

INSTITUTO FEDERAL DA PARAÍBA - IFPB
Coordenação do Curso Superior de Bacharelado em
Engenharia Elétrica

DANIELLA DE LOURDES LUNA SANTANA DE ANDRADE
GABRIEL BRUNO MONTEIRO FERNANDES

**Metodologia de Processamento para
Ressonância de Plásmon de Superfície por
Imagem**

João Pessoa - PB

Julho de 2018

METODOLOGIA DE PROCESSAMENTO PARA RESSONÂNCIA DE PLÁSMON DE SUPERFÍCIE POR IMAGEM

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do Curso de Engenharia Elétrica
do campus João Pessoa, do Instituto Federal da
Paraíba, para a obtenção de diploma de Enge-
nheiros Eletricistas.

Orientador: Professor Cleumar da Silva Moreira

João Pessoa - PB

Julho de 2018

Daniella de Lourdes Luna Santana de Andrade

Gabriel Bruno Monteiro Fernandes

Metodologia de Processamento para Ressonância de Plásmon de Superfície por Imagem/ Daniella de Lourdes Luna Santana de Andrade
Gabriel Bruno Monteiro Fernandes. – João Pessoa - PB, Julho de 2018-
42 p.

Orientador: Professor Cleumar da Silva Moreira

Monografia (Graduação) – Instituto Federal da Paraíba - IFPB

Campus João Pessoa

Engenharia Elétrica, Julho de 2018.

1. Ressonância de plásmon de superfície. 2. Processamento de imagens digitais. 3. Análise de Componente Principal 4. SPRi I. Cleumar da Silva Moreira. II. Instituto Federal da Paraíba. III. Campus João Pessoa.

DANIELLA DE LOURDES LUNA SANTANA DE ANDRADE
GABRIEL BRUNO MONTEIRO FERNANDES

METODOLOGIA DE PROCESSAMENTO PARA RESSONÂNCIA DE PLÁSMON DE SUPERFÍCIE POR IMAGEM

BANCA EXAMINADORA

Professor Cleumar da Silva Moreira, Dr.

Orientador
Instituto Federal da Paraíba

Helder Rolim Florentino, Dr.

Membro da banca Instituto
Federal da Paraíba

Professor Pedro Victor E. de Souza, Me.

Membro da banca
Instituto Federal da Paraíba

À Eudézia Ferreira da Silva.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradecemos à Deus, por nos ter concedido saúde, discernimento e força para superar todas as adversidades encontradas ao longo deste caminho acadêmico.

Aos nossos pais, David e Nair, José Raimundo e Jenete, pelo amor, paciência, incentivo e apoio constante em todas as decisões tomadas. Somos gratos também pela confiança e investimento em nós.

Aos nossos irmãos, Nathália, José Raimundo Filho e Lucas, pela compreensão de nossa ausência em vários momentos destes anos de curso. Agradecemos ainda pelo companheirismo, incentivo e por todas as lembranças da infância.

Ao IFPB, que nos acolheu em todos os dias desta jornada de graduação, tornando-se nossa segunda casa. À coordenação do curso de Engenharia Elétrica, por todo o suporte nos dado durante este período.

Aos nossos companheiros de curso, sem vocês não haveria com quem compartilhar os momentos de felicidade e de preocupações durante a graduação.

Aos professores, exemplos de dedicação e humildade, serviram de espelhos para a nosso crescimento pessoal e profissional. Juarez, Kalina, Silvana, Edvaldo, Alfredo e Manoel, o nosso eterno agradecimento.

Ao nosso orientador Cleumar Moreira, por ter acreditado que éramos capazes de desenvolver este trabalho. Agradecemos pela paciência na orientação e pelo incentivo q tornaram possível conclusão desta monografia.

Aos professores Helder Florentino e Pedro Souza, pela participação na banca e pelas contribuições dadas na conclusão deste trabalho.

*"Não vos amoldeis às estruturas deste mundo,
mas transformai-vos pela renovação da mente,
a fim de distinguir qual é a vontade de Deus:
o que é bom, o que Lhe é agradável, o que é perfeito."
(Bíblia Sagrada, Romanos 12, 2)*

RESUMO

Biossensores são dispositivos analíticos que convertem uma resposta biológica em um sinal elétrico. Suas aplicações atingem diversas áreas, envolvendo o setor de defesa, clínico, monitoramento do meio ambiente, entre outras. Biossensores por ressonância de plasmon de superfície (SPR) são instrumentos analíticos de alta sensibilidade capaz de monitorar interações entre bio-moléculas em tempo real. Tais equipamentos proporcionam uma solução que independe de compostos específicos os quais são geralmente utilizados para causar reações com o material que deseja-se detectar ou mensurar. A tecnologia de SPR por imagem possibilita a visualização de todo o biochip por meio de uma câmera de vídeo CCD. Este trabalho visa a construção de uma metodologia de processamento de imagens para a detecção e análise do fenômeno nesta categoria de sensoriamento.

Palavras-chave: Ressonância de plásmom de superfície, Processamento de imagens digitais, Análise de Componente Principal, SPRi.

ABSTRACT

Biosensors are analytical devices that convert a biological response into an electrical signal. Its applications reach several areas, involving the defense sector, clinical, environmental monitoring, among others. Surface plasmon resonance (SPR) biosensors are highly sensitive analytical instruments capable of monitoring interactions between bio-molecules in real time. Such equipment provides a solution which is independent of specific compounds which are generally used to cause reactions with the material to be detected or measured. SPR imaging technology enables the entire biochip to be viewed through a CCD video camera. This work aims at the construction of an image processing methodology for the detection and analysis of the phenomenon in this category of sensing.

Keywords: Surface Plasmon Ressonance, Digital Image Processing, Principal Component Analysis, SPRI.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema das cargas e do campo eletromagnético dos plásmos propagando-se sobre uma superfície na direção x . A dependência exponencial do campo E_z é vista à direita. H_y mostra o campo magnético na direção desta onda p polarizada (RAETHER, 1988).	15
Figura 2 – Representação da estrutura do biossensor multicamada SPR. O vetor k_{sp} de plásmom de superfície ressoa com o campo evanescente k_x , resultando na redução da refletividade, conforme indicado pela faixa preta observada no feixe de luz refletido (PEREIRA et al., 2014).	18
Figura 3 – Refletância em função do ângulo de incidência para três diferentes soluções de amostra (n_4). A refletância mínima é a condição de ressonância que muda quando a solução de amostra é alterada (PEREIRA et al., 2014).	19
Figura 4 – Exemplo de binarização de imagem pelo método de Otsu (OTSU, 1979). . .	23
Figura 5 – Modelo de superfície morfológica para transformada de Watershed (BEUCHER; LANTUEJOUL, 1979).	25
Figura 6 – Fenômeno (colunas verdes), sombreamentos laterais (linhas vermelhas) e outros artefatos ruidosos (círculos laranjas) da imagem de SPR.	28
Figura 7 – Imagem de SPR de (A) alta qualidade; e (B) baixa qualidade.	28
Figura 8 – Componentes gerados da imagem de alta qualidade.	29
Figura 9 – Componentes gerados da imagem de baixa qualidade.	29
Figura 10 – Componentes principais, sendo A o de melhor utilização para a imagem. . .	30
Figura 11 – Componentes principais, sendo C o de melhor utilização para a imagem. . .	30
Figura 12 – Componentes principais de uma imagem de baixa qualidade, sendo B o de melhor utilização para a mesma.	31
Figura 13 – Imagens com mesma distribuição de níveis de cinza, porém com diferentes valores de entropia.	32
Figura 14 – (A) Imagem Original; (B) Componente selecionado após filtro de média; (C) Resultado da Segmentação.	32
Figura 15 – Resultado da segmentação para imagem de baixa qualidade.	33
Figura 16 – (A) Imagem original; (B) Resultado da segmentação de Watershed.	33
Figura 17 – Resultado da aplicação da transformada de Hough para a imagem de SPR. .	34
Figura 18 – Fluxograma de implementação do algoritmo de detecção do fenômeno SPR. .	35
Figura 19 – Resultado da aplicação da transformada de Hough para a imagem de SPR. .	37
Figura 20 – Resultado da aplicação da transformada de Hough para a imagem de SPR. .	38
Figura 21 – Exemplos de aplicação SPRI (SCARANO et al., 2010) (MANNELLI et al., 2007).	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Estrutura do trabalho	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1	Biossensores	12
2.2	Fenômeno SPR	14
2.2.1	Relação de Dispersão de onda	14
2.2.2	Excitação de plásmon por meio de feixe de luz incidente	16
2.2.3	Biossensor SPR	17
2.3	Processamento Digital de Imagens	20
2.3.1	Análise de Componente Principal	20
2.3.2	Segmentação	22
2.3.2.1	Limiarização pelo método de Otsu	22
2.3.2.2	Transformada de Watershed	23
2.3.2.3	Transformada de Hough	25
3	METODOLOGIA	27
3.1	Algoritmo de detecção do fenômeno SPR nas imagens	27
3.2	Plataforma GUIDE	34
4	RESULTADOS	36
5	DISCUSSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, dispositivos biossensores vêm sendo largamente utilizados no auxílio da detecção de substâncias biológicas, sendo diversas patologias os alvos de identificação. O biossensor óptico baseado em ressonância de plásmon de superfície (SPR) é uma ferramenta poderosa na detecção de biomoléculas. Ele é capaz de detectar diferentes substâncias a partir da variação do índice de refração por uma luz incidente.

As Técnicas de processamento digital de imagens oferecem uma solução robusta no tratamento dos dados recebidos pelo biossensor SPR, acelerando e precisando o processo de detecção das substâncias por meio da análise das imagens, método conhecido por SPRi. O SPRi agrega as sensíveis medições SPR com as capacidades de captura da informação espacial proveniente de dispositivos de detecção de imagem.

Este trabalho tem como objetivos elaborar uma solução para detecção do fenômeno de SPR por meio do processamento de imagens, bem como o de produzir uma *interface* que ofereça opções de calibração do *software*, bem como a exibição da curva de SPR.

1.1 Estrutura do trabalho

A estrutura deste trabalho é composta por cinco capítulos, com o intuito de facilitar a compreensão e o acesso às informações. São eles:

- Capítulo 2: Abrange uma fundamentação teórica a respeito dos conceitos básicos de biossensores, fenômeno e biossensor SPR, bem como de processamento de imagens digitais.
- Capítulo 3: Descreve a metodologia utilizada neste trabalho.
- Capítulo 4: Expõe os resultados obtidos do trabalho.
- Capítulo 5: Apresenta as considerações finais do trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biossensores

Um biossensor é um dispositivo de análise que tem por objetivo medir reações biológicas ou químicas, por meio da geração de sinais proporcionais à concentração de um analito (substância) na reação. É constituído por um elemento sensor biológico, ou bioreceptor, integrado à um detector físico-químico, também conhecido como transdutor, além de um sistema eletrônico, que pode incluir amplificadores de sinal, processadores e displays (MEHROTRA, 2016) (TURNER; KARUBE; WILSON, 1987).

O bioreceptor é um elemento biologicamente sensível, que tem como função principal a detecção de um analito. Ele é responsável, em grande parte, pela especificidade e sensibilidade do dispositivo final. Uma vez que moléculas biológicas interagem de forma específica, uma alteração em uma ou mais propriedades físico-químicas associadas à esta interação pode ocorrer (ESTRELA, 2016).

O elemento transdutor é usado para converter o reconhecimento biológico, feito pelo biossensor, em um sinal mensurável, processo conhecido como sinalização. A maioria dos transdutores produz sinais ópticos ou elétricos que são geralmente proporcionais à quantidade de interações analito/bioreceptor. (MEHARVAR, 2000).

Existem determinados atributos pertencentes aos dispositivos biossensores que são determinantes de sua performance, nos quais destacam-se (ESTRELA, 2016):

- **Seletividade:** refere-se à habilidade de um bioreceptor em detectar um elemento específico em uma amostra contendo outros aditivos e contaminantes. Como por exemplo, tem-se a capacidade de interação entre antígenos e anticorpos presentes no sangue. Este atributo constitui-se como o mais importante no desenvolvimento de um biossensor.
- **Reprodutibilidade:** é a capacidade do biossensor de gerar respostas idênticas para uma configuração experimental replicada. É caracterizada pela precisão e exatidão do transdutor e de outros componentes eletrônicos no biossensor. Define-se como precisão a predisposição do sensor de fornecer resultados análogos sempre que uma amostra é medida. Já o termo precisão indica a capacidade do sensor de fornecer um valor médio próximo do valor real quando uma amostra é medida diversas vezes. Sinais reproduzíveis oferecem alta confiabilidade e robustez à inferência feita na resposta de um biossensor.
- **Estabilidade:** constitui o grau de suscetibilidade a perturbações ambientais - internas e/ou externas ao sistema do biossensor - que podem causar um desvio nos sinais de

saída deste equipamento sob medição, ocasionando um erro na concentração medida e, consequentemente, afetando a precisão e a exatidão do biossensor.

- **Sensitividade:** é determinada pela quantidade mínima da substância de interesse que pode ser detectada pelo biossensor. A sensibilidade é considerada uma propriedade importante deste tipo de dispositivo uma vez que existem aplicações responsáveis pela detecção de baixa concentração de analito, por exemplo ng/ml (nanograma por mililitro) ou até mesmo fg/ml (fentograma por mililitro).
- **Linearidade:** é o atributo que define a precisão da resposta medida, para um conjunto de medições com diferentes concentrações de analito, a uma linha reta, representada pela Equação (2.1), em que a representa a concentração do analito, s é a sensibilidade do biossensor e y o sinal de saída

$$y = sa \quad (2.1)$$

Os primeiros estudos relacionados aos biossensores foram realizados em 1906, quando M. Cremer demonstrou a proporcionalidade de um potencial elétrico entre partes de um fluido localizadas em lados opostos de uma membrana de vidro em relação à concentração de um ácido (CREMER, 1906). Já em 1956 e 1962, Leland C Clark Jr apresentou o primeiro biossensor utilizado em detecção de oxigênio, e a demonstração de um eletrodo enzimático para a detecção de glucose, respectivamente. Suas descobertas influenciaram, em 1969, Guilbault e Montalvo no desenvolvimento do primeiro biossensor potenciométrico para detecção de ureia (GUILBAULT; G, 1969).

Pesquisas relacionadas aos biossensores têm sido fortemente motivadas pela praticidade médica, nas quais análise instantânea de amostras clínicas e monitoramento contínuo de metabólitos, drogas e proteínas usando sistemas miniaturizados e portáteis são de grande apelo tanto por médicos quanto por pacientes.

Uma de suas principais aplicações é voltada à detecção de biomoléculas indicadoras de patologia ou de substância medicamentosa. Técnicas de biossensores eletroquímicos podem ser usadas como ferramentas clínicas na detecção de biomarcadores de câncer de próstata (JOLLY P. AND FORMISANO, 2015).

Os biossensores também podem ser utilizados como plataformas para monitorar a rastreabilidade, qualidade, segurança e valor nutricional dos alimentos (SHARMA et al., 2015). Ainda, estes dispositivos podem ter utilização tecnologicamente avançada, tanto em configurações limitadas por recursos como por configurações médicas sofisticadas, como por exemplo em aplicações na detecção de drogas (BHALLA et al., 2014) ou na detecção de agentes químicos e biológicos tóxicos de interesse bélico (PADDLE, 1996).

Dentre os vários tipos de biossensores, destacam-se como os mais utilizados e de aplicações indispensáveis os imunossensores, os baseados em enzimas, os térmicos, os piezoelétricos e os ópticos (TURNER; KARUBE; WILSON, 1987).

Os biossensores ópticos são uma importante ferramenta na detecção e análise empregadas em pesquisas tais como biomédicas, farmacêuticas, de monitoramento ambiental, de segurança e bélicas. Dentre suas principais vantagens destacam-se a seletividade e especificidade, imunidade à interferência eletromagnética, possibilidade de sensoramento remoto, *design* compacto, detecção multiplexada em um único dispositivo, além de ser minimamente invasivo e de permitir medições *in vivo* (FAN et al., 2008) (MEHARVAR, 2000).

A detecção óptica é geralmente baseada no princípio de medição óptica, tais como fluorescência, reflectância, absorbância em reações químicas, por exemplo, ou outros sinais produzidos pela interação de microrganismos com os analitos, correlacionando o sinal óptico observado com a concentração de compostos-alvo (SU et al., 2011). Os biossensores ópticos são constituídos em quatro tipos básicos para detecção: por fluorescência, absorbância, luminescência e ressonância de plásmon de superfície (SPR).

2.2 Fenômeno SPR

Plásmon de superfície é uma oscilação de densidade de carga que ocorre na interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, como por exemplo, um metal e um dielétrico, sendo esta oscilação extremamente sensível à variação do índice de refração do dielétrico sobre a superfície do metal. Uma pequena variação no índice de refração do meio dielétrico resulta em alterações na constante de propagação dos plasmons de superfície (RAETHER, 1988).

A onda gerada dessa oscilação é associada a uma onda eletromagnética, cujos vetores de campo atingem seus máximos na interface e decaem de maneira instável em ambos os meios (HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999) (PATTNAIK, 2005) (FAN et al., 2008). A onda de plásmon de superfície é baseada em algumas propriedades fundamentais. São elas:

2.2.1 Relação de Dispersão de onda

Uma onda que incide sob uma determinada superfície pode ser caracterizada por seu comprimento de onda λ , sua frequência f e sua velocidade c como mostra a Equação (2.2).

$$c = f\lambda \quad (2.2)$$

No entanto, é comum expressar efeitos de dispersão em termos de número de onda e frequência angular. Pode-se definir um número de onda k como uma grandeza física inversamente

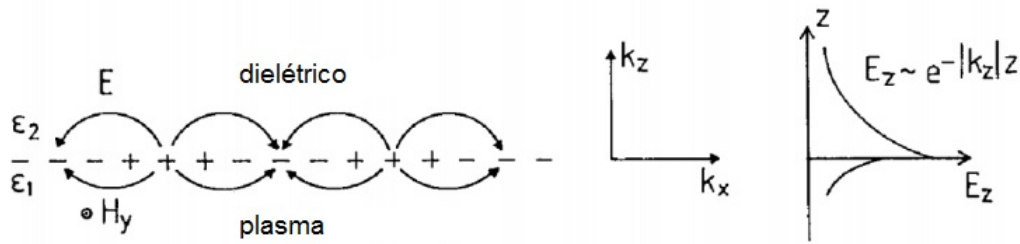
proporcional ao comprimento de onda (2.3). Deste modo, substituindo tais termos na Equação (2.2) obtém-se a relação da Equação (2.4) (WANG, 1986) (HAYT; BUCK, 2003).

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2.3)$$

$$k = \frac{\omega}{c} \quad (2.4)$$

A relação de dispersão pode ser modelada na interface entre um plano de superfície de um metal semi-infinito e o ar com permissividades elétricas ϵ_1 e ϵ_2 em que a onda propaga-se na direção x . A Figura 1 apresenta um modelo para flutuações longitudinais denominadas plásmons de superfície.

Figura 1 – Esquema das cargas e do campo eletromagnético dos plásmons propagando-se sobre uma superfície na direção x . A dependência exponencial do campo E_z é vista à direita. H_y mostra o campo magnético na direção desta onda p polarizada (RAETHER, 1988).



Observa-se que a amplitude das flutuações de carga podem ser localizadas no eixo z e são acompanhadas por um conjunto de campos eletromagnéticos transversais e longitudinais que desaparecem em $|z| \rightarrow \infty$ e possui seu valor máximo na interface $z=0$.

Sua alta sensibilidade às propriedades da superfície do material explicam sua utilização para medição de fenômenos entre elementos em contato com tal interface (RAETHER, 1988).

$$\begin{aligned} E &= E_x^{\pm} \exp ik_{(x)}x + E_z^{\pm} \exp \pm ik_{(z)}z + \exp \omega t \\ H &= H_x^{\pm} \exp ik_{(x)}x + H_z^{\pm} \exp \pm ik_{(z)}z + \exp \omega t \end{aligned} \quad (2.5)$$

Com $+$ para $z \geq 0$, $-$ para $z \leq 0$, e com $k(z)$ imaginário, o que causa o decaimento exponencial do campo ϵ_0 . O vetor de onda $k(x)$ encontra-se paralelo à direção x ; $k(x) = \frac{2\pi}{\lambda}$, em que p é o comprimento de onda da oscilação do plasma.

Considerando a onda eletromagnética descrita no sistema gaussiano de unidades, pode-se simplificar os campos elétricos e magnéticos na Equação (2.6).

$$\begin{aligned} E &= E_0 \exp i(k_{(x)}x + k_{(z)}z - \omega t) \\ H &= H_0 \exp i(k_{(x)}x + k_{(z)}z - \omega t) \end{aligned} \quad (2.6)$$

A equação de Maxwell produz a relação de dispersão para a superfície plana de um metal com a função dielétrica $\epsilon_1 = \epsilon_1' + i\epsilon_1''$, adjacente a um meio ϵ_2 , tal como ar ou vácuo. Para modelagem do comportamento destes campos, estas equações devem ser satisfeitas.

$$\nabla \cdot (\epsilon E) = 0 \quad (2.7)$$

$$\nabla \cdot H = 0 \quad (2.8)$$

$$\nabla \times E = -\frac{1}{c} \frac{\partial H}{\partial t} \quad (2.9)$$

$$\nabla \times H = \frac{\epsilon}{c} \frac{\partial E}{\partial t} \quad (2.10)$$

Resolvendo a Equação (2.9), tem-se que:

$$\frac{\partial H_y}{\partial z} = -\frac{\epsilon \omega E_x}{c} \quad (2.11)$$

2.2.2 Excitação de plásmon por meio de feixe de luz incidente

A aplicação de fótons para excitação dos plasmons de superfície depara-se com o obstáculo da relação de dispersão da luz. Dado um determinado fóton de energia $\hbar\omega$ o vetor de onda $\frac{\hbar\omega}{c}$ precisará crescer em um determinado valor ΔK_x para que tais fótons sejam transformados em SPs.

Caso a um feixe de luz $k = \frac{\omega}{c}$ atinja uma célula unitária com constante a em um ângulo θ_0 obtem-se componentes na superfície da estrutura cristalina descritos por vetores de onda como apresentados em (2.12). Onde o termo v representa um número inteiro $g = \frac{2\pi}{a}$.

$$\left(\frac{\omega}{c}\right) \sin(\theta_0 \pm vg) \quad (2.12)$$

A Equação (2.12) pode ser satisfeita pela Equação (2.13).

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sin(\theta_0 \pm vg) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon}{\epsilon + 1}} \quad (2.13)$$

ou

$$k_x = k_{SP} = \frac{\omega}{c} \sin(\theta_0 \pm \Delta K_x) \quad (2.14)$$

A excitação dos plásmons de superfície pela luz resulta no aumento do campo eletromagnético na superfície, efeito que intitula-se amplificação de ressonância. Essa amplificação é correlacionada com a forte redução da luz refletida que pode tender à completa transformação da luz incidente nos plásmons (RAETHER, 1988).

2.2.3 Biossensor SPR

A ressonância de plásmom de superfície (SPR) é um método único de transdução óptica, empregado em biossensores ópticos. Os biossensores SPR exploram ondas eletromagnéticas especiais (plasmon de superfície) para sondar mudanças no índice de refração em superfícies de metais. Este tipo de bossensor foi primeiramente demonstrado em 1983 (LIEDBERG; NYLANDER; LUNDSTROM, 1983). Desde então, tem sido amplamente explorado e gradualmente tornou-se uma ferramenta fundamental de estudos das interações entre as moléculas do analito e as de bioreconhecimento.

Dentre os principais métodos básicos de excitação do SPR encontram-se o de acoplamento de fibra óptica e acoplamento de prisma. Na configuração de fibra óptica, a luz viaja a partir de uma fonte ao longo de uma fibra ótica até a outra extremidade, onde uma camada sensora imobilizada está localizada. A luz refletida, dispersa ou emitida retorna da amostra por uma segunda fibra ou pela bifurcação da fibra original. O sinal luminoso emitido é interpretado no detector e é uma medida da concentração do analito (PATEL; MISHRA; MANDLOI, 2010).

Na técnica do acoplamento do prisma, a luz incidente é totalmente refletida na interface prisma-metal e gera um campo evanescente que penetra na camada do metal. No comprimento de onda ressonante, a constante de propagação do campo evanescente coincide com a onda de plásmom de superfície, e como resultado, o fóton é acoplado à esta onda (FAN et al., 2008) (MEHARVAR, 2000).

Em um típico biossensor de SPR, os meios são um prisma óptico e uma solução de amostra. Ambos são igualmente tratados como materiais dielétricos, mas normalmente exibem diferentes funções. O filme condutor geralmente é uma fina camada de ouro ou prata (PEREIRA et al., 2014). Uma representação simplificada do sistema SPR de múltiplas camadas é mostrado na Figura 2.

Sob condições de reflexão interna total e em uma certa combinação de ângulo de incidência de luz e comprimento de onda, a luz incidente, k_x , excita os plásmons de superfície no filme de metal. Desta forma, uma intensidade de campo elétrico vaza através da *interface* metal/dielétrico, o chamado campo de onda evanescente, tornando este efeito de ressonância

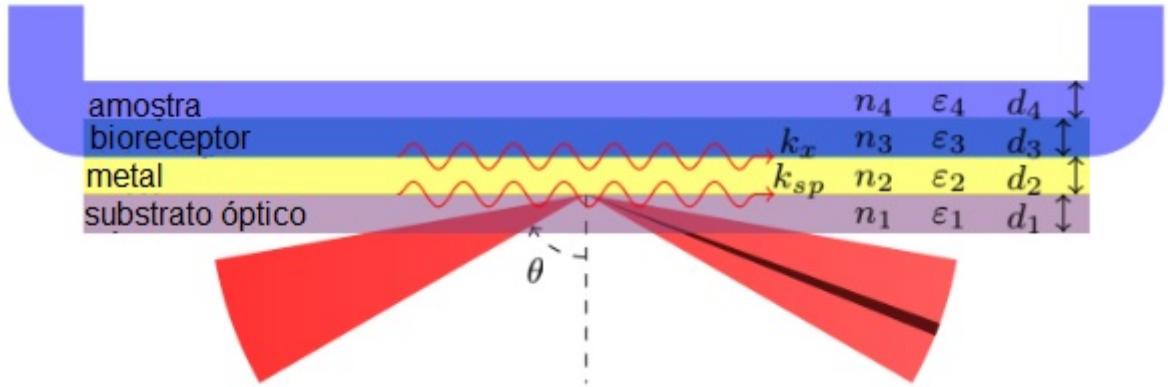


Figura 2 – Representação da estrutura do biossensor multicamada SPR. O vetor k_{sp} de plásmon de superfície ressoa com o campo evanescente k_x , resultando na redução da refletividade, conforme indicado pela faixa preta observada no feixe de luz refletido (PEREIRA et al., 2014).

muito sensível ao índice de refração da solução dentro da profundidade de penetração efetiva do campo evanescente. O vetor de onda de plásmon de superfície pode ser aproximado por (2.15):

$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_{2r} n_3^2}{\epsilon_{2r} - n_3^2}} \quad (2.15)$$

em que k_{sp} depende da parte real da constante dielétrica do metal ϵ_{2r} , do índice de refração do meio n_3 e da luz incidente λ . O componente k_x depende do índice de refração do meio dispersivo n_1 , do ângulo de incidência θ e do comprimento de onda incidente λ , expresso na Equação (2.16).

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin \theta \quad (2.16)$$

A condição de ressonância significa que o vetor k_x oscila com a mesma frequência e amplitude da onda de plásmon de superfície. Consequentemente, uma absorção característica de energia ocorre e o SPR é visto como uma queda na intensidade de luz refletida num dado ângulo de incidência, ou ângulo de ressonância θ_{RES} . A Figura 3 ilustra este fenômeno.

O conceito de detecção de SPR consiste no monitoramento do ângulo de ressonância e registro do índice de refração n_3 da substância de interesse. A Equação (2.17) mostra como este conceito ocorre matematicamente.

$$n_3 = \sqrt{\frac{\epsilon_{2r} (n_1 \sin \theta_{RES})^2}{\epsilon_{2r} - (n_1 \sin \theta_{RES})^2}} \quad (2.17)$$

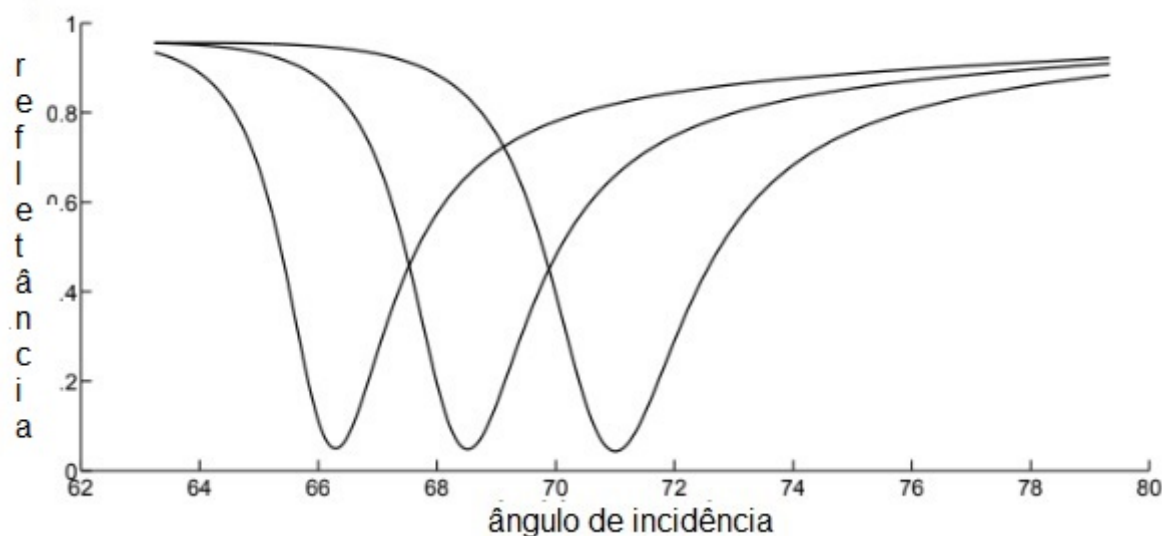


Figura 3 – Refletância em função do ângulo de incidência para três diferentes soluções de amostra (n_4). A refletância mínima é a condição de ressonância que muda quando a solução de amostra é alterada (PEREIRA et al., 2014).

O índice de refração do meio sensível n_3 é modificado quando diferentes substâncias são utilizadas na célula de fluxo. A mudança de n_3 significa também uma alteração no ângulo de ressonância, o gráfico destes valores em função do tempo é chamado de sensorgrama (PEREIRA et al., 2014).

Desde a descoberta do fenômeno de SPR, variados sensores foram desenvolvidos e implementados para diferentes finalidades. Crooks *et al.* relatou o desenvolvimento de um teste imunobiológico rápido para a detecção de resíduos de sulfametazina (SMT) e sulfadiazina (SDZ) na bÍlis suÍna. Neste ensaio, os fármacos SMT e SDZ foram revestidos na superfície do sensor e o fármaco livre em solução que passa sobre a superfície foi medido. Como resultado, o ensaio demonstrou taxas muito baixas de falso-positivos para ambos SMT (0,14%) e SDZ (0,34%) (CROOKS et al., 1998).

Oh *et al.* reportou a detecção direta de *Escherichia coli* (O157:H7) em concentrações tão baixas quanto 10_4 células/mL usando um biossensor SPR Optrel Multiskop (Alemanha) (OH et al., 2002).

Abdiche *et al.* comparou, em 2009, três biossensores existentes no mercado, *Biacore 3000* (Pharmacia Biosensor AB (Uppsala, Suécia), *ProteOn XPR36* (sistema de matriz de imagem SPR, Bio-Rad, EUA), e o *Octet QK* (sensor de fibra óptica, ForteBio, EUA), na realização de ensaios competitivos para ligações de anticorpos e antÍgenos. Os resultados indicaram que as três plataformas estavam em concordância, sugerindo que esses sistemas poderiam ser considerados ferramentas valiosas para caracterizar epitopos de anticorpos e complexos multiproteicos significantes (ABDICHE et al., 2009).

Como parte fundamental inerente aos biossensores de SPR, têm-se os *softwares* de processamento dos dados captados pelo sensor. Soluções de *software* integradas ao sistema de detecção de SPR foram estudadas. Pereira *et al.* utilizou a linguagem *Verilog* de descrição de *hardware* e placa de FPGA *Cyclone II* para uma aplicação de armazenamento e processamento dos dados do sensor de SPR. Uma interface de comunicação para transmissão de dados também foi desenvolvida (PEREIRA et al., 2014).

2.3 Processamento Digital de Imagens

Como forma de desenvolver métodos cada vez mais robustos, precisos e rápidos para sistemas de análises em geral, métodos de processamento digital de dados tornaram-se uma ferramenta crucial e de uso indispensável.

As técnicas de processamento digital de imagens constituem uma ramificação importante, uma vez que a informação de interesse é caracterizada em função das propriedades dos objetos ou padrões que compõem uma imagem. Por consequência, extrair informação de imagens envolve o reconhecimento de objetos ou padrões.

Para este trabalho, o processamento digital de imagens será implementado no tratamento dos dados provenientes do sensor SPR, que neste caso estarão em formato matricial típico de imagens.

2.3.1 Análise de Componente Principal

A análise de componente principal (PCA) é um método estatístico que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais, os quais são combinações lineares de todas as variáveis originais. Esta técnica, que utiliza transformação ortogonal, é usualmente utilizada para separação de bandas espectrais (GONZALEZ; WOODS, 2007), eliminação de ruídos e compressão de dados (SANTO, 2012) por meio da geração de índices e agrupamento de indivíduos, uma vez que esta análise agrupa os indivíduos de uma população segundo a variação de suas características. Para o cálculo de componentes principais, considera-se inicialmente a definição matemática de valor médio dos pixels de uma imagem, definido pela Equação (2.18).

$$\mu_X = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^N X_i \quad (2.18)$$

Em que $\mu(x)$ representa o valor médio, N o número total de *pixels*. Consequentemente, subtrai-se cada canal da imagem pelo seu valor médio, para obter-se um dado de média zero,

como em (2.23).

$$R = R_O - \mu_{R_0} \quad G = G_O - \mu_{G_0} \quad B = B_O - \mu_{B_0} \quad (2.19)$$

Sendo R_O, G_O e B_O correspondentes aos canais antes da subtração. Entende-se como covariância uma medida da variabilidade conjunta de duas variáveis aleatórias (JOHN, 2006), em outras palavras, ela representa o grau de independência ou inter-relação entre duas variáveis não independentes, neste caso, dos pixels de cada canal. Encontra-se então, a matriz de covariância, definida por (2.20).

$$COV = \begin{bmatrix} C_{RR} & C_{GR} & C_{BR} \\ C_{RG} & C_{GG} & C_{BG} \\ C_{RB} & C_{GB} & C_{BB} \end{bmatrix} \quad (2.20)$$

De forma que,

$$C_{XX} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (X_i - \mu_i)^2 \quad (2.21)$$

$$C_{XY} = C_{YX} = \frac{1}{N} \sum_{i=2}^N (X_i Y_i) - \mu_X \mu_Y \quad (2.22)$$

$$X, Y \in R, G, B \quad (2.23)$$

Com N equivalente ao número de pixels na imagem e μ ao valor médio. O próximo passo é o cálculo dos autovetores por meio da matriz de covariância, resolvendo a Equação (2.24).

$$COV = \gamma \lambda \gamma^T \quad (2.24)$$

O termo γ é uma matriz diagonal que representa os autovalores e λ a matriz de autovetores da matriz de covariância. COV configura a matriz de covariância organizada em coluna. Os autovetores são utilizados como uma transformação linear dos valores do domínio original (R, G, B) . É relatado que os vetores resultantes possuem componentes descorrelacionados, ou seja, o eixo primário dos dados foi alinhado onde a variância é máxima. Os vetores no novo espaço são obtidos em (??).

$$\begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \gamma_{11} & \gamma_{12} & \gamma_{13} \\ \gamma_{21} & \gamma_{22} & \gamma_{23} \\ \gamma_{31} & \gamma_{32} & \gamma_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (2.25)$$

Em que $\begin{bmatrix} \gamma_{11} & \gamma_{12} & \gamma_{13} \\ \gamma_{21} & \gamma_{22} & \gamma_{23} \\ \gamma_{31} & \gamma_{32} & \gamma_{33} \end{bmatrix}$ são os autovetores da matriz de covariância.

2.3.2 Segmentação

Segmentação é a divisão da imagem em regiões que possuem características similares. Métodos de segmentação seguem diversos modelos, não existindo paradigma de maior eficiência, esta relação é imposta pela aplicação na qual a técnica será utilizada. No processamento de imagens a segmentação é, geralmente, o primeiro passo para a maioria das análises de teor profundo. Técnicas de segmentação podem ser baseadas em região ou bordas (GONZALEZ; WOODS, 2007).

2.3.2.1 Limiarização pelo método de Otsu

A limiarização é uma abordagem relativamente simples, cujo objetivo é a diferenciação de duas regiões distintas, comumente empregadas na separação de objetos e plano de fundo. Objeto e plano de fundo compõem, então, duas classes diferenciadas, que deverão ser separadas por meio de um critério inicial, sendo chamado de limiar. O limiar deve separar os dois grupos seguindo a função representada pela Equação (2.26).

$$g(x) = \begin{cases} 1; & x \geq l \\ 0; & x < l \end{cases} \quad (2.26)$$

Conhecido como um dos mais usuais algoritmos de limiarização, o método de Otsu é utilizado para encontrar um valor de limiar (*threshold*) ideal para separação de objetos principais de fundo de uma imagem (OTSU, 1979).

O principal objetivo desta técnica é a de iterar por todos os valores possíveis para o *threshold* em uma imagem (ou seja, o intervalo dinâmico da imagem), buscando aquele que minimizam a soma da variância intraclasse da imagem. Este valor irá corresponder ao melhor *threshold* para o caso, separando objeto e fundo, e atribuindo uma cor para cada classe. A variância intraclasse para um *threshold* possível t pode ser calculado por (2.27):

$$\sigma^2 = W_b \sigma_b^2 + W_f \sigma_f^2 \quad (2.27)$$

em que W representa o peso de cada classe, correspondente à probabilidade que um *pixel* possui de pertencer à classe b (primeiro plano) ou f (plano de fundo).

Este cálculo é realizado para todos os *thresholds* possíveis. O valor tal qual minimize a variância intraclasse consiste, então, no *threshold* escolhido para a binarização da imagem. Como forma de otimização do algoritmo, o cálculo da variância que utiliza-se de valores de

médias e pesos correspondentes para cada classe, pode ser substituído justamente pelo cálculo da variância interclasse, demonstrado pela Equação (2.28):

$$\sigma_B^2 = \sigma^2 - \sigma_W^2 = W_b(\mu_b - \mu)^2 + W_f(\mu_f - \mu)^2 \quad (2.28)$$

Em que: $\mu = W_b\mu_b + W_f\mu_f$

Logo: $\mu = W_bW_f(\mu_b - \mu_f)^2$

O valor que atinge esse objetivo é o mesmo *threshold* que minimiza a variância intraclasse, portanto, resultando na limiarização ideal.

Na implementação do algoritmo, faz-se necessário o cálculo do histograma da imagem em tons de cinza de entrada. Para cada valor possível de um *threshold*, serão calculados os pesos e médias para as classes do primeiro plano e do plano de fundo da imagem. Estes valores serão utilizados no cálculo da variância interclasses. Após todas as iterações, é feita a escolha do *threshold* de acordo com a que apresentou o maior valor para a variância interclasses.

O algoritmo irá iterar cada pixel na imagem, verificando seu valor. Caso este valor seja igual ou superior ao *threshold*, a cor do pixel será definida como branca, ou preta caso o valor não atinja o *threshold*. Este processo realiza a chamada binarização da imagem e é ilustrado pela Figura 4.

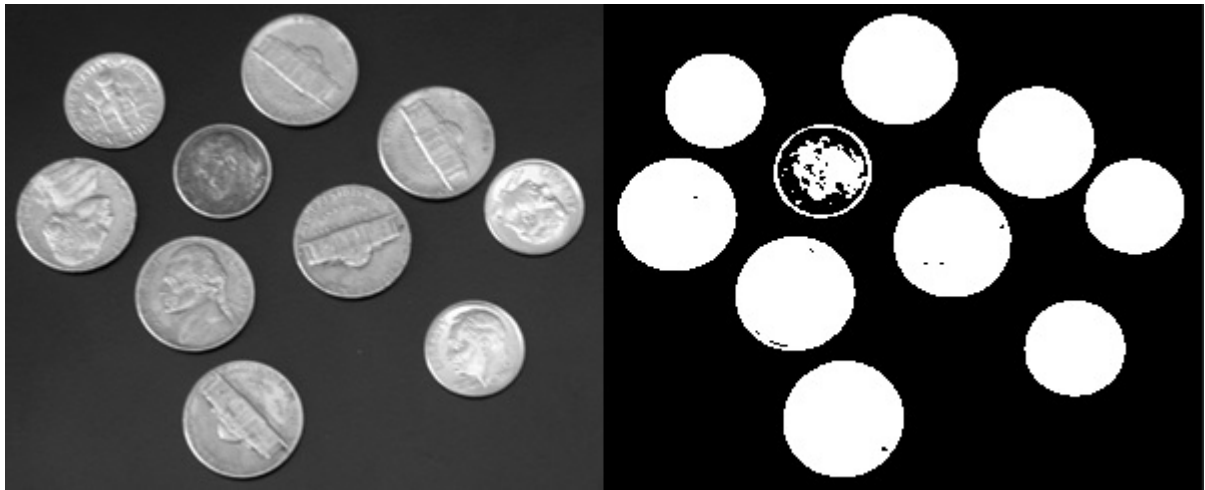


Figura 4 – Exemplo de binarização de imagem pelo método de Otsu (OTSU, 1979).

2.3.2.2 Transformada de Watershed

A Transformada de Watershed é classificada como um algoritmo de segmentação baseado em regiões. Esta técnica não paramétrica de detecção de contornos tem como princípio básico analisar a imagem (em escala de cinza) a ser processada como uma superfície topográfica. A tonalidade de cinza do *pixel* de cada ponto da imagem representa a altitude do ponto correspondente (BEUCHER; LANTUEJOUL, 1979).

- **Módulo de Gradiente:** Seja f uma função contínua de uma imagem de escala de cinza. Pode-se denotar a variação de f no ponto $x(u, v)$ de \mathbb{R}^2 , pela função f definida por (2.29):

$$g(x) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{(sup_{B(x, \varepsilon)}[f] - inf_{B(x, \varepsilon)}[f])}{2\varepsilon} \quad (2.29)$$

com $sup_{B(x, \varepsilon)}[f]$ o máximo valor da função f no círculo radiano ε centralizado em x , e $inf_{B(x, \varepsilon)}[f]$ o valor mínimo de f em $B(x, \varepsilon)$.

Se f é continuamente diferenciável, consequentemente a variação de f é o modulo do gradiente como mostra (2.30):

$$g(x) = |grad(f(x))| = [\partial f^2 \partial u + \frac{\partial f^2}{\partial v}]^{\frac{1}{2}} \quad (2.30)$$

- **Definição do Limiar:** O limiar de f no nível λ define dois conjuntos. O primeiro, X_λ , diz respeito à todos os pontos de x em \mathbb{R}^2 tal qual $f(x)$ é menor ou igual a λ (2.31).

$$X_\lambda = \{x \in \mathbb{R}^2 : f(x) \leq \lambda\} \quad (2.31)$$

O segundo, Y_λ , diz respeito à todos os pontos de x em \mathbb{R}^2 tal qual $f(x)$ é estritamente menor que λ (2.32).

$$Y_\lambda = \{x \in \mathbb{R}^2 : f(x) < \lambda\} \quad (2.32)$$

Nota-se que o conjunto Y_λ para $0 \leq \lambda$ define perfeitamente a função f . Desta forma, tem-se em (2.33):

$$\forall x \in \mathbb{R}^2, f(x) = Inf(\lambda | x \in X_\lambda) \quad (2.33)$$

- **Zonas de influência:** Considerando-se X parte de \mathbb{R}^2 . É possível definir a distância entre dois pontos como o menor comprimento da medida de superfície, se esta for existente, e convencionalmente igual a ∞ caso não exista medida de superfície.

Como anteriormente mencionado, esta transformada baseia-se em relevos geográficos para implementar a segmentação de áreas. A Figura 5 ilustra o modelo de superfície morfológico para este método.

- **Mínimo de uma função:** Considerando-se f uma função definida em \mathbb{R}^2 e Y_λ sua família de conjuntos correspondentes. A função f é dita como tendo no ponto x o mínimo de altura λ (com $\lambda = f(x)$) se (2.34):

$$d_{X_\lambda}(x, X_\lambda) = +\infty \quad (2.34)$$

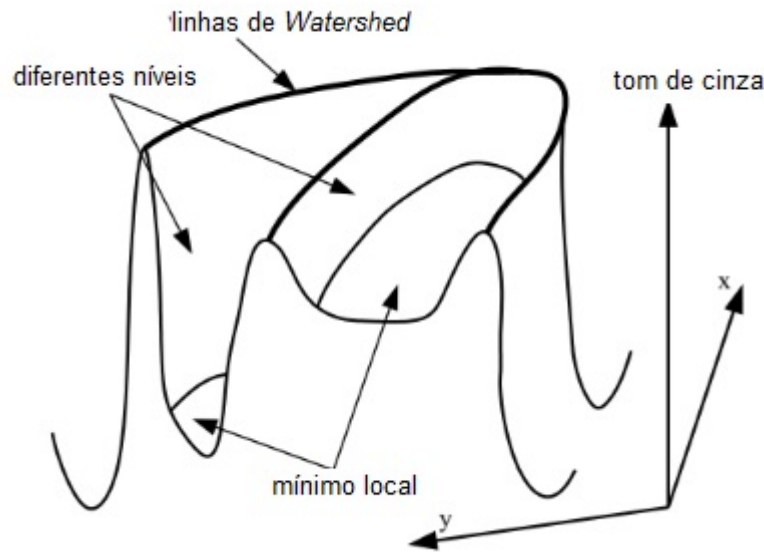


Figura 5 – Modelo de superfície morfológica para transformada de Watershed (BEUCHER; LANTUEJOUL, 1979).

- Detecção de relevos: Considerando-se nesta superfície uma certa quantidade de água, que, espalhada, atinge uma certa altura, tem-se que, todos os pontos cobertos pela água podem ser associados aos pontos mínimos de uma função. Tal conjunto de pontos em comum é tido como a detecção de diferentes tipos de relevo (ou *watersheds*).

Matematicamente falando, seja Z o conjunto de *watersheds*, e Z_λ um subconjunto de pontos de Z localizados na altura λ . Tem-se (2.35):

$$Z = \bigcup_{\lambda} Z_{\lambda} \quad (2.35)$$

Supondo-se um Z_μ conhecido, para cada μ estritamente menor que λ . ($Y_\mu = \bigcup_{\mu < \lambda} Z_\mu$) é o conjunto de pontos menores que λ , pertencendo a uma única altura de relevo na imagem.

Seja x um ponto da altura λ . Se $d_{X_\lambda}(x, Y_\lambda - \bigcup_{\mu < \lambda} Z_\mu) < +\infty$, e se esta distância for a mesma entre dois componentes diferentes e conectados ($Y_\lambda - \bigcup_{\mu < \lambda} Z_\mu$), x aparenta ser equidistante de dois diferentes relevos e, conseqüentemente, deve ser considerado um ponto de Z . Define-se então na Equação (2.36), um modo de operação para detecção de diferentes *watersheds*:

$$Z_\lambda = S(Y_\lambda - \bigcup_{\mu < \lambda} Z_\mu; X_\lambda) \quad (2.36)$$

2.3.2.3 Transformada de Hough

A transformada de Hough consiste em uma técnica de extração de características empregada em análise de imagens, visão computacional e processamento digital de imagens (HOUGH,

1962).

Este algoritmo usa um *array* chamado espaço paramétrico para detectar a existência de uma linha $y = ax + b$. Em geral, a linha pode ser representada como um ponto (b, a) no espaço paramétrico. No entanto, linhas verticais representam um problema, uma vez que elas dariam origem a valores ilimitados do parâmetro de declive a . Desta forma, por razões computacionais, propuseram o uso da forma normal de *Hesse*, expresso pela equação (2.37).

$$\rho = x \cos \theta + y \sin \theta \quad (2.37)$$

em que ρ é a distância da origem até o ponto mais próximo na linha reta, e θ é o ângulo entre o eixo x e a linha conectando a origem com esse ponto mais próximo. Portanto, é possível associar a cada linha da imagem um par (ρ, θ) .

Dado um único ponto no plano, o conjunto de todas as linhas retas que atravessam este ponto corresponde à uma curva sinusoidal no plano (ρ, θ) . Já um conjunto de dois ou mais pontos que formam uma linha reta produzirá sinusoides que cruzam no plano (ρ, θ) para aquela linha.

3 METODOLOGIA

3.1 Algoritmo de detecção do fenômeno SPR nas imagens

Para validação do algoritmo de processamento dos dados, foram utilizadas 11 imagens do fenômeno SPR, com extensão *.jpg*. O ponto de ressonância SPR, o qual desejou-se detectar, pode ser interpretado na imagem por uma coluna de tonalidade escura. Tal coluna é mostrada na Figura 6. O objetivo do método exposto no trabalho é realizar a detecção da posição desta coluna para uma determinada imagem de referência.

A partir deste processo é possível extrair a posição do ponto de ressonância para outras imagens e comparar tais posições com o intuito de observar se houve deslocamento da coluna.

Desafios que envolvem o método giram em torno da quantidade de elementos ruidosos neste tipo de imagem. Como por exemplo, tem-se que a não uniformidade da luz captada pode gerar sombras laterais na imagem, as quais confundem-se com a linha vertical do SPR.

Ainda na Figura 6 é possível visualizar artefatos que podem influenciar em processos de segmentação. Para contorno deste tipo de problema, pode-se fazer uso da aplicação de um filtro de média, o qual consiste em um método simples para eliminação de pequenos ruídos locais em imagens. Entretanto, caso ocorra a existência de grandes artefatos, estes poderão ser ainda mais realçados pelo filtro, influenciando de forma relevante o processo de segmentação.

Levando-se em conta os desafios apresentados, o objeto central da metodologia gira em torno da Análise de Componente Principal das imagens. A partir desta ferramenta, obtêm-se determinadas informações da imagem SPR fracionadas em três componentes diferentes.

Ao empregar a Análise de Componente Principal, observou-se que as imagens separavam-se em duas categorias. Intitulou-se assim imagens de alta e baixa qualidade, sendo as de alta qualidade aquelas cujo fenômeno apresentava-se destacado e com bastante contraste em relação ao plano de fundo, diferenciando-o dos demais elementos da imagem. Já nas imagens classificadas como de baixa qualidade houve difícil detecção do fenômeno uma vez que o mesmo não apresentou bastante contraste e a imagem possuía maior incidência de ruídos. A Figura 7 mostra as características citadas das imagens.

A Figura 8 exhibe os componentes gerados pela Análise de Componente Principal a partir de uma imagem classificada como alta qualidade. Observa-se que no componente A, encontra-se uma imagem em que há uma clara dissociação entre regiões de sombreamento e demais regiões. Já a figura 9 mostra os componentes gerados a partir da imagem de baixa qualidade. Para estas imagens não há a ocorrência de um componente que esboce a região de fenômeno SPR separando-a do plano de fundo da imagem. Entretanto, observou-se que o componente B desta

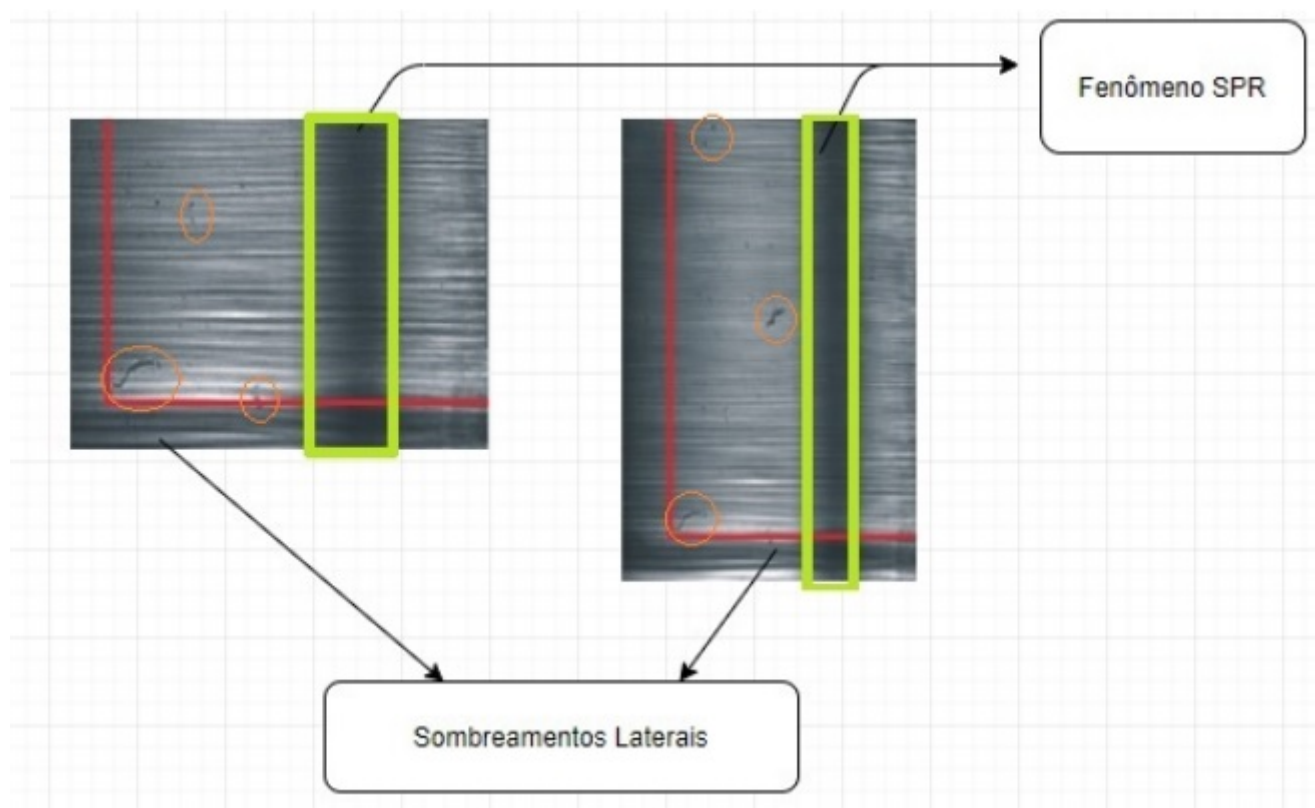


Figura 6 – Fenômeno (colunas verdes), sombreamentos laterais (linhas vermelhas) e outros artefatos ruidosos (círculos laranjas) da imagem de SPR.

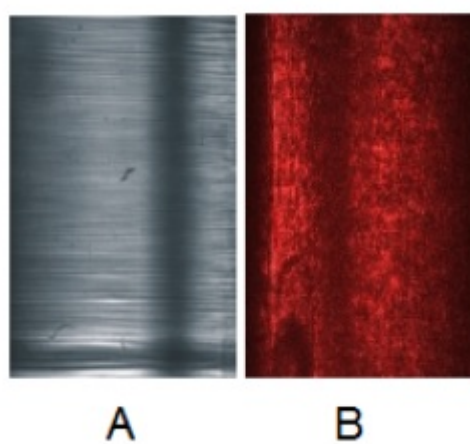


Figura 7 – Imagem de SPR de (A) alta qualidade; e (B) baixa qualidade.

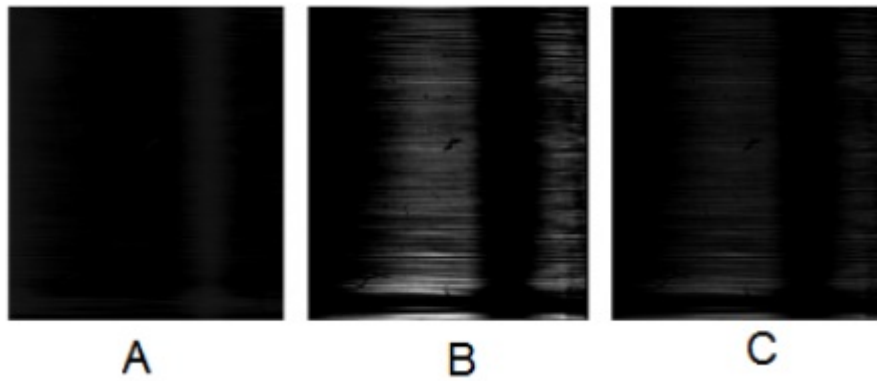


Figura 8 – Componentes gerados da imagem de alta qualidade.

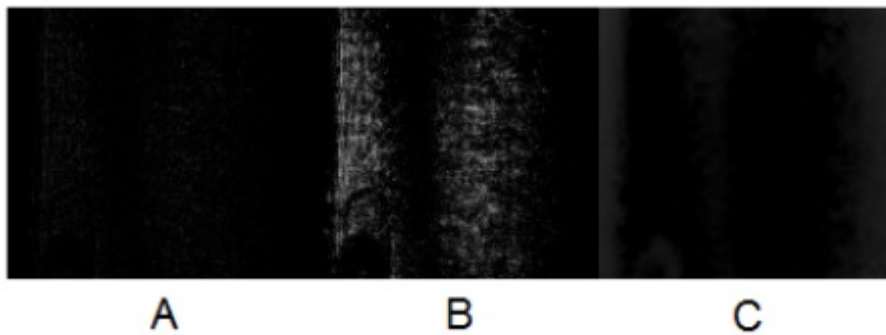


Figura 9 – Componentes gerados da imagem de baixa qualidade.

imagem poderia ser utilizado para detecção da região de interesse.

O atributo escolhido para separação das imagens entre as duas categorias foi o cálculo do gradiente ao quadrado da imagem, demonstrado pela equação (3.1).

$$J = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - x_i^{\sim})^2 \quad (3.1)$$

De forma que $(x_i - x_i^{\sim})$ refere-se à subtração entre um determinado *pixel* e seu adjacente à direita, enquanto que N simboliza o número total de *pixels*.

Após a classificação das imagens em uma determinada categoria, a Análise de Componente Principal é efetivamente aplicada. Na Figura 10, o componente que apresenta maior facilidade da segmentação da área de interesse é o componente A. Já na Figura 11 o componente ideal para o processamento equivale ao componente C. Devido à este fato, fez-se necessário um novo descritor para avaliar as três imagens geradas pela Análise de Componente principal para indicar qual deles foi o componente a ser processado pelo algoritmo. Para esta análise utilizou-se o cálculo da derivada gaussiana.

- Derivada Gaussiana

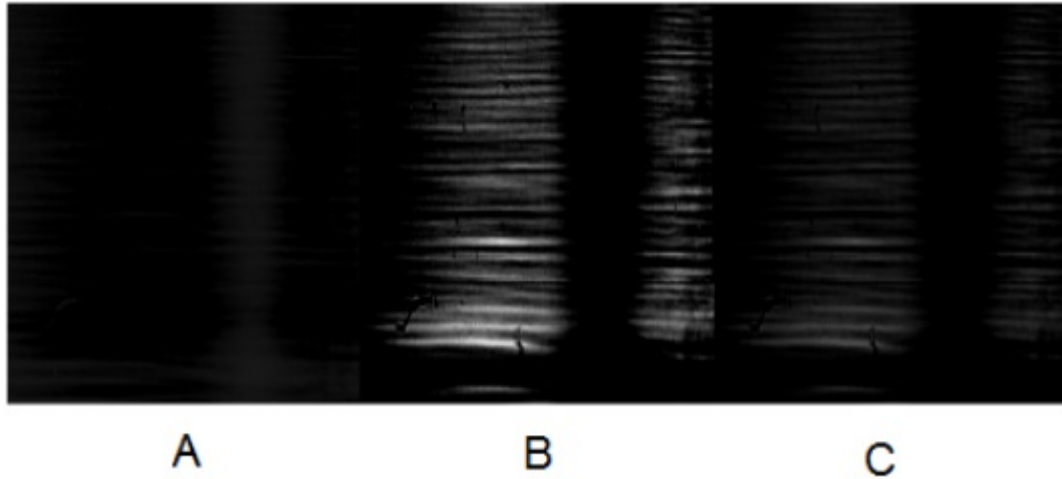


Figura 10 – Componentes principais, sendo A o de melhor utilização para a imagem.

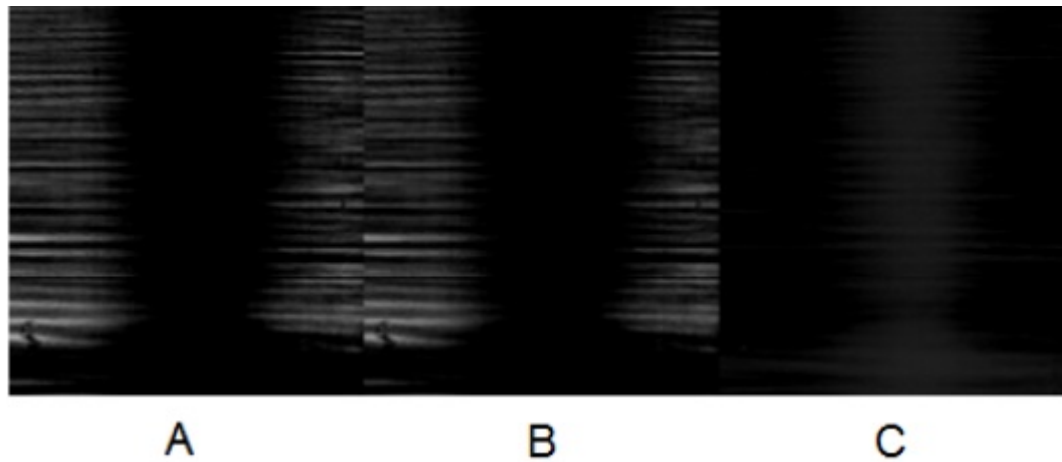


Figura 11 – Componentes principais, sendo C o de melhor utilização para a imagem.

A derivada Gaussiana foi utilizada como método que pode ser interpretado como uma forma de medição do grau de foco em uma imagem. A teoria de escalas espaciais (ROMENY, 1994) leva ao uso da derivada gaussiana de primeira ordem para medição do grau de foco em uma imagem. A função de foco pode ser descrita pelas equações (3.2) e (3.3).

$$F(\sigma) = \frac{1}{NM} \sum_{x,y} [f(x,y) * G_x(x,y,\sigma)]^2 + [f(x,y) * G_y(x,y,\sigma)]^2 \quad (3.2)$$

$$F(\sigma) = \frac{1}{NM} \sum_{x,y} f_x^2 + f_y^2 \quad (3.3)$$

De forma que $f(x,y)$ é o valor de tom de cinza da imagem e $G_x(x,y,s)$, $G_y(x,y,s)$ são as derivadas gaussianas de primeira ordem nas direções x e y na escala σ . Enquanto que NM representa a quantidade total de *pixels* na imagem e, f_x , f_y são as derivadas da imagem na escala σ nas direções x e y , respectivamente.

O elemento σ do filtro Gaussiano está diretamente relacionado à razão sinal-ruído da imagem, e deve ser escolhido de forma que o ruído seja suprimido ao máximo, enquanto a resposta aos detalhes de interesse na imagem sejam preservadas.

Para imagens indicadas como de baixa qualidade, realizou-se processo similar às aquelas descritas como de alta qualidade. Foi necessário a escolha de algum atributo que classificasse o componente a ser escolhido para o processamento posterior. Para tal tarefa, realizou-se o cálculo da entropia da imagem. A Figura 12 demonstra resultados da aplicação da Análise de Componente Principal, sendo o componente B aquele o qual deseja-se classificar como ideal para o processamento.

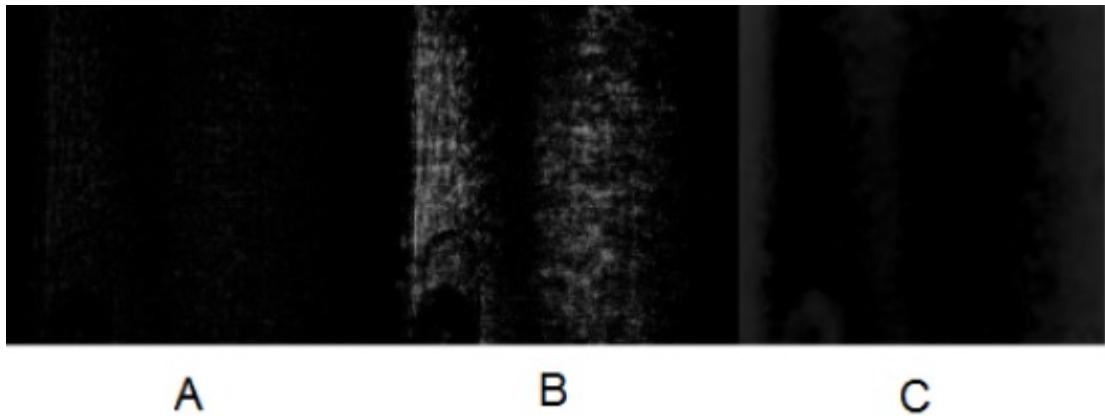


Figura 12 – Componentes principais de uma imagem de baixa qualidade, sendo B o de melhor utilização para a mesma.

- Cálculo da Entropia

A entropia de uma imagem é uma medida que relaciona seu grau de aleatoriedade. Para uma imagem focalizada, a entropia geralmente é elevada (THUM, 1984).

A entropia H de uma imagem pode ser calculada a partir de seu histograma, o qual mostra a frequência de ocorrência (ou probabilidade) de todos os seus diferentes níveis de cinza x (ou densidades ópticas). Para uma determinada imagem com N níveis de cinza, tem-se para cada nível X_i uma probabilidade P_x associada. Desta forma, pode-se definir entropia de primeira ordem pela equação (3.4). A entropia mínima é obtida quando a imagem em si é constante, ou seja, quando todos os *pixels* têm o mesmo nível de cinza x_i . Para este determinado nível de cinza, $P_x = 1$ e $H = \log(1) = 0$.

$$H = - \sum_{i=1}^{N-1} p_x \log_2(p_x) \quad (3.4)$$

Para exemplificação de forma prática, tem-se a Figura 13. A imagem à esquerda (ruído aleatório uniforme) tem uma entropia de 8 *bits* e é incompressível. A imagem à direita tem a mesma distribuição de níveis de cinza, mas é altamente correlacionada espacialmente.

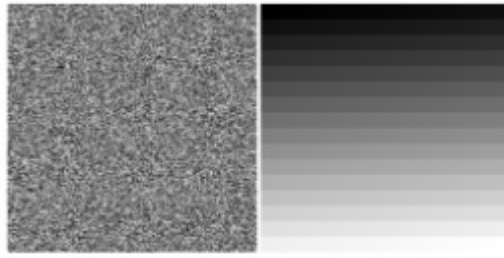


Figura 13 – Imagens com mesma distribuição de níveis de cinza, porém com diferentes valores de entropia.

A entropia define um limite inferior no número médio de *bits* por *pixel* necessário para codificar uma imagem sem distorção. Isso só é verdade, no entanto, para imagens não correlacionadas.

Após a escolha do componente ideal para a seleção da região a qual representa a ressonância SPR, foram realizados dois métodos de segmentação. O primeiro consistiu na aplicação do método de Otsu. Devido às características desta técnica, os resultados apresentaram a tendência de separação tanto da sombra que indica o fenômeno, quanto dos sombreamentos existentes de forma dispersa na imagem.

Para diminuição do efeito de seleção de áreas impróprias devido à tais sombras dispersas, aplicou-se um filtro de média em todas as imagens as quais seriam submetidas ao método de Otsu. Imagens de alta qualidade demonstraram uma seleção próxima da ideal segmentando a região do fenômeno. Entretanto, foram adicionadas áreas de sombreamento lateral como demonstrado na Figura 14.

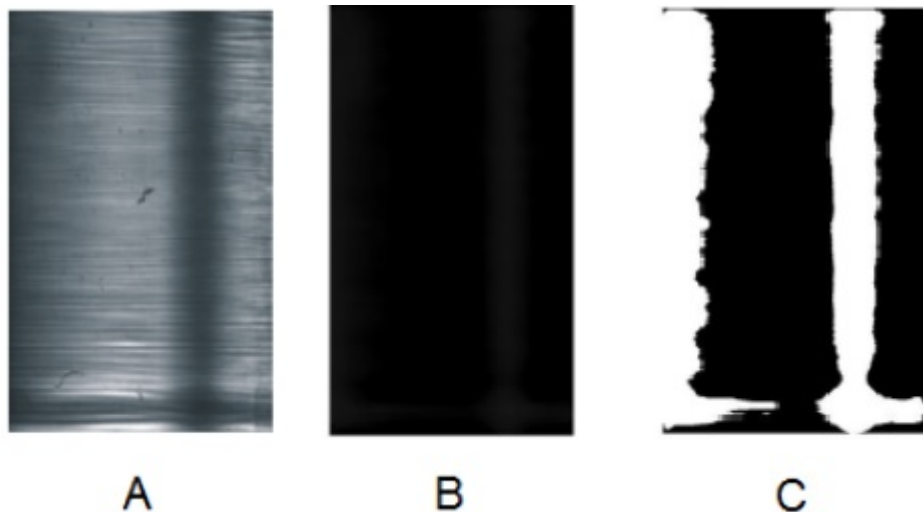


Figura 14 – (A) Imagem Original; (B) Componente selecionado após filtro de média; (C) Resultado da Segmentação.

No processo de segmentação em imagens de baixa qualidade, houve a seleção de regiões em volta da região desejada, como demonstrado na Figura 15.



Figura 15 – Resultado da segmentação para imagem de baixa qualidade.

Com o intuito de eliminar qualquer região que afetasse o cálculo da posição da região do fenômeno, realizou-se um segundo processo de segmentação. Agora pela técnica de Watershed, para separação de áreas consideradas como ruidosas. A Figura 16 apresenta o resultado da aplicação da segmentação pelo método.

Observa-se que, o processo retorna a delineação de várias regiões e que a única área a qual comporta a região do fenômeno é a realçada em azul claro, enquanto que as demais regiões apresentam informações que são apenas consideradas como ruído.

Na aplicação do método, a área segmentada a qual englobou a linha de ressonância sempre foi a região com maior área, sendo assim de fácil reconhecimento. Deste modo, torna-se possível realizar a subtração das áreas de ruído, detectadas pela Watershed, pela imagem de segmentação adquirida pelo métodos de Otsu.

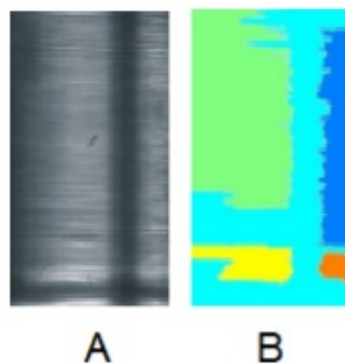


Figura 16 – (A) Imagem original; (B) Resultado da segmentação de Watershed.

Por fim, a Transformada de Hough para detecção de linhas foi utilizada, com o objetivo de identificar a posição dos pixels referentes ao sombreamento na imagem. Para detecção é estipulado uma angulação para as linhas de 89 à 91 graus e um comprimento mínimo de 40 *pixels* menor do que o comprimento total da imagem. A Figura 17 mostra o resultado da detecção. Já a Figura 18 exhibe o fluxograma da metodologia proposta.

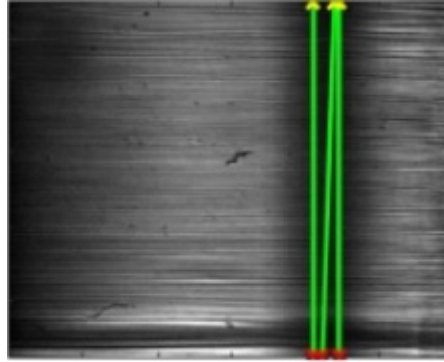


Figura 17 – Resultado da aplicação da transformada de Hough para a imagem de SPR.

3.2 Plataforma GUIDE

Interfaces gráficas facilitam a interação de usuários com programas de computador por meio de elementos gráficos, tais quais menus, botões, etc. A plataforma GUIDE (*Graphical User Interface Development Environment*) fornece as ferramentas para projetar estas *interfaces* de usuário (GUI - *Graphical User Interfaces*) para aplicativos personalizados, por meio do Editor de *Layout* do GUIDE. Este gera automaticamente o código *MATLABTM* para a construção do GUI, que pode ser modificada a fim de personalizar o comportamento do aplicativo.

Para este trabalho, o GUIDE foi utilizado com três objetivos básicos:

- Realizar a calibração, dada pelo processamento da imagem de referência;
- Detectar a posição dos pixels referente ao fenômeno;
- Mostrar a curvas SPR da imagem processada e a diferença da posição desta com a imagem de referência, indicando que houve uma mudança no índice de refração.

A primeira etapa de utilização da *interface* é dada pelo pré processamento da imagem, em que é selecionado o tipo de imagem a ser analisada a partir de sua qualidade, tendo as opções *High* e *Low*. a opção *automatic* pode ser utilizada caso o usuário não tenha certeza quanto à qualidade da imagem.

Posteriormente, deve-se realizar o *upload* da imagem de referência, seguida pela imagem a ter o fenômeno detectado e sua curva de SPR visualizada. O algoritmo detecta a posição do fenômeno por meio da transformada de Hough, indicando as linhas encontradas na *interface*.

Por fim, é mostrado se houve mudança do índice de refração a partir da diferença de posição dos pixels da imagem de referência de uma segunda imagem. Estes dados são mostrados na *interface*, e o último passo consiste em mostrar a curva de SPR. A curva é dada pela diferença da região sombreada das duas imagens exibidas.

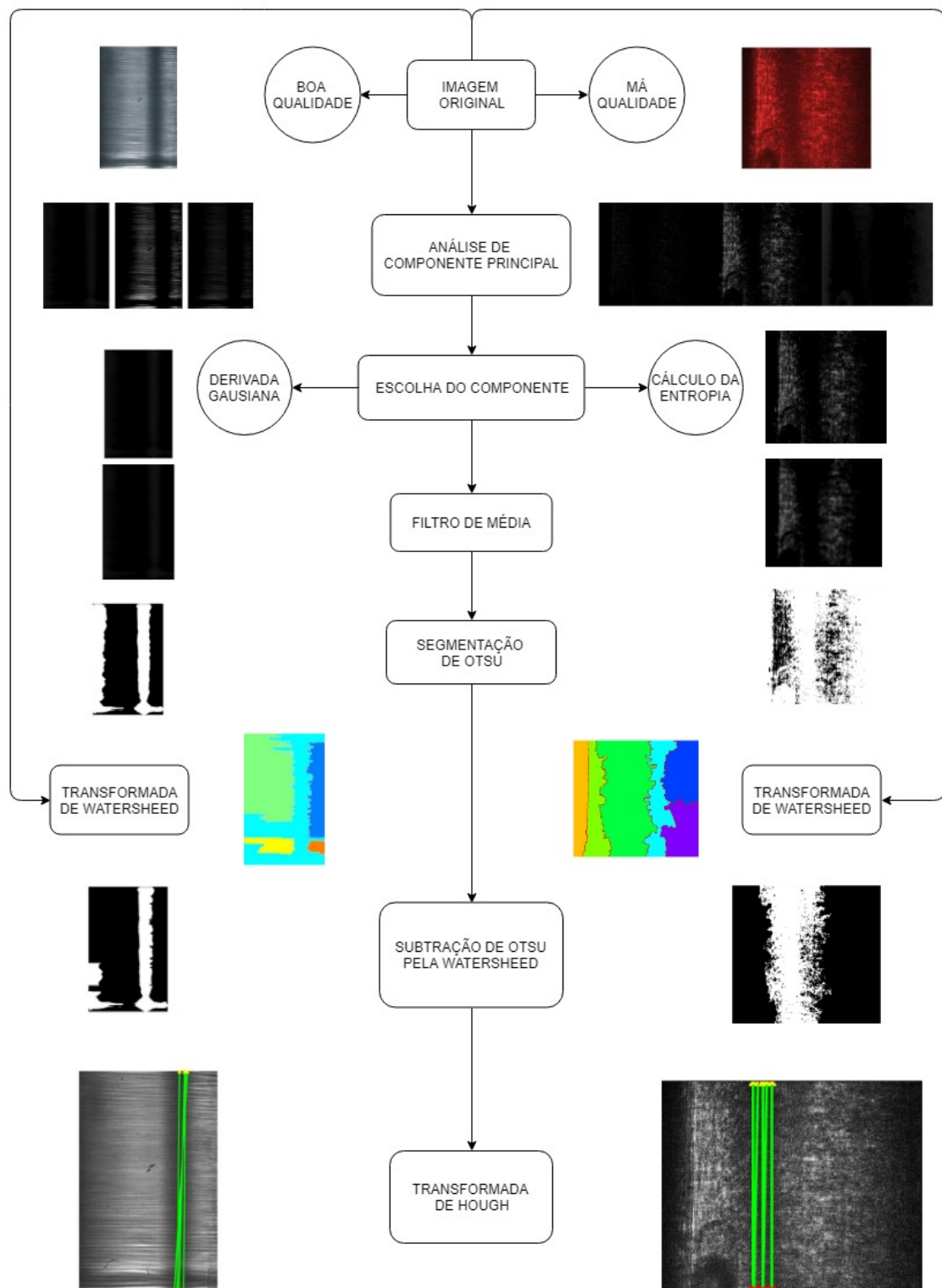


Figura 18 – Fluxograma de implementação do algoritmo de detecção do fenômeno SPR.

4 RESULTADOS

A figura 19 apresenta uma imagem do *software* desenvolvido. Na aba *inputs* existem os botões *Calibration* e *Open File*, os quais irão carregar a imagem de referência e a imagem alvo a qual deseja-se verificar o deslocamento do fenômeno SPR, respectivamente.

A metodologia é inicialmente baseada na escolha entre as categorias de imagens de alta e baixa qualidade. É possível realizar a indicação de como a imagem será processada a partir da aba intitulada *Pre-Processing*. A opção automática fará com que o próprio algoritmo faça a escolha, categorizando a imagem em uma das duas categorias. Porém, caso exista o intuito de realizar o processamento de imagens com a metodologia aplicada à apenas alta ou apenas baixa qualidade é possível selecionar a opção desejada.

Existiu ainda a preocupação com o banco de dados possuir poucas imagens de teste, sendo assim implementada ainda uma opção para corte das laterais da imagem. Tal ferramenta, intitulada *Trim* tem o intuito de corrigir possíveis erros relacionados à presença de sombreamentos laterais de tonalidade muito forte, que podem impossibilitar a convergência do método para um valor satisfatório.

Ao carregar as imagens, é exposto como resultado para o usuário a posição referente ao fenômeno tanto para a imagem de referência quanto para a imagem alvo. É expresso ainda o deslocamento do fenômeno da imagem alvo em relação à imagem de referência. Por fim, expõe-se curva SPR para que haja a verificação do resultado obtido pelo algoritmo de processamento de imagens com as informações contidas na curva. Este resultado é exibido na Figura 20.

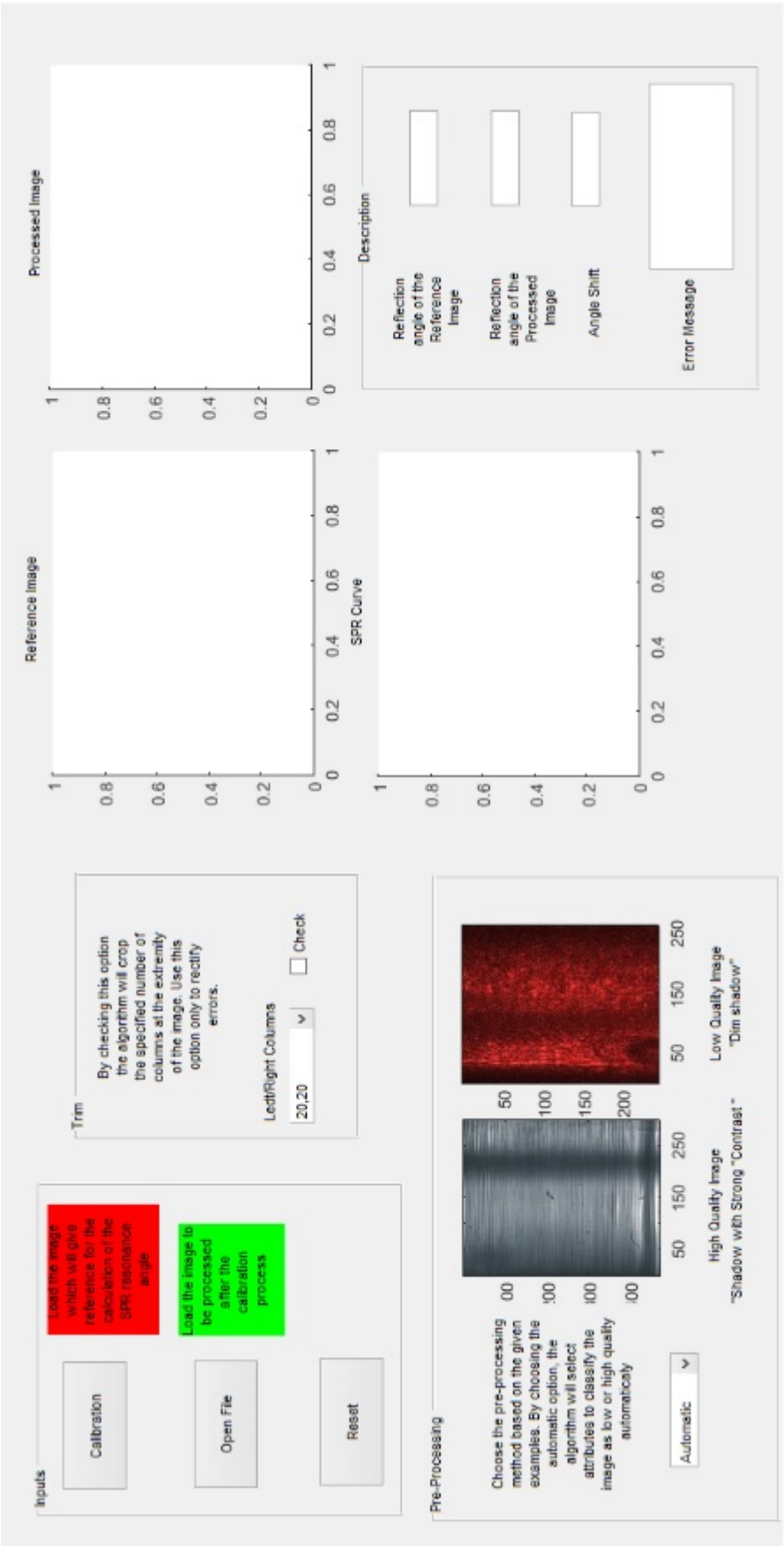


Figura 19 – Resultado da aplicação da transformada de Hough para a imagem de SPR.

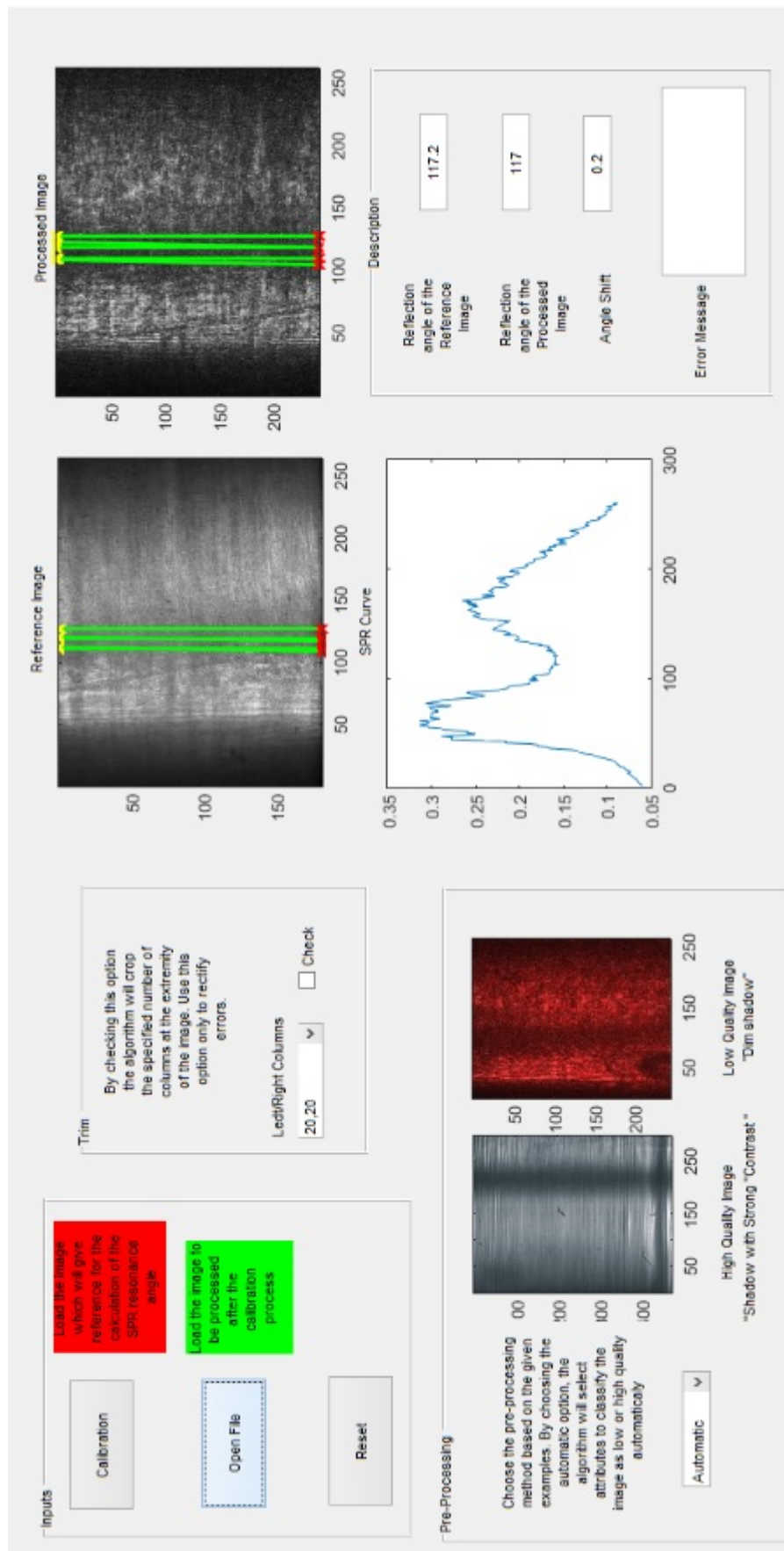


Figura 20 – Resultado da aplicação da transformada de Hough para a imagem de SPR.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho procurou mostrar a influência de um algoritmo de processamento de imagens voltado à imagens de detecção do fenômeno SPR. Também foi desenvolvida uma *interface* GUI para apresentar os resultados de calibração e curva de SPR para cada imagem analisada.

A metodologia apresentada fez uso de cálculos para classificar imagens em determinadas categorias. Desta forma, o algoritmo tem aptidão para detectar o fenômeno independente do modelo de sensor utilizado, conseqüentemente não necessitando de resolução padrão, apenas de uma imagem que sirva como referência para as demais do mesmo grupo (mesmo dispositivo).

Tais métodos poderiam ainda, como aprimoramentos em trabalhos futuros, ser aplicados à algoritmos de aprendizagem de máquina para verificação de possíveis mudanças de limiar. Desta forma, seria necessário um banco de dados com maior número de amostras para separação em imagens de treinamento e imagens de teste.

Ainda, como complemento, a transformação do resultado de posicionamento da linha que indica o fenômeno SPR pode ser relacionada ao ângulo de reflexão na ressonância. Para tal, seriam necessárias informações sobre o procedimento de aquisição do sinal e sobre a disposição do equipamento.

Devido aos resultados satisfatórios, os autores acreditam que o método desenvolvido, baseado na Análise de Componente Principal pode ser adaptado para imagens SPR com diferentes aplicações. Como exemplo, para a Figura 21 que mostra o caso da microscopia baseada SPRI.

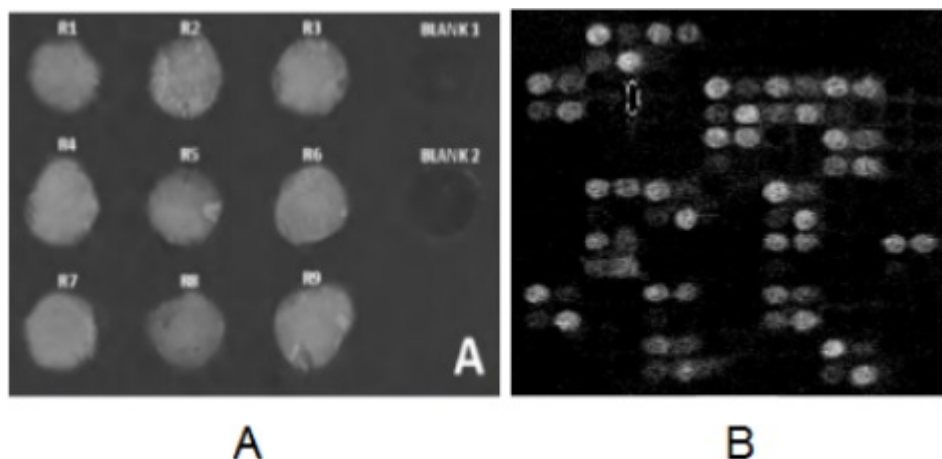


Figura 21 – Exemplos de aplicação SPRI (SCARANO et al., 2010) (MANNELLI et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- ABDICHE, Y. N. et al. Exploring blocking assays using octet, proteon, and biacore biosensors. *Analytical Biochemistry*, v. 386, p. 172–180, 2009.
- BEUCHER, S.; LANTUEJOUL, C. Use of watersheds in contour detection. *International Workshop on image processing*, p. 2.1–2.12, 1979.
- BHALLA, N. et al. Protein phosphorylation analysis based on proton release detection: Potential tools for drug discovery. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 54, p. 109–114, 2014.
- CREMER, M. Über die ursache der elektromotorischen eigenschaften der gewebe, zugleich ein beitrage zur lehre von den polyphasischen elektrolyt ketten. *Zeitschrift fur Biologie*, v. 47, p. 562–608, 1906.
- CROOKS, S. R. H. et al. Immunobiosensor an alternative to enzyme immunoassay screening for residues of two sulfonamides in pigs. *The Analyst*, v. 123, p. 2755–2757, 1998.
- ESTRELA, P. *Biosensor Technologies for Detection of Biomolecules*. [S.l.]: Portland Press, 2016.
- FAN, X. et al. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica ACTA*, v. 9, p. 8–26, 2008.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. *Digital Imaging Processing*. [S.l.]: Pearson, 2007.
- GUILBAULT, G. G.; G, M. J. J. Urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society*, v. 91(8), p. 2164–2165, 1969.
- HAYT, W.; BUCK, J. *Eletromagnetismo*. [S.l.]: LTC, 2003.
- HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators*, v. 54, p. 3–15, 1999.
- P. V. C. Hough. *METHOD AND MEANS FOR RECOGNIZING COMPLEX PATTERNS*. 1962. US 3069654. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/9f/9f/f3/87610ddec32390/US3069654>>.
- JOHN, R. *Mathematical Statistics and Data Analysis*. [S.l.]: Duxbury, 2006.
- JOLLY P.AND FORMISANO, N. E. P. Dna aptamer-based detection of prostate cancer. *Chemical Papers*, v. 69, p. 67–89, 2015.
- LIEDBERG, B.; NYLANDER, C.; LUNDSTROM, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 4, p. 299–304, 1983.
- MANNELLI, I. et al. Dna immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (spri) based microarray system. *Biosensors and Bioelectronics*, Taylor Francis, v. 22, n. 6, p. 803–809, 2007.
- MEHARVAR, M. Fiber-optic biosensors. trends and advances. *Analytical Sciences*, v. 16, p. 677–692, 2000.

- MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – a review. *Journal of oral biology and craniofacial research*, v. 6, p. 153–159, 2016.
- OH, B. K. et al. Detection of escherichia coli o157:h7 using immunosensor based on surface plasmon resonance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 12, p. 780–786, 2002.
- OTSU, N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, v. 9, p. 62–66, 1979.
- PADDLE, B. M. Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 11, p. 1079–1113, 1996.
- PATEL, P. N.; MISHRA, V.; MANDLOI, A. S. Optical biosensors: Fundamentals and trends. *Journal of Engineering Research and Studies*, v. 1, p. 15–34, 2010.
- PATTNAIK, P. Surface plasmon resonance? applications in understanding receptor–ligand interaction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 126, p. 79–92, 2005.
- PEREIRA, E. G. et al. Implementation of a fpga-based data acquisition and processing system for image sensors employed in spr biosensing. *Proceedings of the International Instrumentation and Measurement Technology Conference*, IEEE, 2014.
- RAETHER, H. *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. [S.l.]: Springer-Verlag, 1988.
- ROMENY, B. M. *Geometry-Driven Diffusion in Computer Vision*. Norwell, MA, USA: Kluwer Academic Publishers, 1994. ISBN 0792330870.
- SANTO, R. E. Utilização da análise de componentes principais na compressão de imagens digitais. *Einstein São Paulo*, v. 10, p. 135–139, 2012.
- SCARANO, S. et al. Surface plasmon resonance imaging (spri)-based sensing: a new approach in signal sampling and management. *Biosensors and Bioelectronics*, Taylor Francis, v. 26, n. 4, p. 1380–5, 2010.
- SHARMA, T. K. et al. Moving forward in plant food safety and security through nanobiosensors: Adopt or adapt biomedical technologies? *Proteomics*, v. 15, p. 1680–1692, 2015.
- SU, L. et al. Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, p. 1788–1799, 2011.
- THUM, C. Measurement of the entropy of an image with application to image focusing. *Optica Acta: International Journal of Optics*, Taylor Francis, v. 31, n. 2, p. 203–211, 1984.
- TURNER, A.; KARUBE, I.; WILSON, G. *Biosensors Fundamentals and Applications*. [S.l.]: Oxford Science Publications, 1987.
- WANG, W. C. *Electromagnetic Wave Theory*. [S.l.]: Wiley, New York., 1986.