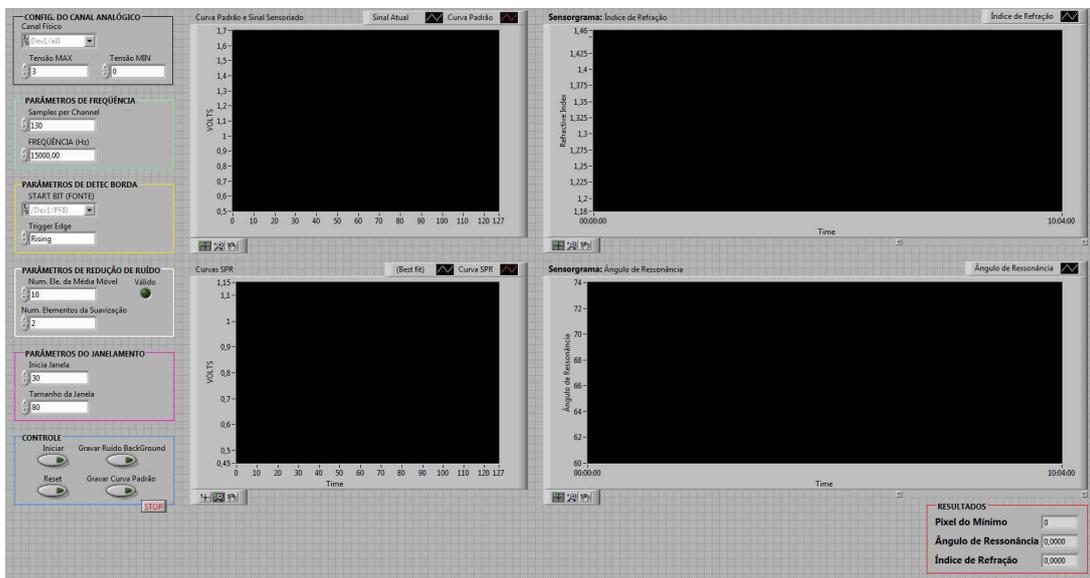


Figura 4.10: Interface do programa desenvolvido para adquirir, pre-processar, apresentar e gravar os dados do SPREETA.

A inicialização do sistema deve incluir uma etapa da calibração na qual serão adquiridas as curvas padrão  $[\theta_i, X_i^{AR}]$  e de escuro  $[\theta_i, X_i^{CE}]$ , a primeira com a célula de fluxo seca (apenas com ar) e a segunda com o LED do canal apagado (ciclo de trabalho 0%).

## 4.4 Procedimentos experimentais

Um procedimento experimental foi elaborado de modo a diminuir erros e garantir repetibilidade ao experimento.

O procedimento é iniciado horas antes do experimento buscando uma distribuição isotérmica do ambiente, equipamentos e substâncias analisadas. Dez horas antes de iniciar a experimentação, de preferência à noite ou durante o fim de semana para evitar o fluxo de

peessoas servindo como fonte de calor, todos o material utilizado é alocado na sala de experimentação que fica fechada com o ar condicionador a 17°C. O intervalo de 10h é considerado do suficiente para que o ambiente esteja na mesma temperatura.

Um processo de limpeza inicia a utilização do bio-sensor SPR. A célula de fluxo é preenchida com álcool isopropílico (Nomadics, 2004) que remove substâncias ligadas à camada de ouro sem danificá-la. por ser um filme de ouro muito fino (50nm) qualquer produto de limpeza que remova moléculas de ouro danifica permanentemente o equipamento. Água deionizada e dessalinizada é permutada com álcool isopropílico e sua curva é analisada até que não haja variações significativas após aplicado álcool e água outra vez.

Após sua limpeza o bio-sensor deve ser calibrado. Ar ambiente é bombeado na célula de fluxo, o que nomeia-se de célula seca. Curvas são capturadas para a célula seca, a curva média é considerado o sinal de referência  $[\theta_i, X_i^{AR}]$ . Um sinal  $[\theta_i, X_i^{CE}]$  também é capturado com a luz excitante do fenômeno desligada. Essa é a curva de corrente de escuro que será subtraída de cada curva amostrada  $[\theta_i, X_i^A]$  para minimizar o efeito da corrente de escuro. A diferença é então dividida ponto-a-ponto pela curva de referência, também para minimizar imperfeições de amostragem (4.2).

$$X_i = \frac{X_i^A - X_i^{CE}}{X_i^{AR}} \quad (4.2)$$

Em seguida o experimento é iniciado. As substâncias analisadas são bombeadas uma a uma na célula de fluxo intercaladas com água para remover as moléculas que não fixaram na camada formada. Contudo apenas uma solução tampão de salina foi utilizada neste trabalho. Esta solução tem fraca ligação com ouro e a água basta para limpar a camada formada. Por isto o experimento realizado com PBS exige uma permanência do bombeamento da substância na célula de fluxo.

## 4.5 Resumo do capítulo

Todo o sistema de aquisição de dados apresentado de forma simplificada neste capítulo foi projetado para ser flexível. Possibilitando fácil ajuste de acordo com a necessidade do usuário. A Interface também foi projetada para ser clara e intuitiva ao usuário.

Os sinais de controle foram ajustados para tirar maior proveito de cada dispositivo. Em nível de *hardware* foi ajustado o ponto de operação da fonte de luz (1,7V e 20mA) e a

frequência de operação ( $8,33kHz$ ) do equipamento. Esses ajustes ajustaram a operação do equipamento para uma resposta menos ruidosa e mais próxima da curva teórica.

Em nível de *software* as alterações envolveram inclusão da subtração da corrente de escuro, de métodos de minimização de ruído e operação online. Essas alterações possibilitaram monitoramento online da resposta SPR.

O software implementado também é flexível à inclusão de novas técnicas de processamento do sinal e redução do ruído, com a restrição de tempo de processamento, este não deve exceder o período de amostragem do sinal, é uma aplicação em tempo real. Assim técnicas avançadas de alta carga computacional devem ser evitadas.

Uma comunicação do *software* de processamento e interface e o módulo de controle é uma sugestão de melhoria não realizada. Este ajuste facilita a etapa de calibração do bio-sensor. Possibilitando o usuário determinar a potência luminosa excitante e o tempo de integração de forma simples na interface, sem a necessidade de reconfigurar o *hardware*.

# 5

## Processamento do Sinal

A alta precisão e sensibilidade do bio-sensor SPR podem ser um problema quando na presença de ruído, pois uma variação causada pelo ruído pode ser interpretada como uma alteração na camada sensível. O ruído influi principalmente na operação de busca da condição de ressonância. Diferentes técnicas utilizadas nesta busca respondem de forma diferente a ruídos de mesma origem. Por isso a escolha da técnica utilizada nesta busca também é um fator determinante da precisão e sensibilidade do bio-sensor.

Neste capítulo as diversas fontes de perturbação do sistema serão estudadas (Seção 5.1) para melhor selecionar as técnicas de redução de ruído a serem utilizadas (Seção 5.2) e então determinar as técnicas mais adequadas para busca da condição de ressonância e determinação das grandezas de interesse da camada sensível no capítulo seguinte.

### 5.1 Caracterização das fontes de ruído

O sensor de imagem utilizado no Spreeta é um arranjo de fotodiodos seguidos por integradores, como ilustrado no diagrama de blocos da Figura 5.1. O semicondutor do fotodiodo absorve a energia dos fótons incidentes. Se o fóton absorvido tem energia suficiente um par elétron-lacuna é gerado. O campo elétrico gerado pela tensão aplicada ao dispositivo geram uma corrente elétrica a partir dos elétrons livres no material. Essa corrente  $I_{fd}$  é diretamente proporcional à potência luminosa incidente  $P_l$  dado um fator de resposta  $S$  do fotodiodo:

$$I_{fd} = SP_l, \quad (5.1)$$

sendo  $S$  baseado na eficiência quântica  $\eta$  e o comprimento de onda da luz incidente  $\lambda$ . Para  $\lambda$  em micrometros  $S \approx \frac{\eta\lambda}{1.24}$ .

Cada fotodiodo do arranjo é tem sua corrente integrada em um intervalo de tempo definido. A tensão gerada é amostrada em um capacitor de saída para ser amplificada. Um sinal de controle para zerar os capacitores e reiniciar a integração também faz parte do circuito de cada pixel.

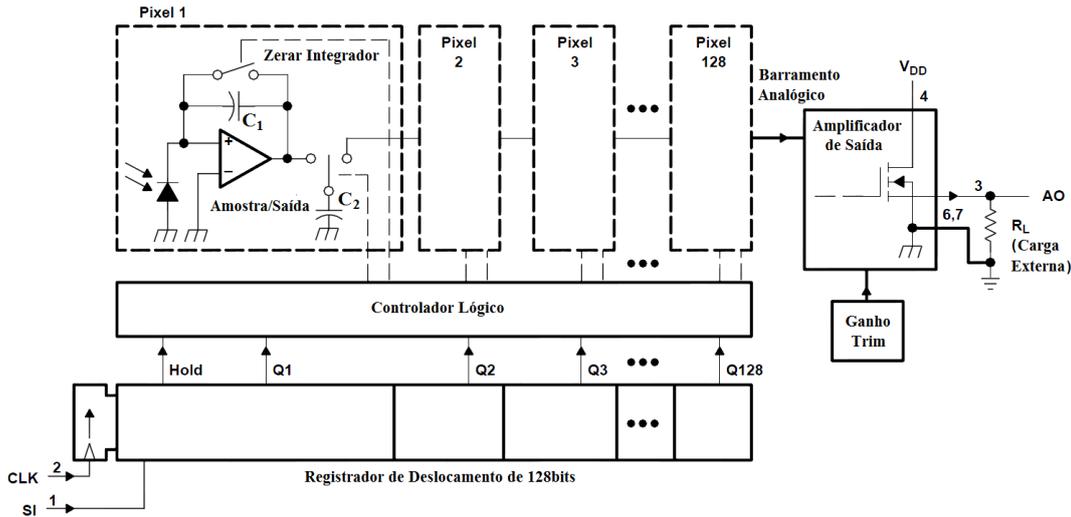


Figura 5.1: Diagrama de blocos do arranjo fotodetector. (SPREETA, 2000)

Desde a fotodetecção até ser convertido em digital, o sinal está sujeito a muitas fontes de ruído. A Eq. 5.1 só é verdadeira se considerarmos  $I_{fd}$  como o valor médio da corrente, devido às variações impostas pelo ruído, algumas destes são:

**Shot Noise** - A aleatoriedade de chegada dos fótons na região sensível semicondutora do fotodiodo implica em uma geração aleatória de elétrons, essa aleatoriedade é descrita como o *shot noise*. Regiões mais claras da imagem são mais influenciadas por este ruído. Ao considerá-lo a corrente  $I(t)$  do fotodetector é dada por

$$I(t) = I_{fd} + i_s(t),$$

sendo  $i_s(t)$  o sinal aleatório causado pelo *shot noise*.

O sinal  $i_s(t)$  tem estatística de *Poisson* e valor médio quadrático proporcional à raiz quadrada da intensidade da luz captada.

**Ruído de térmico** - Os elétrons possui um aleatoriedade de movimentação devido à temperatura. Essa movimentação gera flutuações de corrente  $i_T(t)$  existem mesmo na

ausência de tensão aplicada. Sua consideração implica em

$$I(t) = I_{fd} + i_s(t) + i_T(t).$$

**Corrente de escuro** - Há corrente nos fotodetectores mesmo na ausência de luz. Parte desta corrente se deve ao ruído térmico e outra parte, a corrente de escuro, ocorre por o detector não ser ideal, existindo uma corrente residual. Essa corrente também é aplicada ao integrador de forma que o sinal capturado tem um ruído aditivo causado pelo vazamento de corrente no escuro. A natureza aditiva do ruído simplifica sua suavização, bastando que seja mensurado e subtraída de toda imagem adquirida. Esse procedimento é realizado pelo software apresentado no Capítulo 4.

**Ruído de *reset*** - Ao iniciar uma medição o capacitor do integrador deve ser zerado, isso é feito acionando uma chave controlada em paralelo com o capacitor, ver Figura 5.1. Contudo a chave controlada não é ideal e tem uma resistência que gera uma perturbação térmica. Essa perturbação somada à corrente de escuro e ao *shot noise* no fotodetector impedem a tensão do capacitor zerar em um curto período de tempo. A essa tensão residual chama-se ruído de *reset*. O valor quadrado médio desse ruído se aproxima de  $kT/2C$ , sendo  $k$  a constante de Boltzman,  $T$  a temperatura e  $C$  a capacitância do integrador ( $C_1$  na Figura 5.1).

**Não uniformidade do detector** - Apesar de bastante similares os detectores não são todos iguais devido a imperfeições no processo de fabricação. Essas pequenas diferenças causam uma variação da sensibilidade de cada pixel.

**Ruído do Amplificador de Saída** - O amplificador de saída, por não ser ideal, tem uma resistência de canal que implica em um ruído térmico, da mesma forma da chave de *reset*. Esse ruído pode ser calculado por:  $\sqrt{2kT/C}$ , sendo  $k$  a constante de Boltzman,  $T$  a temperatura e  $C$  a capacitância do amplificador ( $C_2$  na Figura 5.1).

O amplificador também impõe um ruído inversamente proporcional à frequência do sinal. Este não é facilmente mensurado.

**Ruído de Discretização** - O ruído provocado por quantificar os pixels de uma imagem capturada com um número finito de níveis discretos é conhecida como ruído de discre-

tização. Esse ruído tem uma distribuição aproximadamente uniforme e normalmente depende do sinal capturado.

Por simplicidade trataremos o ruído como de dois tipos: temporal, espacial. O primeiro é o ruído que varia no curto espaço de tempo, podendo ser percebido em uma análise quadro a quadro do fenômeno SPR. Esse é o ruído apresentado por cada pixel ao longo do tempo. O segundo é o ruído pixel-a-pixel em um único instante de tempo. O ruído que pode ser percebido em um pixel e seus vizinhos mais próximos. O ruído temporal será analisado tanto no domínio do tempo quanto no domínio da frequência.

## 5.2 Técnicas de Minimização de Ruído

Na escolha de um algoritmo de redução de ruído, deve-se pesar principalmente dois fatores em busca de um equilíbrio de acordo com a aplicação:

- Tempo e capacidade de processamento disponíveis: para um sistema portátil há uma limitação de processamento para garantir um tamanho pequeno, pouco peso e alta autonomia. Esse problema pode ser crítico quando deseja-se uma análise em tempo real dos dados.
- Perda de detalhes: até que nível de detalhe permite-se perder para eliminar ruído. Buscar um critério para avaliar se as variações na imagem são ruído ou não.

Alguns algoritmos para minimizar o ruído foram comparados. A avaliação do algoritmo inclui o número de elementos utilizados em cada passo de cálculo, ou seja, nível de esforço computacional requisitado. Esses algoritmos foram classificados de acordo com o tipo de ruído que o mesmo trata e a abordagem dada. Serão nomeados algoritmos temporais aqueles que tratam o ruído temporal no domínio do tempo; algoritmos espaciais os que tratam o ruído espacial; e algoritmos frequenciais aqueles que tratam o ruído temporal no domínio da frequência.

A realização do estudo de ruído ocorreu de acordo com o diagrama da Figura 5.2. A relação sinal ruído da curva experimental não pôde ser calculada por desconhecimento do sinal sem ruído, por isso um simulador foi elaborado para criar uma curva ( $R(\theta)$ ) e adicionar o ruído característico do SPREETA  $\xi(\theta)$ . Dessa forma os algoritmos de minimização de

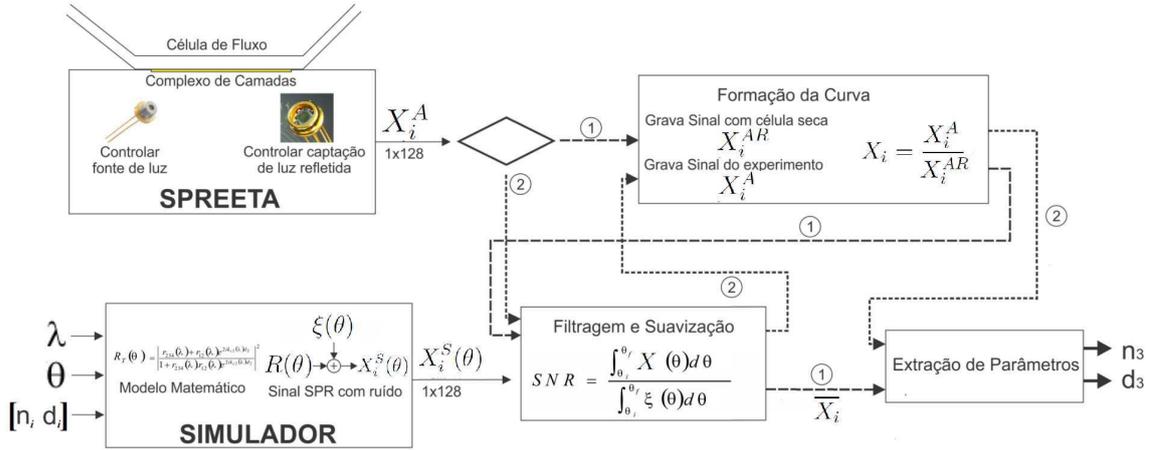


Figura 5.2: Diagram do blocos do sistema.

ruído foram testados sobre a curva simulada com ruído:

$$X_i^S(\theta) = R(\theta) + \xi(\theta),$$

sendo  $\xi(\theta)$  o valor do ruído para cada ângulo de incidência. Para determinar esta grandeza um experimento foi realizado durante 30min capturando a resposta SPR da água, simulada por um modelo de três camadas, mais simples, as diferenças entre o valor simulado e o valor experimentado foi considerada como ruído espacial ( $\xi^S(\theta)$ ). A variação máxima  $\xi_{MAX}^T$  da curva da água no tempo também foi medida, caracterizando o ruído temporal como uma variável aleatória de distribuição uniforme  $(-\xi_{MAX}^T, \xi_{MAX}^T)$ . As curvas também foram analisadas após uma transformada de Fourier, as componentes que não fazem parte do sinal puro foram separadas e consideradas como ruído  $\xi^F(\theta)$ , por fim:

$$\xi(\theta) = \xi^S(\theta) + \xi^T(\theta) + \xi^F(\theta).$$

Para avaliar as técnicas a relação sinal ruído (*Signal Noise Ratio* - SNR) foi calculada sobre as curvas suavizadas. O algoritmo com a maior relação sinal ruído foi escolhido por seu desempenho.

O estudo também procurou determinar quando aplicar os algoritmos de minimização de ruído antes (caminho 2 na Figura 5.2) ou de depois (caminho 1 na Figura 5.2) de a curva capturada ser dividida pela referência.

### 5.2.1 Minimização do ruído temporal - no domínio do tempo

#### Média com janela deslizante

Para um janela temporal definida as curvas  $[\theta_i, X_i]$  ( $i = 1, \dots, N$ ) são utilizados para o cálculo de uma única curva com menor ruído  $[\theta_i, \bar{X}_i]$  ( $i = 1, \dots, N$ ). Com  $N$  sendo o número de fotodetectores, para o módulo Spreeta  $N = 128$ . Cada nova curva adquirida é adicionada à janela e a mais antiga removida, ver (5.2). Com  $N$  curvas brutas são calculadas  $N - L_t + 1$  curvas suavizadas.

$$\bar{X}_i(t_n) = \frac{1}{L_t} \sum_{k=n-L_t}^n X_i(t_k), \quad i = 1, \dots, N \quad (5.2)$$

Sendo  $X_i(t_n)$  o sinal do pixel  $i$  no instante  $t_n$ ,  $t_n = t_0 + n.T$ ,  $T$  o período de amostragem e  $L_t$  o número de elementos na média.

#### Média com janela de salto

Uma janela de  $L_t$  curvas é selecionada para o cálculo de uma única curva com menor ruído. Contudo só a cada  $L_t$  novas curvas adquiridas uma curva suavizada é calculada, uma curva  $[\theta_i, X_i]$  não é utilizada mais de uma vez, ver Eq. 5.3. Com  $N$  curvas brutas são calculadas  $N/L_t$  curvas suavizadas.

$$\bar{X}_i(t_n) = \frac{1}{L_t} \sum_{k=(n-1)L_t+1}^{nL_t} X_i(t_k), \quad i = 1, \dots, N \quad (5.3)$$

Sendo  $X_i(t_n)$  o sinal bruto do pixel  $i$  no instante  $t_n$ ,  $t_n = t_0 + n.T$ ,  $T$  o período de amostragem e  $L_t$  o número de elementos na média.

#### Média com janela deslizante com esquecimento

Esse algoritmo é similar à média com janela deslizante, diferenciando apenas no peso de cada elemento da média, ver Eq. 5.4.

$$\bar{X}_i(t_n) = \frac{1}{L_t \sum p_k} \sum_{k=n-L_t}^n p_k \cdot X_i(t_k), \quad i = 1, \dots, N \quad (5.4)$$

O peso ( $p_k$ ) de cada curva foi escolhido de tal forma que toda curva vale o dobro da curva anterior e metade da seguinte.

### Média com janela de salto com esquecimento

Com o mesmo peso do algoritmo anterior temos a Eq. 5.5.

$$\bar{X}_i(t_n) = \frac{1}{L_t \sum p_k} \sum_{k=(n-1)L_t+1}^{nL_t} p_k X_i(t_k), \quad i = 1, \dots, N \quad (5.5)$$

## 5.2.2 Minimização do ruído temporal - no domínio da frequência

### Filtro Passa Baixas

Método linear, consiste em calcular a transformada discreta de Fourier (DFT) dos 128 pontos do sinal (5.6), aplicar uma máscara para retirar as frequências mais elevadas e calcular a transformada inversa (IDFT) (5.7). O raio de  $r$  frequências em torno do zero determina a banda de passagem do filtro. Um  $r$  elevado consiste em uma grande banda de passagem, filtrando pouco. Um  $r$  pequeno implica em um banda de passagem estreita, eliminando maior parte das frequências do sinal. A máscara é uma matriz diagonal com:

$$DFT : \quad Z_i = \sum_{n=1}^N X_n e^{-2j\pi(i-1)(n-1)/N}, \quad i = 1, \dots, N \quad (5.6)$$

$$IDFT : \quad X_i = \sum_{n=1}^N Z_n e^{2j\pi(i-1)(n-1)/N}, \quad i = 1, \dots, N \quad (5.7)$$

$$Mask_{ii} = \begin{cases} 1 & \text{se } i \leq r \text{ ou } i \geq P - r \\ 0 & \text{se } r < i < P - r \end{cases}$$

$$\bar{X}(t) = IDFT \{ DFT [X(t)] Mask \} \quad (5.8)$$

Sendo  $X(t)$  o sinal no instante  $t$ .

### Combinação de Sinais

Essa é uma técnica não linear para minimização do ruído. Duas amostras da mesma imagem são capturadas, transformadas para o domínio da frequência e combinadas para selecionar as regiões de cada amostra que têm menor ruído, gerando um novo sinal de alta fidelidade. Com essa técnica não há perda de informação.

### 5.2.3 Minimização do ruído espacial

Para tratar o ruído temporal os métodos analisados foram: a média móvel, a mediana e filtro Savitzky-Golay. Os dois primeiros podem ser técnicas polarizantes ou não-polarizantes).

#### Média Móvel

Uma porção de uma curva bruta é selecionada para calcular um único pixel da curva suavizada. O cálculo do pixel seguinte pode utilizar apenas uma porção da curva bruta (não-polarizante, Eq. 5.9) ou a porção já calculada da curva suavizada e o restante da curva bruta (polarizante, Eq. 5.10).

$$\bar{X}_i(t) = \frac{1}{\min(i + L_s, N) - \max(1, i - L_s) + 1} \sum_{k=\max(1, i-L_s)}^{\min(i+L_s, N)} X_k(t) \quad (5.9)$$

$$\bar{X}_i(t) = \frac{1}{\min(i + L_s, N) - \max(1, i - L_s) + 1} \left( \sum_{k=\max(1, i-L_s)}^{i-1} \bar{X}_k(t) + \sum_{k=i}^{\min(i+L_s, N)} X_k(t) \right) \quad (5.10)$$

Sendo  $X_i(t)$  o sinal bruto e  $\bar{X}_i(t)$  o sinal suavizado do pixel  $i$  no instante  $t$  e  $L_s$  o parâmetro de suavização. Note que  $2.L_s + 1$  elementos são utilizados no passo de suavização.

#### Mediana

Assim como na Média Móvel, uma janela de uma curva bruta é selecionada para calcular um único pixel da curva suavizada. Os valores dessa janela são ordenados e o valor do meio é a mediana, a janela consiste em um número ímpar de pontos. Esse método pode ser não-polarizante, Eq. 5.11, ou polarizante, Eq. 5.12.

$$\bar{X}_i(t) = \text{med} (X_{\max(1, i-L_s)}(t), X_{1+\max(1, i-L_s)}(t), \dots, X_{\min(i+L_s, N)}(t)) \quad (5.11)$$

$$\bar{X}_i(t) = \text{med} (\bar{X}_{\max(1, i-L_s)}(t), \dots, \bar{X}_{i-1}(t), X_i(t), \dots, X_{\min(i+L_s, N)}(t)) \quad (5.12)$$

Sendo  $X_i(t)$  o sinal bruto e  $\bar{X}_i(t)$  o sinal suavizado do pixel  $i$  no instante  $t$  e  $L_s$  o parâmetro de suavização. Note que a janela de suavização tem  $2.L_s + 1$  elementos.

### Filtro Savitzky-Golay de suavização

O filtro Savitzky-Golay de suavização foi utilizado para explorar a o fato de a curva SPR ser não-causal. O filtro calcula um ajuste polinomial local (de grau  $g$ ) em uma janela de pelo menos  $g + 1$  pontos considerados igualmente espaçados na janela. Esse filtro tem como principal vantagem preservar a distribuição do sinal (Savitzky e Golay, 1964). Para um filtro calculado com janela  $L_t$  e ordem  $g$  tem-se (5.13).

$$\bar{X}_i(t) = \frac{\sum_{j=-L_t}^{j=L_t} C_j X_{j+i}(t)}{N} \quad (5.13)$$

$$C_j = a_0 + a_1 z_j + a_2 z_j^2 + \dots + a_g z_j^g$$

$$z_j = \frac{X_{i+j} - X_i}{h}$$

$$a = (J^T J)^{-1} J^T Y \quad J \text{ é a matriz Jacobiana}$$

$$h = \theta_i - \theta_{i-1}$$

sendo:

$$a = [a_0 \quad a_1 \quad a_2 \quad \dots \quad a_g]$$

$$Y = [X_{i-L_t} \quad \dots \quad X_i \quad X_{i+L_t}]^T$$

### 5.2.4 Avaliação das técnicas

Do experimento adquirimos a curva já ruidosa, sendo difícil quantificar o ruído da imagem, de modo que calcular a melhoria que cada técnica impôs no sinal não é uma tarefa simples.

Para resolver esse problema foram simuladas curvas SPR para valores de índice de refração ( $n_3$ ) e espessura da camada sensível ( $d_3$ ) que variam de acordo com o sensorgrama da Figura 5.3. Sensorgramas estimados de experimentos com água e PBS realizados com o Spreeta.

Às curvas simuladas foi adicionado o ruído característico do equipamento. A caracterização das perturbações inerentes ao sistema foi realizada sobre 48 mil amostras da curvas adquiridas quando água deionizada e dessalinizada a  $19M\Omega$  (obtida por um filtro com luz ultra-violeta adquirido pelo laboratório) está presente na célula de fluxo. O ruído foi calculado como sendo: (1) A diferença de cada curva (2) a diferença das curvas experimental

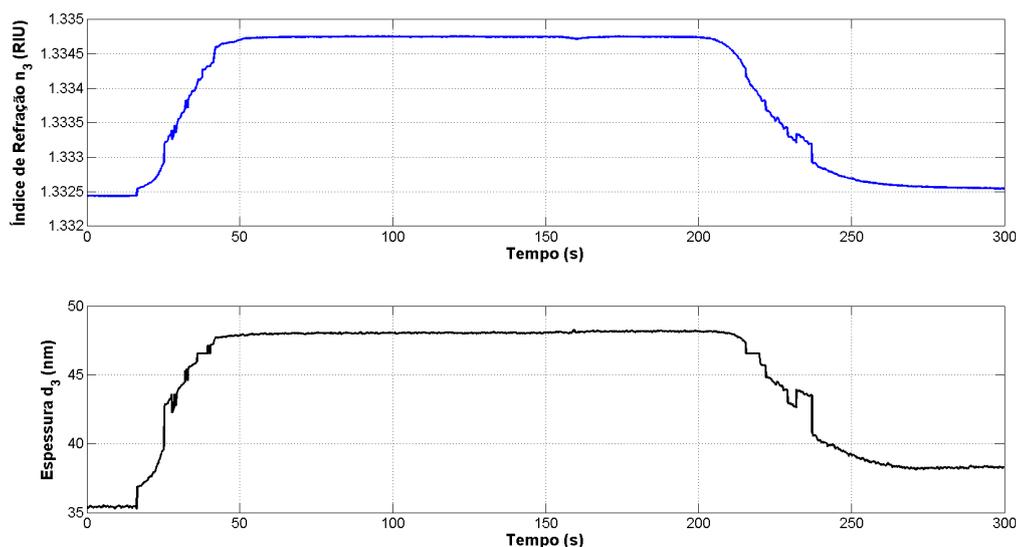


Figura 5.3: Sensorgramas estimados de experimentos com água e PBS realizados com o Spreeta.

e teórica e (3) o resultado de um filtro passa altas aplicado à curva. Um modelo de três camadas foi utilizado para calcular a curva teórica.

Como o sinal simulado original, antes do ruído, é conhecido, sua relação sinal ruído pode ser calculada por (5.14) e este parâmetro pode quantificar o quão melhor um método é em relação ao outro.

$$SNR = \frac{\int_{\theta_i}^{\theta_f} [\overline{X_\theta(t)}]^2 d\theta}{\int_{\theta_i}^{\theta_f} [\xi_\theta(t)]^2 d\theta} \quad (5.14)$$

Para o ruído temporal também foi utilizada o desvio padrão médio dos pixels no tempo para quantificar o ruído. A relação sinal ruído e desvio padrão médio alcançados com diferentes tamanhos de janela aplicadas aos algoritmos testados são apresentadas na Figura 5.4. As técnicas sem esquecimento alcançaram melhor relação sinal ruído. A utilização de janela deslizante ou de salto só têm desempenho diferente quando o tamanho da janela cresce. Crescimento este que não impõe aumento significativo de desempenho, mas requer maior nível de processamento e memória.

Como as técnicas utilizadas para remoção de ruído temporal são métodos lineares sua aplicação no sinal luminoso captado ou na curva SPR (sinal luminoso captado dividido ponto a ponto pela curva de referencia do ar) não gera resultados diferentes. Contudo as técnicas para ruído espacial devem ser analisadas para os dois casos por usa não-linearidade. Na

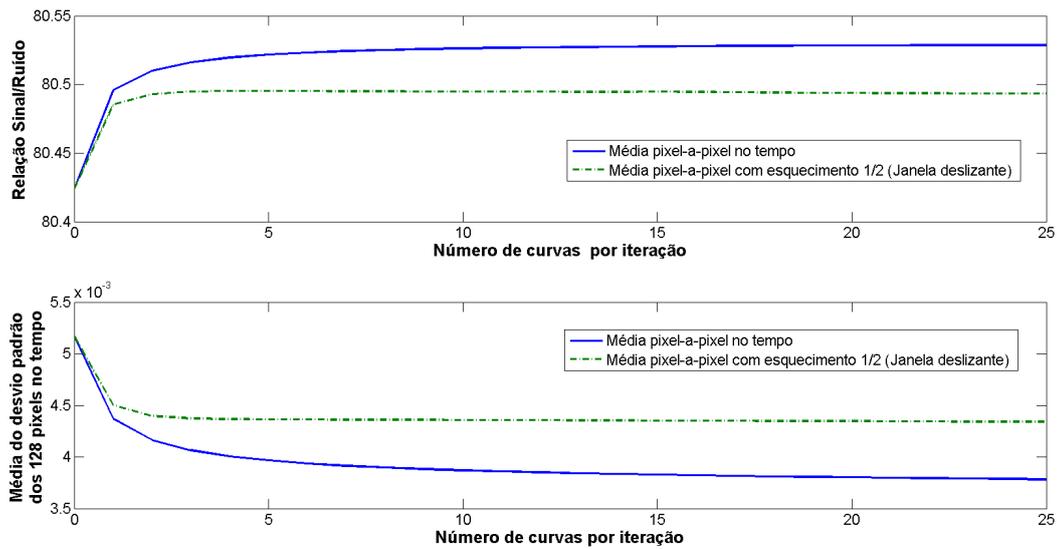


Figura 5.4: Comparação de diferentes técnicas de redução do ruído temporal. Os valores para  $L_t = 0$  correspondem à curva sem nenhum tratamento.

Figura 5.5 pode ser vista uma comparação dos métodos, em linhas contínuas os algoritmos foram aplicados ao sinal captado (tanto à curva de referência quanto à curva captada antes da divisão) e em linhas tracejadas algoritmos foram aplicados à curva SPR.

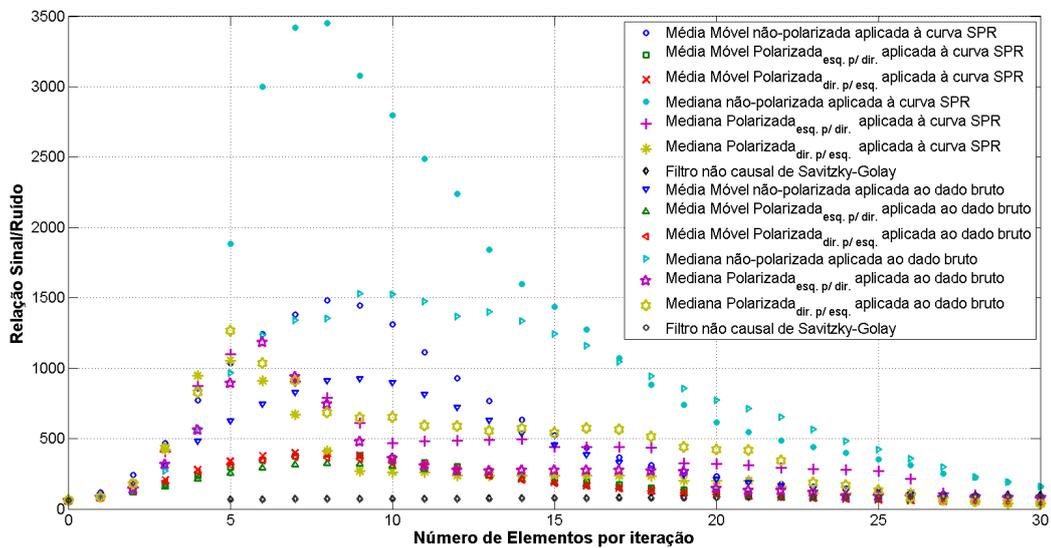


Figura 5.5: Comparação de diferentes técnicas de redução do ruído espacial aplicadas antes e depois de obter a curva SPR. Os valores para  $L_s = 0$  correspondem à curva sem nenhum tratamento. O filtro Savitzky-Golay não está definido quando o grau  $< 2L_s + 1$ .

Todos os métodos espaciais apresentaram um bom desempenho quando comparados aos

métodos temporais. O segundo aumentou a Relação Sinal Ruído (SNR) de 80,4 para 80,5. Já os métodos espaciais resultaram em uma SNR de 500 a 3500, a exceção do filtro Savitzky-Golay utilizando grau 5 no ajuste.

O melhor resultado foi alcançado com um mediana aplicada a curva SPR com  $L_s = 8$ , ou seja,  $2.L_s + 1 = 17$  elementos utilizados no passo de cálculo.

O filtro passa-baixas, apesar de depender de uma boa escolha da faixa de passagem, superou o método de combinação de sinais. Um banda de passagem muito estreita pode eliminar componentes fundamentais do sinal, não apenas ruído, de forma até a piorar a SNR do sinal. Já uma banda de passagem muito larga não filtra grande parte do ruído. O ponto ótimo para remoção de ruído foi alcançado para  $r = 3$ , quando houve maior minimização do ruído sem perda do sinal, ver Figura 5.6. Apesar de também ser um método linear sua aplicação antes ou depois da obtenção da curva SPR gera resultados diferentes pois o mesmo método é aplicado à curva de referência e a divisão não é linear quanto ao denominador. Contudo aplicar o tratamento após a obtenção da curva SPR produz melhores resultados, similar ao caso espacial.

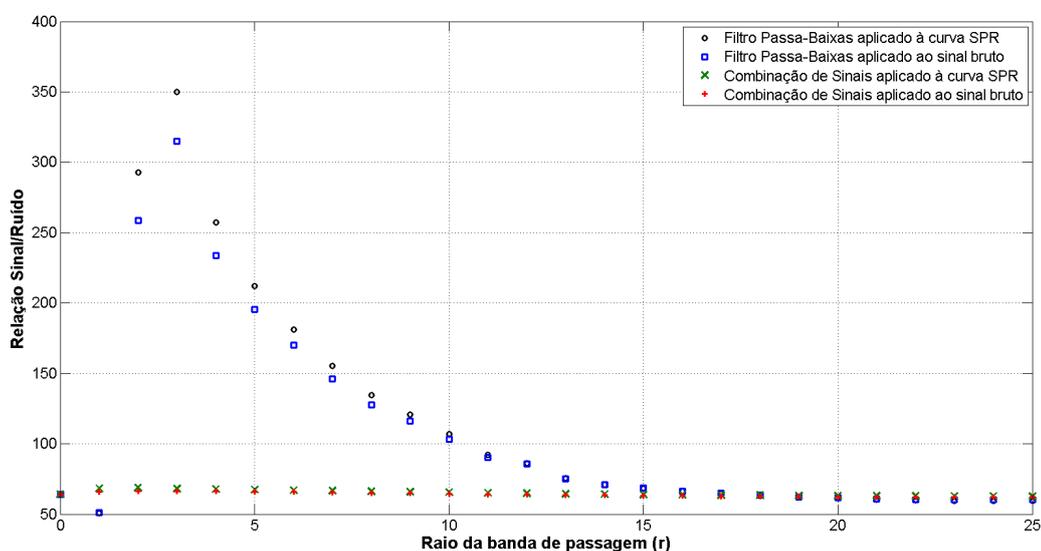


Figura 5.6: Comparação de diferentes técnicas de redução do ruído frequencial aplicadas antes e depois de obter a curva SPR.

No estudo acima todos os métodos foram aplicados ao mesmo sinal ruidoso. Contudo, a não linearidade de alguns métodos implica que a ordem de aplicação pode gerar resultados diferentes ou alterar o ruído remanescente de forma não linear de modo que o ponto ótimo de aplicação dos outros métodos não se conserva. Por isso um estudo de todas as arranjos das

técnicas de tratamento (espacial, frequencial e temporal) foram analisados a fim de encontrar a melhor combinação de técnicas na ordem correta.

O resultado dos diferentes arranjos de técnicas é apresentado na Figura 5.7. Nesta cada curva corresponde a um arranjo diferente (Temporal, Espacial, Frequencial, por exemplo). Cada arranjo tem uma combinação de técnicas que otimiza o resultado, esta técnica está explicitada na legenda em subscrito. e cada técnica tem um parâmetro  $L_s$ ,  $L_t$  ou  $r$  ótimo, também explicitado na legenda entre parênteses.

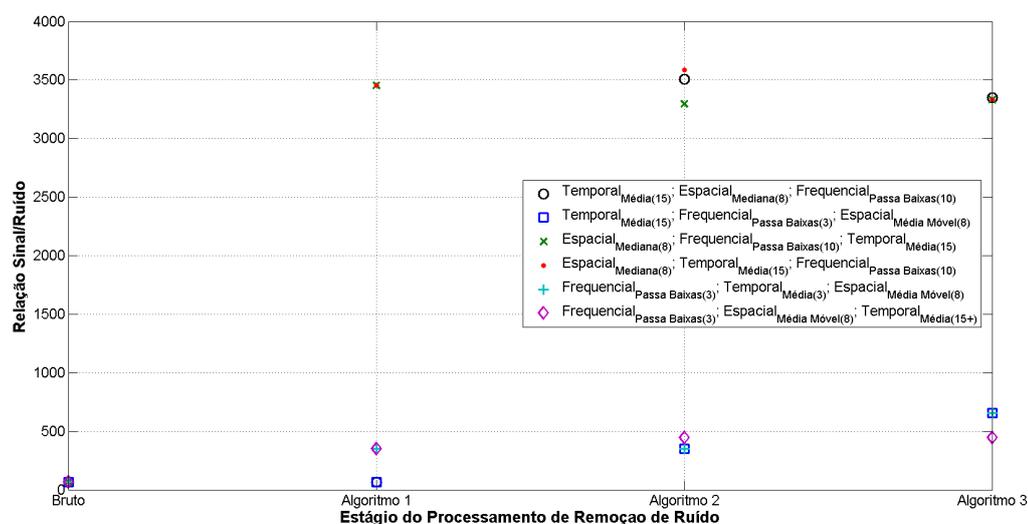


Figura 5.7: Estudo das possíveis combinações das técnicas de remoção de ruído. Na legenda: O tipo de ruído tratado, a técnica utilizada e o parâmetro que levou ao melhor resultado.

A não-linearidade da mediana trata o ruído frequencial de tal forma que a banda de passagem ótima do filtro passa-baixas passa a ser  $r = 10$ . A aplicação do filtro frequencial antes da suavização espacial também altera o ruído de modo que a média móvel passa a ser a técnica recomendada. No arranjo (Frequencial, Temporal, Espacial) a média dos sinais no tempo se mostrou mais adequada para  $L_t = 3$ . No arranjo (Frequencial, Espacial, Temporal) a relação sinal-ruído continua melhorando quando maior  $L_t$ , mas a diferença é pouco significativa.

O melhor resultado foi obtido com o arranjo (Temporal, Espacial, Frequencial), com a seguinte sequência de técnicas: Média com janela deslizante com  $L_t = 30$ ; Mediana com  $L_s = 8$ ; Filtro passa-baixas com  $r = 10$ . Apesar de ser pequena a melhoria conseguida com o método temporal, um aumento de 0,1 na SRN, sua influência no resultados da aplicação dos demais métodos foi expandida para um aumento de 34 na SRN. O resultado da aplicação

dos métodos em uma curva experimental pode ser visto na Figura 5.8

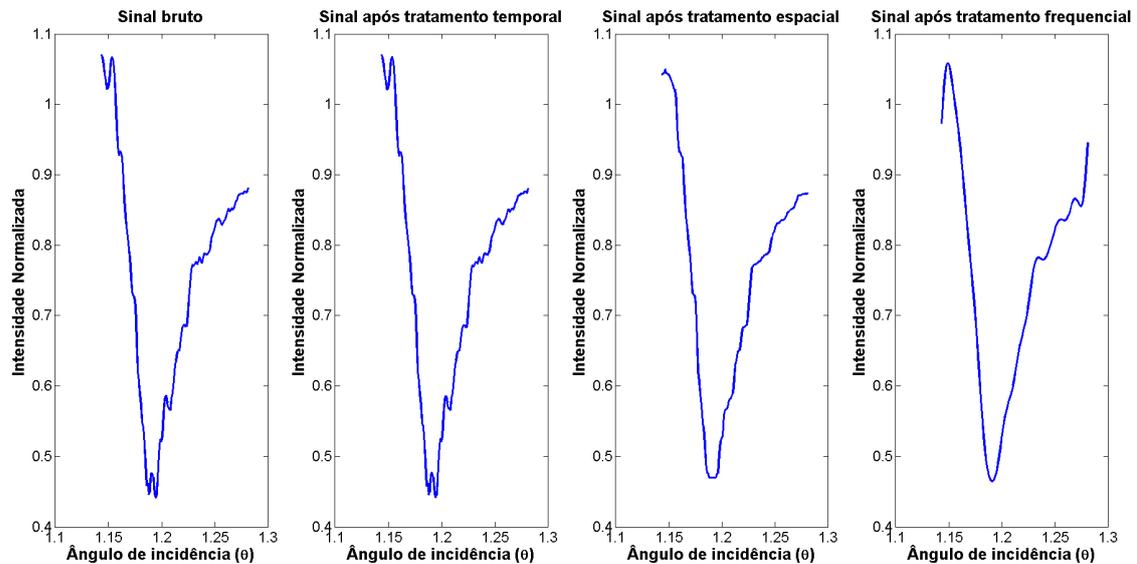


Figura 5.8: Resultado da sequência de pré-processamento da curva SPR na curva experimental. Da esquerda para a direita: curva bruta; após tratamento temporal; após tratamento espacial; após tratamento frequencial.

Houve uma perda de detalhes na curva pré-processada, Figura 5.8, quando se trata da profundidade (*dip*) da curva em troca de um mínimo ( $\theta_R$ ) bem definido e a segurança de que não há oscilação no nível da linha base, causando dúvidas no valor real da largura ( $\Gamma$ ), da assimetria ( $G$ ).

### 5.3 Considerações finais

O pré-processamento ótimo consiste em uma média de diferentes curvas, uma suavização por média e um filtro passa baixas aplicados nesta sequência. Esse arranjo de algoritmos implica em uma melhoria na relação sinal-ruído em quase 50 vezes.

O nível de processamento necessário é baixo. A simplicidade dos algoritmos os torna passível de serem implementados em nível de hardware, não acrescentando elementos ao sistema já que os sinais do controle do Spreeta são gerado por um FPGA. Esta implementação em nível de hardware garante menor tempo e processamento gastos na etapa de pré-processamento, inclusive para a transformada de Fourier (Milder, Franchetti, Hoe e Püschel, 2012), possibilitando maior sofisticação nas técnicas de processamento para extração dos parâmetros da curva e estimação das grandezas de interesse.

# 6

## Extração dos Parâmetros

O problema de extração do índice de refração e da espessura da camada sensível de modo simultâneo a partir da curva resposta característica do fenômeno SPR. Pode ser contemplado a partir de diferentes técnicas, inclusive analiticamente, contudo muitas delas esbarram em um problema de não unicidade da estimativa, faltando pelo menos um parâmetros para determinar qual a estimativa correta. Esta não unicidade gera discordâncias na literatura quanto à possibilidade de uma estimativa baseada unicamente na curva SPR sem alterações na instrumentação, como por exemplo duas fontes de luz de frequências diferentes, como apresentado no Estado da Arte no Capítulo 2.

Ao considerar o espalhamento espectral da luz e a morfologia da curva a solução para estimar  $n_3$  e  $d_3$  baseada em redes neurais se mostrou promissora e livre de do problema de não unicidade da estimativa.

### 6.1 Redes neurais

Para contemplar a dependência dos parâmetros morfológicos das curvas SPR às variáveis de interesse foram calculadas 10000 curvas através do modelo adotado. Essas curvas foram calculadas para cada uma das combinações de  $n_3$  variando de  $1,331RIU$  a  $1,34RIU$  com um passo de  $10^{-3}RIU$  e  $d_3$  variando de  $1nm$  a  $100nm$  a um passo de  $1nm$ . Cada um dos parâmetros morfológicos foram calculados para as 10000 curvas e apresentando em gráficos na Figura 6.1.

Na Figura 6.1 é possível perceber que, exceto a assimetria, há um padrão na variação da curva com as grandezas de interesse da camada sensível. Determinar um único padrão que

contemple simultaneamente todas as variáveis de um problema não-linear multi-variável pode ser uma tarefa complexa. A relação de cada variável com as demais torna qualquer técnica que determine estes padrões separadamente uma simplificação grosseira do problema. Para solucionar este problema algumas técnicas de identificação de parâmetros foram utilizadas, mas a única que superou o problema e não unicidade de resposta foi uma rede neural treinada para identificar e reproduzir o padrão de variação dos parâmetros morfológicos das grandezas a serem estimadas.

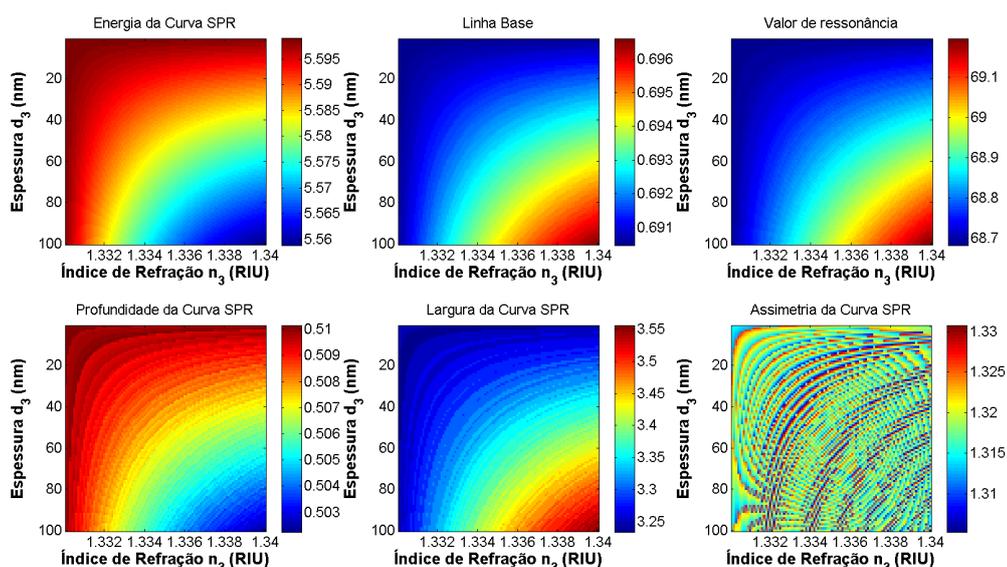


Figura 6.1: Variação dos parâmetros morfológicos da curva SPR com os valores de  $n_3$  e  $d_3$ . Foram simuladas 10.000 curvas com  $n_3$  variando de 1,3 a 1,4 a um passo de  $10^{-3}$  e  $d_3$  variando de  $1nm$  a  $100nm$  a um passo de  $1nm$  calculados os parâmetros morfológicos para cada das curvas.

Inicialmente uma rede neural foi treinada e testada sem a inclusão de qualquer conhecimento prévio. Uma rede de três camadas, sendo uma camada de entrada, uma de saída e uma oculta, treinada utilizando o algoritmo *backpropagation* com função de ativação sigmóide. A rede mais simples obtida possui 20 neurônios na camada oculta com um erro médio na estimativa da espessura da ordem de 4% nas transições de substâncias na célula de fluxo, ver Figura 6.2.

A inserção de conhecimentos da resposta SPR estudados no Capítulo 3 na rede neural pode aumentar a complexidade do algoritmo de treinamento como também simplificar sua aplicação. Simplificação esta que permite sua implementação em um sistema embarcado e assegura sua convergência. Assim este capítulo iniciará com uma apresentação e formalização

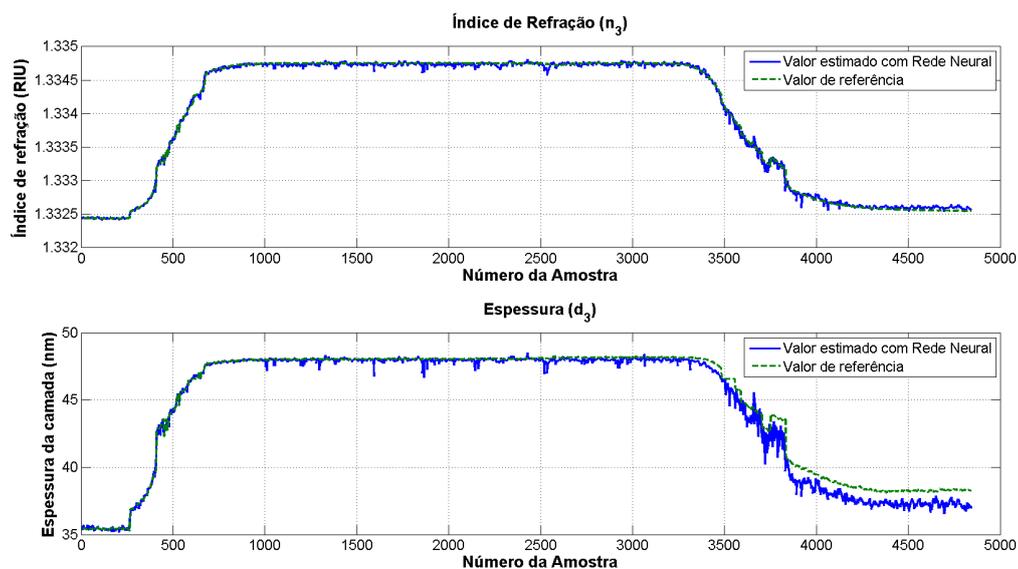


Figura 6.2: O melhor resultado de uma rede neural com ativação sigmóide e treinamento *backpropagation*.

do conhecimento a ser inserido.

Em seguida a rede escolhida e implementada será apresentada antes de analisarmos seu resultado.

## 6.2 Informações morfológicas

As informações que dispomos da curva SPR se baseiam no estudo de curvas teóricas apresentado no Capítulo 3. No estudo foram analisadas seis parâmetros da morfologia da curva: energia, profundidade, valor de ressonância, valor da linha base, largura e assimetria. Em todos os casos podemos resumir a informação útil à rede em crescimento e concavidade do parâmetro tratado.

A assimetria da curva não foi considerada na rede neural implementada por independer das variáveis que deseja-se determinar, ver Figuras 3.8 e 3.12. Os demais parâmetros variaram monotonamente tanto para variações de  $n_3$  quanto para variações de  $d_3$ , contudo as variações com  $n_3$  são aparentemente lineares, principalmente quando considera-se que essa grandeza varia na ordem de  $10^{-2}RIU$ . Nesta seção encontram-se resumidas as informações sobre o índice de refração (Tabela 6.1) e a espessura (Tabela 6.2) da camada sensível.

Tabela 6.1: Informações a serem utilizadas no treinamento da Rede Neural para o índice de refração  $n_3$

Parâmetro	Crescimento	Concavidade	Figura
Energia ( $E$ )	Decrescente ( $\partial E/\partial n_3 < 0$ )	—	Figura 3.6
Ângulo de Ressonância ( $\theta_R$ )	Crescente ( $\partial \theta_R/\partial n_3 > 0$ )	—	Figura 3.7
Profundidade ( $dip$ )	Crescente ( $\partial dip/\partial n_3 > 0$ )	—	Figura 3.7
Largura ( $\Gamma$ )	Decrescente ( $\partial \Gamma/\partial n_3 < 0$ )	—	Figura 3.8
Assimetria ( $G$ )	Crescente ( $\partial G/\partial n_3 > 0$ )	—	Figura 3.8

Tabela 6.2: Informações a serem utilizadas no treinamento da Rede Neural para a espessura  $d_3$

Parâmetro	Crescimento	Concavidade	Figura
Energia ( $E$ )	Decrescente $\partial E/\partial n_3 < 0$	Côncava $\partial^2 E/\partial n_3^2 < 0$	Figura 3.10
Ressonância ( $\theta_R$ )	Crescente $\partial \theta_R/\partial n_3 > 0$	Convexa $\partial^2 \theta_R/\partial n_3^2 > 0$	Figura 3.11
Profundidade ( $dip$ )	Crescente $\partial dip/\partial n_3 > 0$	Convexa $\partial^2 dip/\partial n_3^2 > 0$	Figura 3.11
Largura ( $\Gamma$ )	Decrescente $\partial \Gamma/\partial n_3 < 0$	Côncava $\partial^2 \Gamma/\partial n_3^2 < 0$	Figura 3.12
Assimetria ( $G$ )	Crescente $\partial G/\partial n_3 > 0$	Convexa $\partial^2 G/\partial n_3^2 > 0$	Figura 3.12

### 6.3 Utilização do conhecimento prévio

A rede neural escolhida para solucionar o problema foi a rede neural com múltiplos conhecimentos prévios (*Multiple-prior-knowledge neural network for industrial processes* - MPKNN) (Haichuan, Hongye, Lei, Yong e Gang, 2010). Esta rede tem obrigatoriamente três camadas, cada camada pode ter um número diferentes de neurônios. As camadas de entrada e saída têm número de neurônios equivalente ao número de variáveis de entrada e saída respectivamente.

A MPKNN tem sua camada oculta com neurônios lineares e neurônios não-lineares, de forma contemplar o problema de ambos os modos. O erro de treinamento desta rede inclui (6.1) como um critério para avaliar os pesos das conexões internas (entrada-oculta e oculta-saída). Inclui também (6.2) como critério para avaliar as conexões diretas (entrada para saída). A minimização destes erros durante o treinamento garante que os pesos redundantes serão zerados (eliminados), implicando na rede mais simples possível. Uma estrutura da rede pode ser vista a Figura 6.3, na qual as variáveis de entrada  $x_i, \dots, x_n$  são os parâmetros morfológicos da curva: energia, valor da linha base, valor de ressonância, profundidade e largura, todos normalizados de acordo com (3.2).

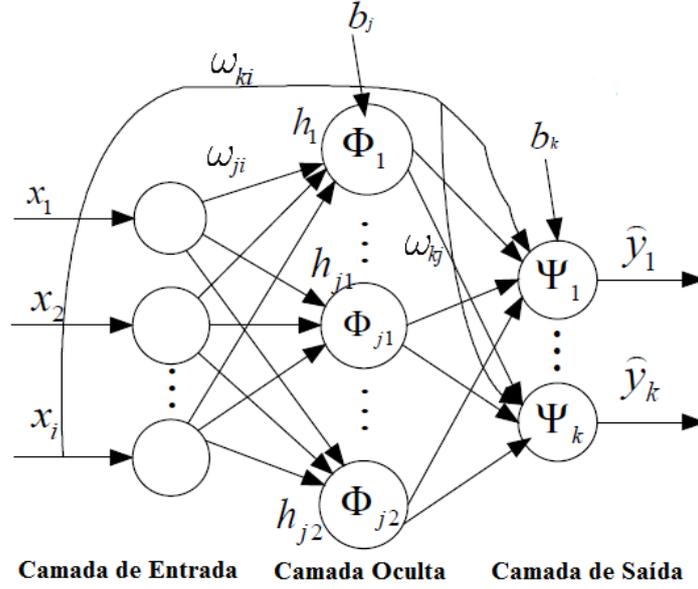


Figura 6.3: Estrutura da rede neural com múltiplos conhecimentos prévios. Na camada escondida os neurônios até  $j1$  são não-lineares e os demais são lineares.

$$E_{\omega}^c = n1 \log \left( \sum |\omega_{ji}| \right) + n2 \log \left( \sum |\omega_{kj}| \right) \quad (6.1)$$

$$E_{\omega}^d = \frac{1}{2} d \log \left( \sum \omega_{ki}^2 \right) \quad (6.2)$$

sendo  $n1$  o número de conexões da camada de entrada para a camada escondida e  $\omega_{ji}$  o peso dessas conexões;  $n2$  o número de conexões da camada oculta para a camada de saída e  $\omega_{kj}$  o peso dessas conexões;  $d$  o número de conexões da camada oculta para a camada de saída e  $\omega_{ik}$  o peso dessas conexões.

A parte não-linear da rede tem uma função sigmoide como função de ativação:

$$\Phi_{j1}(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}}. \quad j1 = 1, 2, \dots, m$$

e a parte linear tem como ativação:

$$\Phi_{j2}(x) = x. \quad j2 = m + 1, \dots, j$$

Ou seja, na saída da camada oculta tem-se:

$$h_{j1} = \Phi_{j1} \left( \sum_i x_i \omega_{j1i} + b_{j1} \right)$$

$$h_{j2} = \sum_i x_i \omega_{j2i} + b_{j2}$$

sendo  $x_i$  o dado de entrada da rede.

E o resultado da rede e calculado por:

$$y_k = \sum_{j1} \left[ \Phi_{j1} \left( \sum_i x_i \omega_{j1i} + b_{j1} \right) \omega_{kj1} \right] + \sum_{j2} \left[ \left( \sum_i x_i \omega_{j2i} + b_{j2} \right) \omega_{kj2} \right] + \sum_i \omega_{ki} x_i + b_k \quad (6.3)$$

sendo  $y_k$  o dado de saída da rede. O erro é calculado em batelada, dado por:

$$SSE = \sum_a^A \sum_s^S (y_T - y_R)^2,$$

sendo  $A$  número de amostras para treinamento e  $S$  o número de saídas da rede,  $y_T$  a saída da rede em treinamento e  $y_R$  o dado de saída do conjunto de treinamento.

O conhecimento prévio é incluído na rede através das limitações do treinamento:

$$\begin{aligned} \frac{\partial y_k}{\partial x_i} > 0 \text{ (Crescente)} & \quad \text{ou} & \quad \frac{\partial y_k}{\partial x_i} < 0 \text{ (Decrescente)} \\ \frac{\partial^2 y_k}{\partial x_i^2} > 0 \text{ (Côncavo)} & \quad \text{ou} & \quad \frac{\partial^2 y_k}{\partial x_i^2} < 0 \text{ (Convexo)} \end{aligned}$$

sendo:

$$\begin{aligned} \frac{\partial y_k}{\partial x_i} &= \sum_{j1} \omega_{j1i} h_{j1} (1 - h_{j1}) \omega_{kj1} + \sum_{j2} \omega_{j2i} \omega_{kj2} + \omega_{ki} \\ \frac{\partial^2 y_k}{\partial x_i^2} &= \sum_{j1} \omega_{j1i}^2 h_{j1} (1 - h_{j1}) (1 - 2h_{j1}) \omega_{kj1} \end{aligned}$$

Então um algoritmo de otimização não-linear com condições de fronteira é utilizado par encontrar os pesos que minimiza  $SSE + \gamma(E_\omega^c + E_\omega^d)$ . Sendo  $\gamma$  o fator de regularização para definir o nível de prioridade dos critérios com relação ao outro. Para o treinamento da rede foi escolhido o algoritmo de programação quadrática sequencial (*Sequential Quadratic Programming - SQP*) (Nocedal e Wright, 1999).

## 6.4 Definição da rede neural de múltiplos conhecimentos prévios

O desempenho da rede neural pode ser influenciado por três fatores não definidos: (i) o fator de regularização ( $\gamma$ ); (ii) o número de neurônios da camada oculta; (iii) a topologia da rede. Um estudo desses fatores sera realizado nesta seção.

Antes de iniciar o treinamento os dados de entrada e de saída são ambos tratadas para ter média nula e desvio unitário de acordo com (3.2).

Tabela 6.3: Erro médio da rede neural para diferentes valores de  $\gamma$ 

Fator de regularização $\gamma$	Erro Percentual Médio	
	$n_3$	$d_3$
10	0,0054	1,1098
5	0,0014	0,9297
<b>2</b>	<b>0,0015</b>	<b>0,8631</b>
1	0,0013	0,9135
0,5	0,0013	0,9169
0,25	0,0059	1,0371

Após a aplicação da rede neural o processo inverso da normalização deve ser calculado para obter o dado de interesse.

Uma suavização também deve ser aplicada ao resultado da rede neural para remover variações da estimativa.

#### 6.4.1 Escolha do fator de regularização ( $\gamma$ )

Para uma análise da influência do fator de regularização o treinamento foi repetido até que a média dos resultados pare de variar significativamente.

A rede neural foi treinada para  $\gamma = 10; 5; 2; 1; 0,5; 0,25$ , com o número de neurônios na camada oculta fixo em dez, sendo metade linear e metade não linear, e com os dados da curva obtidos com linha base dinâmica e uso da técnica de primeiro momento. A Tabela 6.3 apresenta o erro médio obtido com cada rede. Apesar de uma diferença pequena, os valores  $\gamma = 1$  e  $\gamma = 2$  apresentam os menores desvios. O valor que minimiza o erro da espessura estimada foi escolhido como sendo o mais apropriado, pois o desvio desta grandeza é muito maior que o desvio de  $n_3$ .

#### 6.4.2 Escolha do número de neurônios ocultos

Utilizando o mesmo critério de Monte Carlo foram realizados treinamentos para redes com seis, oito e dez neurônios na camada oculta. Contudo não houve diferença significativa, obtendo rápida convergência do resultado. Isso pode ser explicado pelos critérios de poda incluídos no algoritmo através de (6.1) e (6.2). Dessa forma a rede com seis neurônios na camada oculta foi escolhida como a mais apropriada por ser mais simples, reduzindo consideravelmente o número de pesos da rede, agilizando o treinamento e facilitando implementação da rede em sistema embarcado.

Tabela 6.4: Erro percentual médio erro percentual máximo da rede neural para combinações de diferentes técnica no cálculo dos parâmetros morfológicos.

Técnicas		Erro Médio (%)		Erro Máximo (%)		Figura
Linha Base	Busca do Mínimo	$n_3$	$d_3$	$n_3$	$d_3$	
<b>Dinâmica</b>	<b>1º Momento</b>	<b>0,0015%</b>	<b>0,8631%</b>	<b>0,0160%</b>	<b>1,1423%</b>	<b>6.4</b>
Dinâmica	Min. $P(\theta)$	0,0058%	1,0901%	0,0181%	1,7817%	6.5
FWHM	1º Momento	0,0068%	1,3163%	0,0228%	2,6901%	6.6
FWHM	Min. $P(\theta)$	0,0082%	3,6581%	0,0252%	5,4979%	6.7

O número de pesos da rede é dado por:

$$nPesos = nOculto(nEntrada + nSaida + 1) + nSaida(1 + nEntrada)$$

sendo  $nPesos$ ,  $nOculto$ ,  $nEntrada$  e  $nSaida$  o número de pesos, de neurônios nas camadas oculta, de entrada e de saída respectivamente. Assim para  $nOculto = 6, 8, 10$  tem-se  $nPesos = 92, 76, 60$  a serem otimizados.

### 6.4.3 Escolha das variáveis de treinamento

Quatro opções de treinamento da rede foram testadas contemplando todas as combinações das técnicas de linha base (dinâmica e FWHM) e busca do mínimo (ajuste polinomial e primeiro momento). A rede foi treinada e testada até que a variação de seu erro médio de treinamento fosse menor que  $\Delta\overline{SSE} < 10^{-2}$ .

As transições no resultado da rede se devem ao uma simulação de transição de substâncias na célula de fluxo do bio-sensor. No caso a transição ocorre de uma substância **A** com índice de refração próximo à água, mas com camada formada, para uma substância **B** com índice de refração 0,0022RIU a mais. Os resultados foram analisados através da comparação com o valor de referência utilizado para gerar as curvas tratadas pela rede. A Tabela 6.4 compara os resultados de cada topologia e os relaciona à uma apresentação gráfica da estimação. O melhor resultado foi obtido com a utilização das técnicas de linha base dinâmica e primeiro momento para o cálculo dos parâmetros morfológicos. Esse resultado obteve erro máximo de 1,1423% para a estimação da espessura, comprovando a superioridade desta rede à rede sem uso de conhecimentos prévios que obteve erro de 3,6030% para estimar a mesma grandeza.

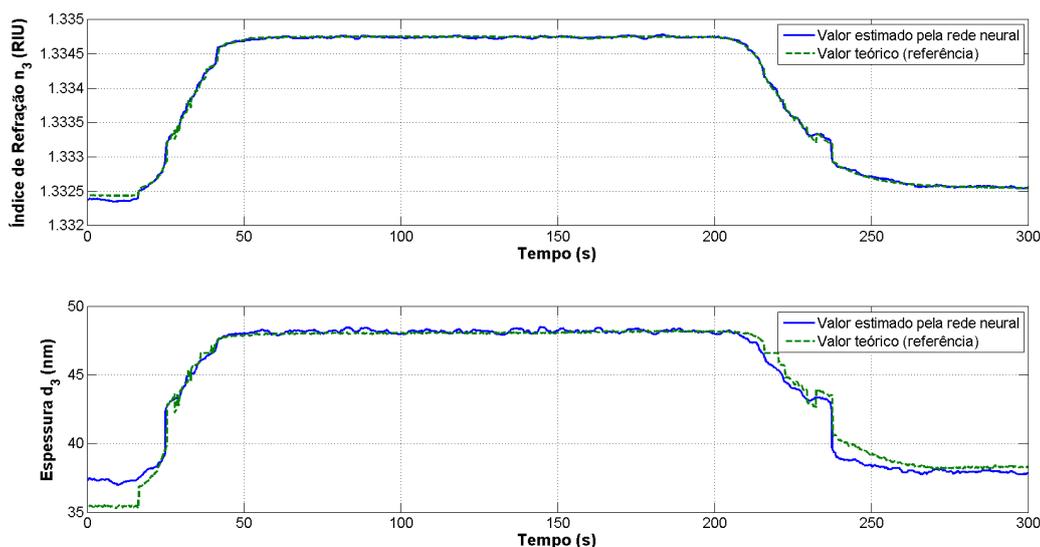


Figura 6.4: Resultados suavizados da utilização um ajuste de curvas baseado em rede neural. Para ajuste da rede foram utilizados os parâmetros morfológicos da curva calculados com base em uma linha de base dinâmica e na técnica do primeiro momento (centróide).

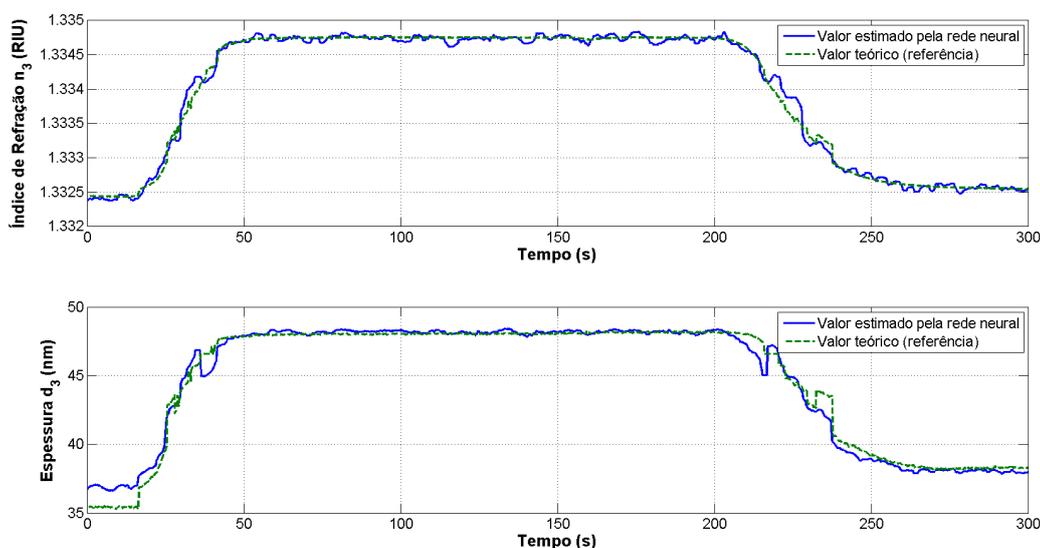


Figura 6.5: Resultados suavizados da utilização um ajuste de curvas baseado em rede neural. Para ajuste da rede foram utilizados os parâmetros morfológicos da curva calculados com base em uma linha de base dinâmica e na técnica de ajuste polinomial.

## 6.5 Considerações Finais.

A solução encontrada para estimar o índice de refração e a espessura da camada sensível apresentou resultados com baixo erro se mostrando eficaz. É uma solução viável dado a

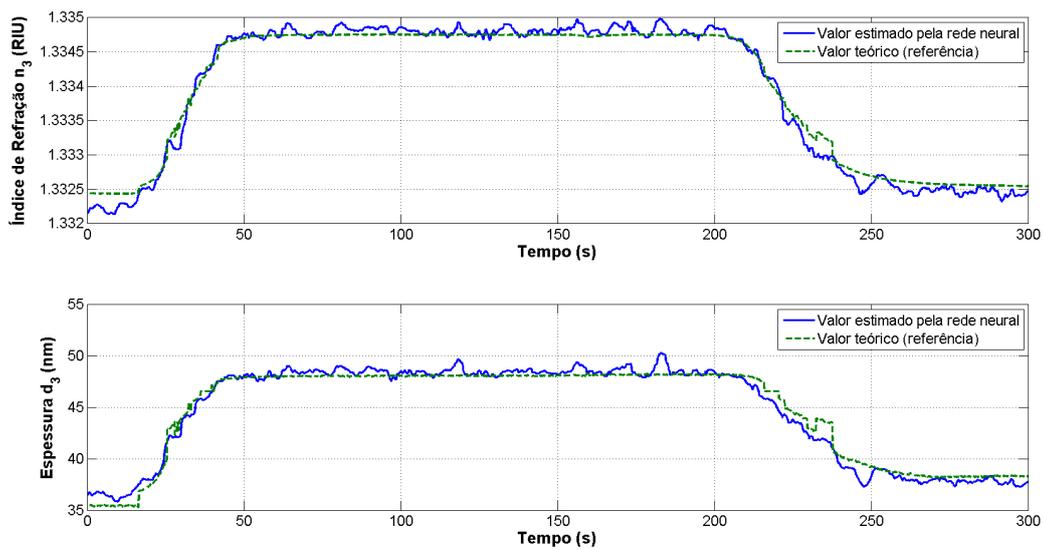


Figura 6.6: Resultados suavizados da utilização um ajuste de curvas baseado em rede neural. Para ajuste da rede foram utilizados os parâmetros morfológicos da curva calculados com base em uma linha de base FWHM e na técnica do primeiro momento (centróide).

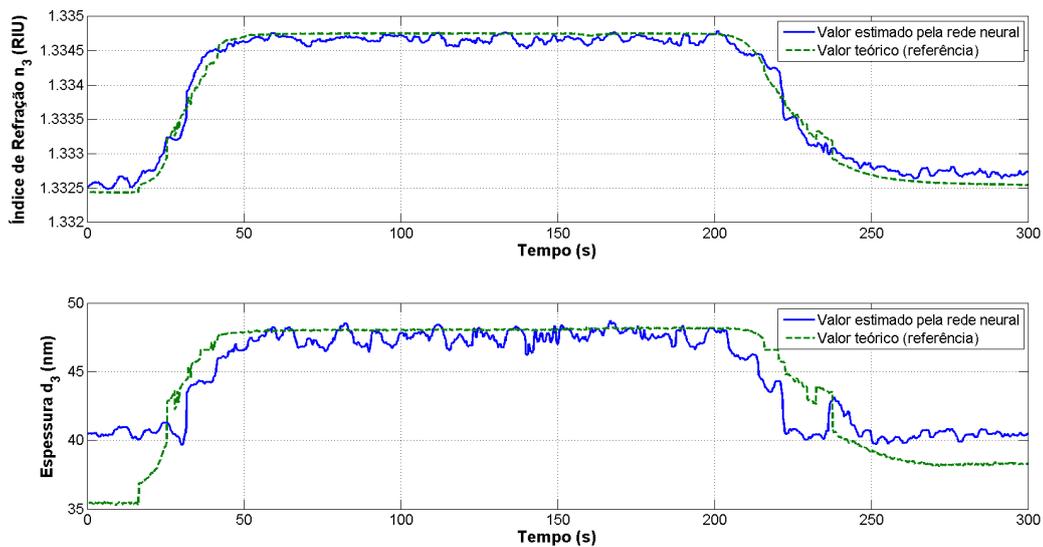


Figura 6.7: Resultados suavizados da utilização um ajuste de curvas baseado em rede neural. Para ajuste da rede foram utilizados os parâmetros morfológicos da curva calculados com base em uma linha de base FWHM e na técnica de ajuste polinomial.

simplicidade de implementação da rede com baixo esforço computacional, sendo possível até mesmo sua implementação em nível de hardware.

Contudo a rede precisa ser treinada e esta etapa envolve dois problemas: (i) a etapa

de treinamento requer um alto esforço computacional, esta etapa envolve a otimização de 60 variáveis (para seis neurônios na camada oculta) com quinze restrições não-lineares; (ii) a necessidade de dados para treinamento: a camada sensível normalmente é desconhecida no complexo de camadas, de forma que nem sempre ter-se-á disponível as informações para cálculo do erro no passo de treinamento.

Para ter-se uma dimensão do erro gerado pelo problema (ii), uma rede neural foi treinada com dados simulados sem a adição do ruído e aplicada a dados simulados com a adição do ruído, ver Figura 6.8. Esse procedimento ilustra o caso de uma rede neural treinada com dados simulados e aplicada a dados experimentais, como a rede da Figura 6.9. Os dados experimentais estimados com a rede neural fazem sentido do ponto de vista da ordem de grandeza e da estabilidade e continuidade dos dados. O treinamento da rede não considerou o modelo de três camadas para a água ( $d_3 = 0$ ), de modo que a não nulidade da espessura quando há água na célula de fluxo é um erro esperado. Ainda pode-se ressaltar o desvio de  $3 \times 10^{-3}$  do valor estimado de  $n_3$  para a água e o valor teórico utilizado para a mesma no meio  $n_4$ , por não ser a mesma substância (índices de refração diferentes) não é absurdo estimar a formação de uma camada de espessura  $d_3$ . Contudo novos treinamentos devem ser realizados incluindo novas restrições, espessura não negativa por exemplo, e novos valores experimentais da água. Essa inclusão também facilita a calibração do bio-sensor. Uma forma de verificar a coerência dos valores estimados foi calcular novas curvas simuladas à partir dos valores estimados. As curvas simuladas e as curvas experimentais obtiveram valores morfológicos compatíveis.

Este foi o resultado de uma rede treinada com valores simulados e aplicadas a valores experimentais, ou seja, mais uma fonte de erro. Uma ampliação da base de dados para possibilitar treinamento da rede neural com dados experimentais pode minimizar este erro.

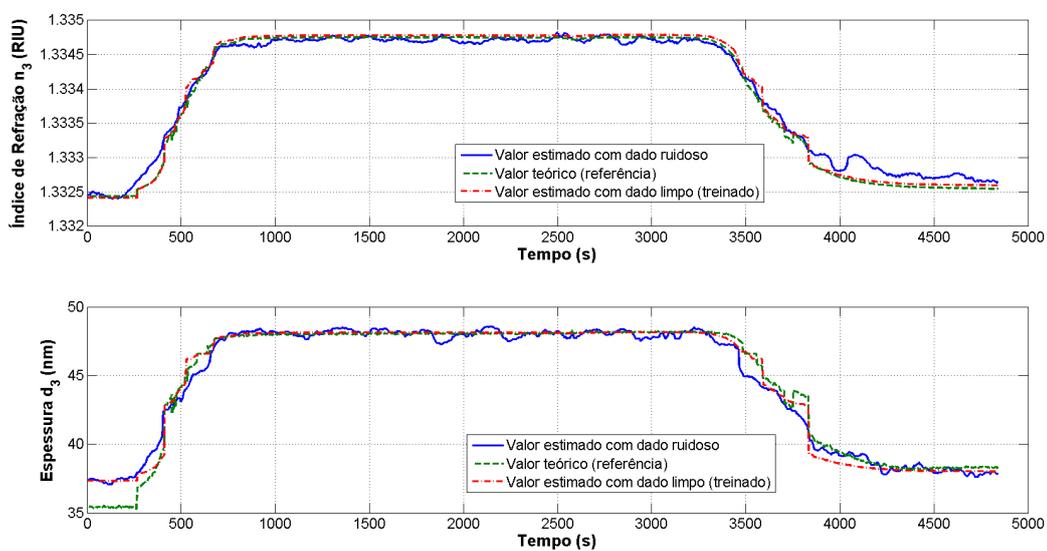


Figura 6.8: Resultado de rede neural treinada com curvas simuladas sem ruído e aplicada a curvas simuladas com ruído.

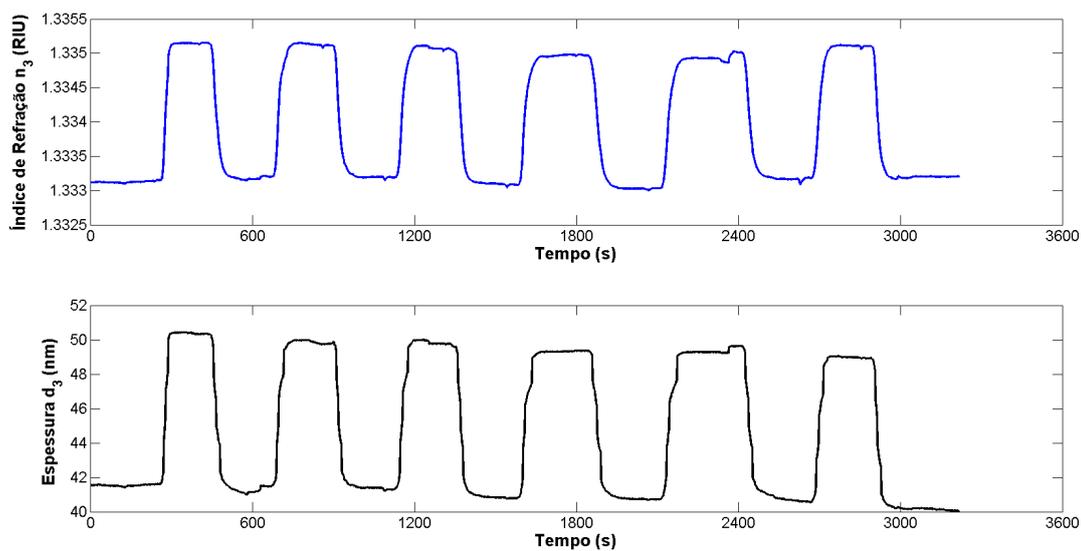


Figura 6.9: Resultados obtidos com a rede neural aplicada aos dados experimentais.

# 7

## Conclusões e Perspectivas

### 7.1 Conclusões

A inclusão do espalhamento espectral da luz no modelo de simulação resultou em uma curva simulada mais próxima da curva experimental. Esta proximidade se confirma tanto quando compara-se a curva ponto a ponto quando compara-se seus parâmetros morfológicos. Contudo essa consideração implica em uma perda de sensibilidade da curva com o índice de refração e a espessura da camada sensível.

A sensibilidade dos parâmetros morfológicos da curva (energia, valor da linha base, condição de ressonância, profundidade, largura e assimetria) à variações da espessura e do índice de refração da camada sensível foi estudada observando-se monotonicidade na maioria dos casos. Para variações da espessura também observou-se uma concavidade bem definida da curva.

O módulo para aquisição de dados experimentais também foi aprimorado. Ajustando os sinais de controle enviados ao Spreeta para promover o funcionamento ótimo dos componentes de excitação da fenômeno e de captura da luz refletida. Estes ajustes maximizam o desempenho do bio-sensor reduzindo o ruído da curva resultante.

No pré-processamento dos dados para minimização do ruído há influência da escolha dos algoritmos, da janela de amostras utilizada em cada algoritmo e da sequência dos algoritmos. Para o *Spreeta<sup>TM</sup> Evaluation Kit* de resolução  $1 \times 128$ , a escolha ótima é a aplicação de uma média de janela deslizante de 15 curvas, em seguida uma mediana não polarizada com janelas de 8 pontos em volta do valor suavizado e um filtro passa-baixas de  $r = 10$ .

A observação de um aparente padrão no comportamento das curvas SPR com variações da camada sensível permitiram o uso de redes neurais. A princípio uma rede neural treinada apenas com dados de entrada e saída apresentou resultados promissores. A adição de conhecimento prévio à rede reduziu o número de neurônios necessários, mas aumentou a complexidade de treinamento. A proximidade da curva estimada e a de referência também aumentou, reduzindo o erro médio de 4% para menos de 1%.

Contudo a etapa de treinamento ainda é um problema. Além da necessidade de esforço computacional o treinamento requer dados prévios de entrada e saída que são de difícil aquisição. Os dados simulados com ruído são um parâmetro aceitável para treinar a rede neural a ser aplicada a dados experimentais. Os valores de espessura e índice de refração estimados com a rede neural aplicada a dados experimentais estão dentro do esperado e a curva simulada com estes valores tem o ângulo de ressonância próximo ao mesmo ângulo da curva experimental.

Por falta de uma base de dados experimental mais completa a exatidão dos valores estimados ainda não foi quantificada. Contudo o trabalho aponta para a existência de uma solução para o problema ao contemplar o espalhamento espectral da luz na simulação e analisar-se a morfologia da curva. Contribuindo para elucidar a discussão existente na literatura sobre a possibilidade de estimação do índice de refração e da espessura da camada sensível em um único passo de medição.

## 7.2 Trabalhos futuros

Como possíveis continuações desta pesquisa tem-se:

- Aprimorar a rede neural através da adição de mais restrições de treinamento, bem como ampliar a abrangência dos dados de treinamento curvas experimentais.
- Ampliar a base experimental de dados a fim de confirmar a exatidão dos valores estimados.
- Aplicar o estudo ao modo de interrogação por comprimento de onda, explorando suas vantagens.
- Retroceder às equações de Maxwell para estudar o fenômeno da ressonância de plasma de superfície sem as simplificações impostas pelo modelo de Fresnel.

- Ampliar a sofisticação do bio-sensor SPR a fim de dispensar a análise de sua resposta por um especialista.
- Possibilitar a preparação da lâmina bio-sensora com o menor custo possível através da determinação com exatidão do momento em que a formação é finalizada.
- Identificar deterioração na camada sensível previamente preparada para uso específico
- Utilizar e comparar diferentes técnicas de estimação de parâmetros para solucionar o mesmo problema através a morfologia da curva SPR.

# Referências Bibliográficas

- de Bruijn, H. E.; Altenburg, B. S.; Kooyman, R. P. e Greve, J. (1991) Determination of thickness and dielectric constant of thin transparent dielectric layers using surface plasmon resonance, *Optics Communications*, **82**(5-6):425–432.
- Chinowsky, T. M. e Yee, S. S. (1998) Quantifying the information content of surface plasmon resonance reflection spectra, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (51):321–330.
- Chinowsky, T. M.; Jung, L. S. e Yee, S. S. (1999) Optimal linear data analysis for surface plasmon resonance biosensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (54):89–97.
- Chyou, J.-J.; Chu, C.-S.; Chien, F.-C.; Lin, C.-Y.; Yeh, T.-L.; Hsu, R. C. e Chen, S.-J. (2006) 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*, (Vol. 45, No. 23):6038–6044.
- D., B.; Zybin, A.; Horvatic, V.; Grunwald, C. e Niemax, K. (2007) Differential surface plasmon resonance imaging for high throughput bioanalysis, *Analytical Chemistry*, **79**:702–709.
- Elkind, J.; Stimpson, D.; Strong, A. A.; Bartholomew, D. e Melendez, J. (1999) Integrated analytical sensors: the use of the TISPR-1 as a biosensor, *Sensors and Actuators B*, **54**:182–190.
- Filho, C. A. S. (2006) Dissertação de Mestrado: Desenvolvimento de um Sistema Eletrônico de Aquisição e Processamento para Biosensores., Dissert. de Mestrado, UFCG - Universidade Federal de Campina Grande.
- Filho, C. A. S.; Lima, A. M. N.; Moreira, C. S.; Thirstrup, C. e Neff, H. (2010) Line shape analysis and extended instrumental operation of surface plasmon resonance sensors, *Plasmonics*, (5):259–266.

- Haichuan, L.; Hongye, S.; Lei, X.; Yong, G. e Gang, R. (2010) Multiple-prior-knowledge neural network for industrial processes, In: *Automation and Logistics (ICAL), 2010 IEEE International Conference on*, pp. 385 –390.
- Haykin, S., ed. (2001) *Redes Neurais Princípios e prática*, Bookman, Porto Alegre.
- Homola, J. (1997) On the sensitivity of surface plasmon resonance sensors with spectral interrogation, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **41**(1-3):207–211.
- Homola, J. (2003) Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Anal Bioanal Chem*.
- Homola, J.; Koudela, I. e Yee, S. S. (1999) Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **54**(1-2):16 – 24.
- Johnson, P. B. e Christy, R. W. (1972) Optical constants of the noble metals, *Physical Review B*, **6**(12).
- Johnston, K. S.; Karlsen, S. R.; Jung, C. C. e Yee, S. S. (1995) New analytical technique for characterization of thin films using surface plasmon resonance, *Materials Chemistry and Physics*, **42**(4):242 – 246.
- Kooyman, R.; Kolkman, H.; Gent, J. V. e Greve, J. (1988) Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations, *Analytica Chimica Acta*, **213**(0):35 – 45.
- Koyo e Watanabe (2012) Sensitivity optimization of surface plasmon sensors for detection of intermediate layers, *Sensors and Actuators A: Physical*, **173**(1):36 – 40.
- Kretschmann, E. e Raether, H. (1968) Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light, *Z. Naturforsch*, pp. 2135–2136.
- Kroese, D. P.; Taimre, T. e Botev, Z. I., eds. (2011) *Handbook of Monte Carlo Methods*, John Wiley & Sons.
- Liang, H.; Miranto, H.; Granqvist, N.; Sadowski, J. W.; Viitala, T.; Wang, B. e Yliperttula, M. (2010) Surface plasmon resonance instrument as a refractometer for liquids and ultrathin films, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **149**(1):212 – 220.
- Luna-Moreno, D.; Monzón-Hernández, D.; Noé-Arias, E. e Regalado, L. E. (2012) Determination of quality and adulteration of tequila through the use of surface plasmon resonance, *Appl. Opt.*, **51**(21):5161–5167.

- Meléndez, J.; Carr, R.; Bartholomew, D.; Taneja, H.; Yee, S.; Jung, C. e Furlong, C. (1997) Development of a surface plasmon resonance sensor for commercial applications, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (38-39):375–379.
- Milder, P.; Franchetti, F.; Hoe, J. C. e Püschel, M. (2012) Computer generation of hardware for linear digital signal processing transforms., *ACM Transactions on Design Automation of Electronic Systems*, **17**(2):33 páginas.
- Moreira, C. S. (2009) Projeto de pesquisa: Projeto de um biossensor baseado na ressonância de plásmons de superfície (SPR), para fontes monocromáticas ou policromáticas.
- Moreira, C. S.; Lima, A. M.; Neff, H.; Neto, A. G. B. e Loureiro, F. C. C. L. (2011) Biossensores: Tecnologia e aplicações., *Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação - CONNEPI*, (2):18 páginas.
- Neff, H.; Zong, W.; Lima, A.; Borre, M. e Holzhüter, G. (2009) Optical properties and instrumental performance of thin gold films near the surface plasmon resonance, *Thin solid Films*, (496):688–697.
- Nocedal, J. N. e Wright, S. J. (1999) *Numerical optimization*, Prentice Hall, p. Caps. 12 e 18.
- Nomadics, I. (2004) *Operator's Manual - SPR3 and SPR3(U)*.
- Oliveira, L.; Moreira, C.; Thirstrup, C.; Melcher, E.; Lima, A. e Neff, H. (2013) A surface plasmon resonance biochip that operates both in the angular and wavelength interrogation modes, *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, (99):1–10.
- Oliveira, L. C. (2011) *Dissertação de Mestrado: Sistema Computacional para biossensor baseado na ressonância de plasmons de superfície.*, Dissert. de Mestrado, UFCG - Universidade Federal de Campina Grande.
- Oliveira, L. C.; Grilo, L. C.; Lima, A. e Melcher, E. K. U. (2011) Controller for surface plasmons resonance based biosensor using reconfigurable computing and virtual instruments, *IX International Congress on Electrical Metrology*.
- Otto, A. (1968) Excitation of surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Z. Physik*, (216):398–410.
- Peterlinza, K. e Georgiadis, R. (1996) Two-color approach for determination of thickness and

- dielectric constant of thin films using surface plasmon resonance spectroscopy, *Optics Communications*, (130):260–266.
- Phelps, J. M. e Taylor, D. M. (1996) Determining the relative permittivity and thickness of a lossless dielectric overlayer on a metal film using optically excited surface plasmon polaritons, *Journal of Physics D: Applied Physics*, (Vol. 29, No. 4):1080–1087.
- Piliarik, M. e Homola, J. (2009) Surface plasmon resonance (spr) sensors: approaching their limits?, *Opt. Express*, **17**(19):16505–16517.
- Sadana, A. e Sadana, N., eds. (2011) *Handbook of Biosensors and Biosensor kinetics*, Elsevier.
- Savitzky, A. e Golay, M. J. E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Analytical Chemistry*, (8):1627–1639.
- Schasfoort, R. B. M. e Tudos, A. J., eds. (2008) *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, RSC Publishing, University of Twente, Enschede, The Netherlands.
- Shalabney, A. e Abdulhalim, I. (2010) Electromagnetic fields distribution in multilayer thin film structures and the origin of sensitivity enhancement in surface plasmon resonance sensors, *Sensors and Actuators A: Physical*, **159**(1):24 – 32.
- SPREETA (2000) TSPR1A170100: Spreeta™ Liquid Sensor, Texas Instruments, Dallas, Texas.
- Thirstrup, C. e Zong, W. (2005) Data analysis for surface plasmon resonance sensors using dynamic baseline algorithm, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (106):796–802.
- Wood, R. (1902) On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Proc. Phys. Soc.*, (18):269–275.
- Wooten, F., ed. (1972) *Optical Properties of Solids*, Academic Press.
- Yeatman, E. M. (1996) Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, **11**(6-7):635–649.
- Zhan, S.; Xiaoping Wang e Liu, Y. (2011) Fast centroid algorithm for determining the surface plasmon resonance angle using the fixed-boundary method, *Measurement Science and Technology*, (22):6pp.
- Zhang, J. e Wang, G. P. (2009) Determination of thickness and dielectric constant of thin films by dual-wavelength light beaming effect of a metal nanoslit, *Journal of Applied*

Physics, **106**(3):034305.