



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
BACHARELADO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

GLEICE MEDEIROS DE AGUIAR

TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS APLICADAS EM
IMAGENS DE SENSORES RPS

MOSSORÓ

2020

GLEICE MEDEIROS DE AGUIAR

**TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS APLICADAS EM
IMAGENS DE SENSORES RPS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal Rural do Semi-Árido,
Departamento de Ciências da Computação,
para a obtenção do título de Bacharel em
Ciências da Computação.

Orientador: Leiva Casemiro Oliveira
Coorientador: Leandro Carlos de Souza

MOSSORÓ

2020

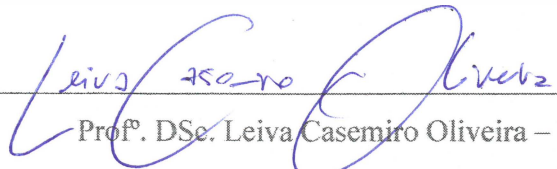
GLEICE MEDEIROS DE AGUIAR

**TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS APLICADAS EM
IMAGENS DE SENSORES RPS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal Rural do Semi-Árido –
UFERSA, Departamento de Ciências da
Computação, para a obtenção do título de
Bacharel em Ciência da Computação.

Orientador: Leiva Casemiro Oliveira
Coorientador: Leandro Carlos de Souza

Data da Defesa: 07/02/2020



Prof.º DSc. Leiva Casemiro Oliveira – UFERSA
Orientador



Prof.º DSc. Leandro Carlos de Souza – UFPB
Coorientador



Prof.º DSc. Daniel Faustino Lacerda de Souza – UFERSA
Membro

A282t Aguiar, Gleice Medeiros de.
TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS
APLICADAS EM IMAGENS DE SENSORES RPS / Gleice
Medeiros de Aguiar. - 2020.
51 f. : il.

Orientador: Leiva Casemiro Oliveira.
Coorientador: Leandro Carlos de Souza.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Ciência da
Computação, 2020.

1. Processamento Digital de Imagens (PDI). 2.
Ressonância de plasmons de superfície (RPS). 3.
Método Bootstrap. 4. Sensor óptico. I. Oliveira,
Leiva Casemiro , orient. II. Souza, Leandro
Carlos de , co-orient. III. Título.

Aos meus avós maternos (*in memoriam*);

A mim pela disposição de realizar esse trabalho; à minha mãe Antônia Maria Medeiros por todo Incentivo e amor durante anos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém, é reconhecer que ninguém jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém e nada crescem sozinhos; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor. A todos que me auxiliaram nesse trabalho agradeço com a mais profunda gratidão e respeito, em especial: A minha mãe, Antônia Maria Medeiros, por sua dedicação e amor. Ao meu papis Alecxander, ao meu padrasto Olavo Linhares e a minha amada tia Leninha.

Ao meu orientador Leiva Casemiro, por tornar possível a realização desse trabalho.

Ao meu coorientador Leandro Souza, por toda a ajuda nesse trabalho.

Aos meus avós *in memoriam* Isaura Medeiros e Olírio Linhares, pelo cuidado. Nunca os esquecerei.

Ao meu filhão Chico, não nasceu de mim, mas nasceu para mim.

Aos meus familiares, meus tios, tias, primos e primas, em especial, meu tio Sebastião por cuidar de Chico nos momentos que precisei me ausentar.

Ao pessoal da SUTIC.

Aos meus amados e queridos amigos e amigas, Rafaela Mendes, Mayara Cristina, Carolina Damasceno, Cris Dias, João Paulo Silva, Rodrigo Ieyasu, João Paulo Nunes, Luís Arthur, Jaíne Joice, Thiago Kiabo, Amanda Amorim, Marli Pereira, Rafaela Moura, Rubens Carlos, Olindina, Néilton, Luenya, Aluizio Guimarães e Gerson Teixeira. Vocês foram as pessoas com as quais pude contar nos momentos mais difíceis, sempre estarão em meu coração, ‘Sempre lavamos as mãos um do outro e juntos lavamos os pés’.

Aos leais Andrey, Leopoldo, Geomar, Lucas, Júnior e James, pessoas incríveis. É uma honra está com vocês.

Aos professores em especial Leo Casillo, Danielle Casillo, Judson Santiago, Hércio Wagner, Daniel Faustino, Paulo Henrique, Katia Cilene e Flávia Coelho pelo conhecimento a mim transmitida, vocês foram essenciais para minha formação.

A todos os companheiros de graduação pela ajuda no decorrer do curso, com muita satisfação: Igo Joctan, Isabelle Oliveira, Willyane Fonseca, Itagores Lira, Dylan Oliveira, Valdir Jr, Alfredo Lopes, Alexandre Jales, Victoria Iris, Gabrielly Freitas e Arthur Silva.

A todos vocês o meu imenso OBRIGADA!

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo de imagens geradas a partir de um sensor de ressonância de *plasmons* de superfície (RPS). As imagens provenientes do sensor RPS apresentam ruídos e deformações, que prejudicam a qualidade da resposta na incidência da curva em determinados pontos da imagem. Técnicas de suavização e realce foram aplicadas a fim de melhorar a qualidade das imagens geradas pelo sensor e consequentemente as curvas RPS geradas a partir dessas imagens. Após aplicadas as técnicas de Processamento Digital de Imagens (PDI), foi empregada a estratégia de reamostragem estatística fornecida pelo *Bootstrap* para estimar os intervalos de confiança entre as linhas/colunas das imagens, e assim, obter as curvas RPS que maximizem a sensibilidade do sensor para as substâncias H₂O (água deionizada e degaseificada), solução tampão de PBS (*Phosphate-buffered saline*) e a solução de Hipoclorito. Os resultados para a análise de sensibilidade demonstraram uma melhor interpretação desse trabalho por meio do método *Bootstrap* empregado, estimando entre os intervalos de confiança uma melhor resposta RPS.

Palavras-chave: Ressonância de *plasmons* de superfície (RPS), Sensor óptico, Método *Bootstrap*, Processamento Digital de Imagens (PDI).

ABSTRACT

This work presents a study of images generated from a surface plasmons resonance (SPR) sensor. The images from the SPR sensor present noise and deformations, that affect the quality of the response in the incidence of the curve in certain points of the image. Smoothing and enhancement techniques were applied in order to improve the quality of the images generated by the sensor and consequently the SPR curves generated from these images. After applying the Digital Image Processing (DIP) techniques, the statistical resampling strategy provided by Bootstrap was used to estimate the confidence intervals between the rows/columns of the images, and thus obtain the RPS curves that maximize the sensitivity of the sensor for H₂O substances (deionized and degassed water), PBS buffer solution (Phosphate-buffered saline) and Hypochlorite solution. The results of the sensitivity analysis showed a better interpretation of this work through the Bootstrap method used, estimating between the confidence intervals a better SPR response.

Keywords: Surface Plasmon Resonance (SPR), Optical sensors, Bootstrap resampling statistic, Digital Image Processing (DIP).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Imagem gerada a partir de um sensor SPR.....	11
Figura 2	- (a) H ₂ O original, (b) Hipo original, (c) PBS original e (d) Curvas SPR original das substâncias H ₂ O, Hipo e PbS.....	13
Figura 3	- (a) H ₂ O, (b) Hipo e (c) PBS. Imagens com presença de falhas.....	13
Figura 4	- Representação de uma curva RPS mínima e máxima.....	14
Figura 5	- Representação do brilho.....	17
Figura 6	- Esquema do processo <i>Bootstrap</i>	18
Figura 7	- Fotografia do PPBIO a) antes e b) depois da deposição de 50 nm de ouro. c) diagrama de blocos do sensor e d) fotografia do set-up experimental.....	21
Figura 8	- (a) H ₂ O, (b) Hipo e (c) PBS. Imagem RPS dividida em quatro regiões.....	22
Figura 9	- (a) Curva RPS do H ₂ O segmentada em 4 partes, (b) Curva RPS do Hipo segmentada em 4 partes e (c) Curva RPS do PBS segmentada em 4 partes.....	24
Figura 10	- Imagem Original do H ₂ O e a curva de RPS original gerada.....	25
Figura 11	- Imagem Original do Hipoclorito e a curva de RPS original gerada.....	26
Figura 12	- Imagem Original do PBS e a curva de RPS original gerada.....	26
Figura 13	- Técnicas de PDI no H ₂ O.....	28
Figura 14	- Curva SPR do H ₂ O com técnicas de PDI.....	29
Figura 15	- Técnicas de PDI do HIPO.....	29
Figura 16	- Curva SPR do HIPO com técnicas de PDI.....	30
Figura 17	- Técnicas de PDI do PBS.....	30
Figura 18	- Curva RPS do PBS com técnicas de PDI.....	31
Figura 19	- Curvas RPS com <i>Bootstrap</i> da solução H ₂ O com as amostras de B = 700, B = 1000 e B = 2000 para $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,1$	32
Figura 20	- Curvas RPS com <i>Bootstrap</i> da solução H ₂ O com as amostras B = 1000 para $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,1$	33
Figura 21	- Curvas RPS com <i>Bootstrap</i> da solução H ₂ O com as amostras B = 2000 para $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,1$	34
Figura 22	- Curvas RPS com <i>Bootstrap</i> da solução Hipoclorito com as amostras de B = 700 para $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,1$	35
Figura 23	- Curvas RPS com <i>Bootstrap</i> da solução Hipoclorito com as amostras de B = 1000 para $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,1$	36
Figura 24	- Curvas RPS com <i>Bootstrap</i> da solução Hipoclorito com as amostras de B = 2000 para $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,1$	37
Figura 25	- Curvas RPS com <i>Bootstrap</i> da solução PBS com as amostras de B = 700, para $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,1$	38
Figura 26	- Curvas RPS com <i>Bootstrap</i> da solução PBS com as amostras de B = 1000, para $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,1$	39
Figura 27	- Curvas RPS com <i>Bootstrap</i> da solução PBS com as amostras de B = 2000 para $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,1$	40
Figura 28	- Curvas RPS relação h ₂ o (inf) $\Leftrightarrow$ pbs (inf)	45
Figura 29	- Curvas RPS relação h ₂ o (sup) $\Leftrightarrow$ hipo (sup)	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Posição do valor mínimo (<i>pixel</i> mínimo) das curvas RPS para as substâncias H ₂ O, PBS e Hipo usando as três estratégias de segmentação.....	25
Tabela 2	- Posição do <i>pixel</i> que representa o valor de ressonância das imagens originais.....	26
Tabela 3	- Valores mínimos das curvas de refletividade das substâncias H ₂ O, PBS e Hipo.....	34
Tabela 4	- Valores mínimos das curvas de refletividade da substância H ₂ O obtidas com o <i>bootstrap</i>	41
Tabela 5	- Valores mínimos e máximos das curvas de refletividade da substância PBS.....	41
Tabela 6	- Valores mínimos e máximos das curvas de refletividade da substância Hipoclorito.....	42
Tabela 7	- Análise de sensibilidade H ₂ O -PBS.....	43
Tabela 8	- Análise de sensibilidade H ₂ O -Hipo.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

RPS	<i>Resonance of surface plasmon</i>
PDI	Processamento Digital de Imagens
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
H ₂ O	Molécula de gua
HIPO	Hipoclorito
PPBIO	Prisma Polimérico para aplicação BIOLógicas
AIM	<i>Angular Interrogation Mode</i>
B	Número de amostras <i>Bootstrap</i>
K _x	ngulo
A	<i>Alpha</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Objetivo Geral.....	14
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Ressonância de <i>Plasmons</i> de Superfície (RPS).....	16
2.2 Processamento Digital de Imagens.....	17
2.2.1 Brilho.....	18
2.2.2 Contraste.....	19
2.2.3 Binarização.....	19
2.2.4 Erosão.....	20
2.2.5 Dilatação.....	20
2.3 Método <i>Bootstrap</i>	20
3 METODOLOGIA.....	22
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Filtros de Realce e Suavização.....	25
4.2 Estimativas <i>Bootstrap</i>	32
4.3 Análise de Sensibilidade.....	41
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS.....	48

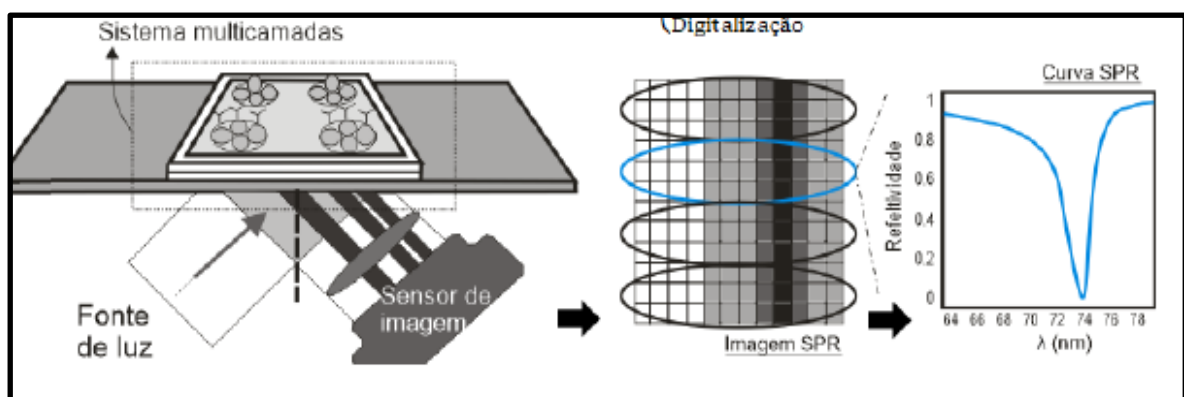
1 INTRODUÇÃO

A Ressonância de *Plasmons* de Superfície (RPS, do inglês *Surface Plasmons Resonance*) tem sido uma ferramenta promissora nos últimos anos com aplicações em instrumentos fotônicos, optoeletrônicos e sensores, devido às suas propriedades únicas, sendo empregada principalmente nas áreas químicas e biológicas (SRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

O fenômeno RPS ocorre devido à alta sensibilidade a variações mínimas de índice de refração na interface metal/dielétrico (SILVA, 2017). Essa sensibilidade decorre da excitação dos *plasmons* de superfície por uma onda eletromagnética *p*-polarizada e ocorre quando o número de onda dos *plasmons* de superfície (K_{sp}) iguala-se ao número de onda do feixe luminoso (K_p). Nessa condição de ressonância ($K_{sp} = K_p$) a energia dos fótons é absorvida pelos *plasmons* de superfície e um valor mínimo de refletividade é observado, determinando o ponto de operação do sensor (THIRSTRUP *et. al*, 2004).

A Figura 1 ilustra o funcionamento de um sensor RPS. De forma sucinta, a estrutura multicamadas é iluminada, sob condições bastante específicas, e a luz refletida (sinal) é capturada por um sensor de imagem (câmera), fornecendo assim uma assinatura óptica para a substância em análise. O sinal captado passa por processos de filtragem, tendo como objetivo minimizar ruídos e aumentar a faixa do sinal. Em seguida, a imagem é utilizada para gerar de forma gráfica a ressonância, denominado de curva RPS (OLIVEIRA, 2016).

Figura 1 – Imagem gerada a partir de um sensor RPS

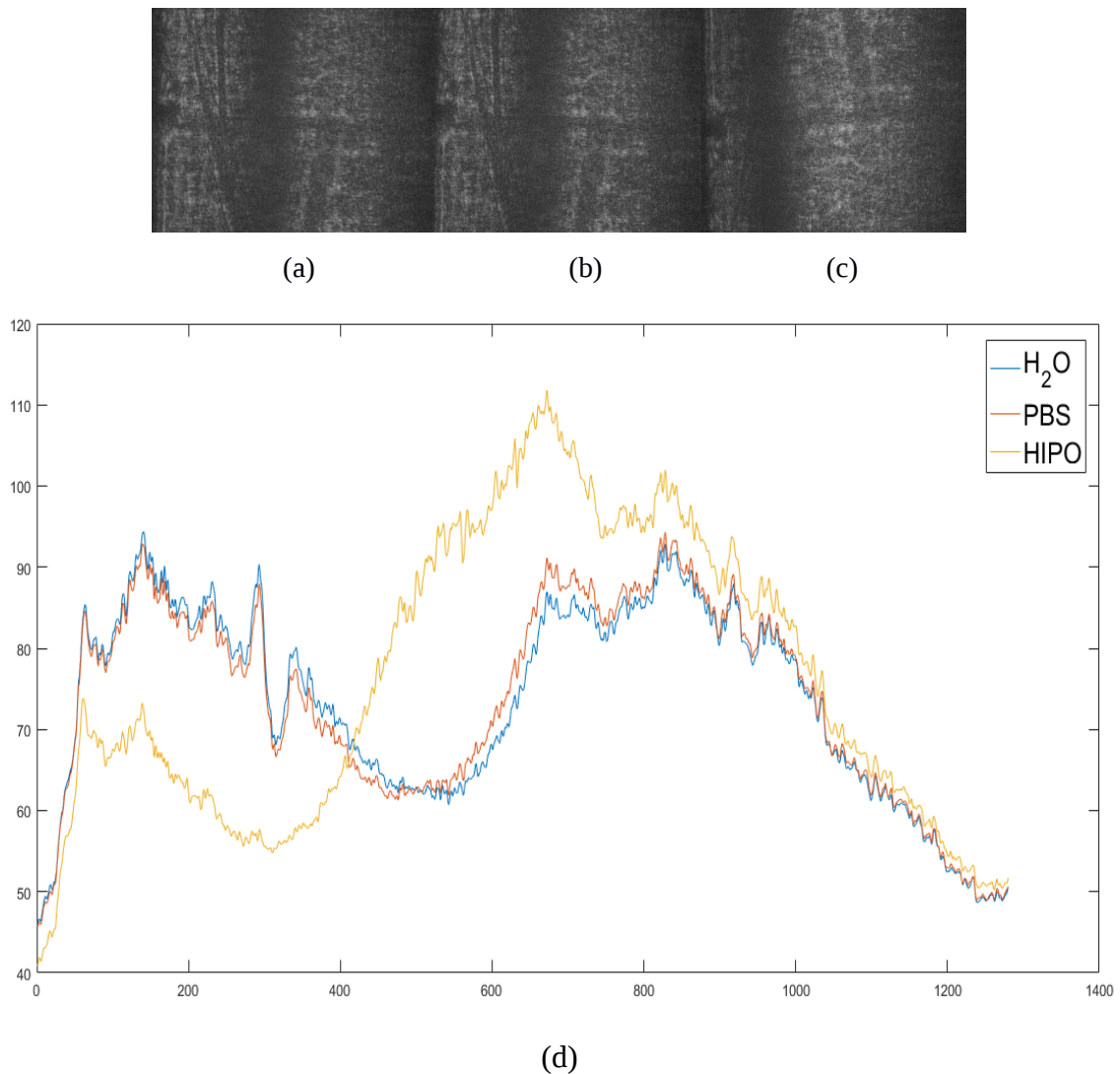


Fonte: Adaptada de Oliveira (2016).

O sensor RPS analisa fenômenos biológicos por meio da variação do índice de refração de cada substância. A posição do mínimo da curva RPS é proporcional ao índice de refração da substância presente no sensor. À medida que novas substâncias são admitidas, a posição do

mínimo da curva se desloca, indicando alteração no índice de refração ou concentração da substância. A Figura 2 apresenta as imagens RPS para as três substâncias utilizadas no trabalho: água deionizada e degaseificada (H_2O), solução tampão de PBS (*Phosphate-buffered saline*) e solução de Hipoclorito (Hipo). Na condição de ressonância é possível observar uma faixa escura na imagem, indicando a posição de ressonância. Além da imagem, as respectivas curvas RPS indicam a posição de ressonância através de seu valor mínimo. As substâncias possuem índices de refração diferentes, $H_2O = 1.33001$, $PBS = 1.33151$ e $Hipo = 1.34501$, o que indica as variações na posição de ressonância.

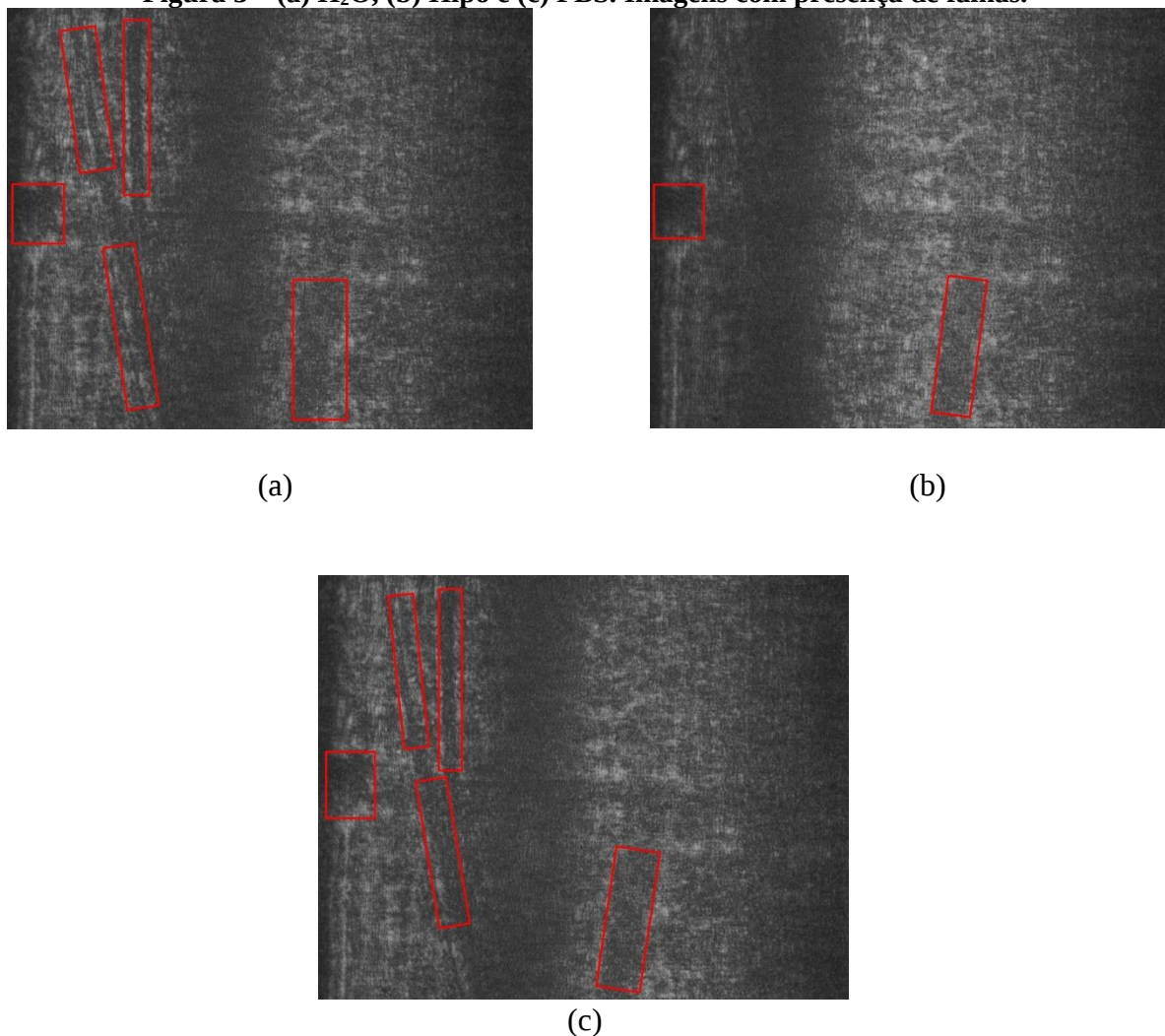
Figura 2 – (a) H_2O original, (b) Hipo original, (c) PbS original e (d) Curvas SPR original das substâncias H_2O , Hipo e PbS



Fonte: Da própria autora.

Com a aplicação do processamento digital de imagens, o uso de filtros de suavização e realce se fizeram necessárias para redução de ruídos para um tratamento viável dos dados recebidos pelo sensor RPS. Durante a captura as imagens apresentaram algumas falhas provenientes de fatores internos/externos, na qual podem deteriorar a qualidade da curva RPS em alguns pontos da imagem, tais falhas são destacadas como mostra a Figura 3.

Figura 3 – (a) H₂O, (b) Hipo e (c) PBS. Imagens com presença de falhas.



Fonte: Da própria autora.

A geração da curva RPS a partir da imagem RPS é realizada por meio da média entre as linhas que a compõe. Em geral, a curva RPS representa o valor médio de intensidade em cada *pixel*.

A detecção de falhas ou outros sinais, produzidos pela interação interno/externo com os analitos (substancias), podem apresentar algumas deformações como destacada pelos retângulos em vermelho muito próximas da concentração do composto alvo. Com as técnicas de processamento digital de imagens é possível minimizar essas falhas para se obter uma melhor incidência na curva em seu ponto de ressonância.

1.1 Objetivo Geral

Aplicar técnicas de Processamento Digital de Imagens para melhorar a qualidade de imagens obtidas com um sensor RPS. Após o tratamento das imagens, aplicamos o método *Bootstrap*, na qual detecta os respectivos pontos mínimos e máximos em relação a curva RPS original, realizando estimativas e testes de significância entre esses pontos, e assim, determinar qual a melhor resposta para a análise de sensibilidade das substâncias H₂O, PBS e Hipo.

1.2 Objetivos Específicos

- Estudar e implementar técnicas de Processamento Digital de Imagens;
- Aplicar o método *bootstrap*;
- Analisar as curvas RPS geradas;
- Calcular e analisar os valores de sensibilidade alcançados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nessa seção são apresentados os principais aspectos teóricos necessários para elaboração do trabalho. Inicialmente a ressonância de *plasmons* de superfície (RPS) é apresentada. Em seguida, as técnicas de PDI usadas nas imagens RPS. Com o uso das técnicas de PDI, aplica-se o método de reamostragem estatística *bootstrap*. Por fim, aborda-se a análise de sensibilidade da melhor resposta as curvas RPS geradas.

2.1 Ressonância de *Plasmons* de Superfície (RPS)

Um sensor RPS 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 (MEHROTRA, 2016).

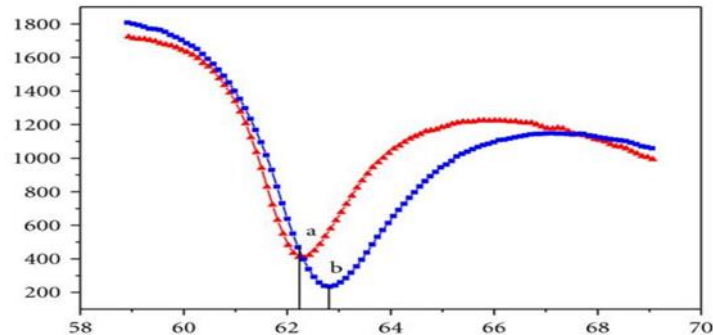
A ressonância de *plasmons* de superfície (RPS) é um fenômeno óptico-elétrico que vem sendo utilizado no desenvolvimento de sensores físico-químicos para as mais variadas aplicações (SANTOS *et. al*, 2016). Uma das principais características de sensores RPS é a sensível resposta à alteração no índice de refração nas proximidades da estrutura multicamada em função do material analisado (SCARANO *et. al*, 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 *plasmons* de superfície, e como resultado, o fóton é acoplado à esta onda (FAN, 2008).

Sob condições de reflexão interna e em uma certa combinação de ângulo de incidência de luz e comprimento de onda, a luz incidente, k_x , excita os *plasmons* de superfície. Desta forma, uma intensidade de campo elétrico vaza através da interface metal/dielétrico, o chamado campo de onda evanescente, na qual a linha escura na imagem caracteriza o momento e a posição da ressonância, definindo seu valor mínimo, e assim, quantificar a evolução temporal das substâncias (PEREIRA, 2014).

Para o presente trabalho, vale ressaltar que a resposta RPS é fornecida pelo sensor de imagem, representando sua assinatura óptica da substância em análise. Em geral, uma linha escura na imagem caracteriza o momento e a posição da ressonância, conforme apresentado

na Figura 4, os pontos mínimos a e b indicam a resposta do sensor para duas substâncias com índice de refração diferente.

Figura 4 – Representação de uma curva RPS mínima e máxima.



Fonte: Adaptada de Hafaid *et. al* (2009).

Com as técnicas de Processamento Digital de Imagens é possível observar o comportamento das curvas geradas decorrente de cada filtro utilizado nas imagens das soluções, enquanto que a técnica pelo método *bootstrap* obtém um novo conjunto em *pixel* por reamostragem.

Após as técnicas de PDI satisfatória, as imagens originais obtidas dos filtros de suavização e realce, determinou, a apresentação de uma melhor curva RPS, concretizando a etapa com a análise de sensibilidade da resposta em função do índice de refração para cada substância, fazendo uma analogia com os filtros de suavização e as curvas RPS das substâncias originais provenientes do sensor plasmônico.

Existem determinados fatores pertencentes ao sensor RPS que são determinantes para sua performance, como à habilidade de detectar um elemento específico em uma amostra, assim, como a estabilidade que constitui o grau de suscetibilidade a perturbações ambientais internas ou externas que podem causar um desvio nos sinais de saída podendo ocasionar pequenas falhas no momento de gerar a imagem (ESTRELA, 2016).

2.2 Processamento Digital de Imagens

Uma imagem pode ser definida como uma função bidimensional, $f(x, y)$, em que x e y são coordenadas espaciais (plano), e a amplitude de f em qualquer par de coordenadas (x, y) é chamada de intensidade ou nível de cinza da imagem nesse ponto. Quando x, y e os valores de intensidade de f são quantidades finitas e discretas, chamamos de imagem digital. Cada

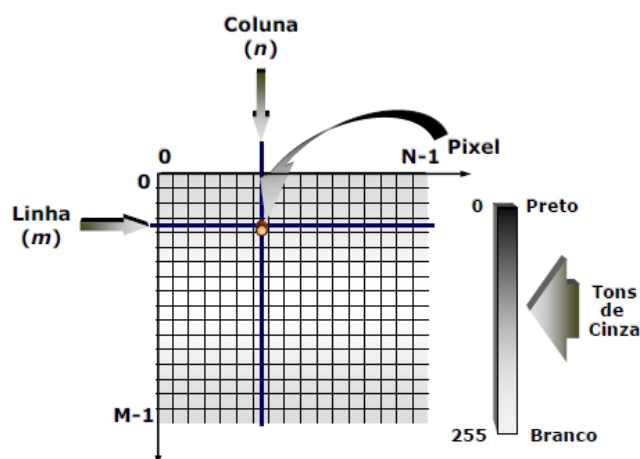
elemento de uma imagem digital é denominado de *pixel* (*picture element*). O campo do processamento digital de imagens se refere ao processamento de imagens digitais por um computador digital (GONZALEZ; WOODS, 2010).

Os elementos de um sistema de processamento de imagens genericamente falando permite representar desde sistemas de baixo custo até sofisticadas estações de trabalho utilizadas em aplicações que envolvem intenso uso de imagens. Ele abrange as principais operações que se pode efetuar sobre uma imagem, como aquisição, armazenamento, processamento e exibição (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

2.2.1 Brilho

A intensidade de brilho de uma imagem se dá através de uma função bidimensional contínua $f(x,y)$, na qual x e y são coordenadas espaciais e o valor de f em qualquer ponto (x,y) é proporcional à intensidade luminosa aplicada nas imagens em nível de cinza. Na Figura 6, apresenta-se a notação matricial usual para a localização de um *pixel* no arranjo de *pixels* de uma imagem. O primeiro índice denota a posição da linha, m , na qual o *pixel* se encontra, enquanto o segundo, n , denota a posição da coluna. Se a imagem digital contiver M linhas e N colunas, o índice m variará de 0 a $M-1$, enquanto n variará de 0 a $N-1$.

Figura 5 - Representação do brilho



Fonte: Adaptada de Queiroz; Gomes (2001).

A intensidade luminosa no ponto (x,y) pode ser decomposta em: (i) componente de iluminação, $i(x,y)$, associada à quantidade de luz incidente sobre o ponto (x,y) ; e a componente de reflectância, $r(x,y)$, associada à quantidade de luz refletida pelo ponto (x,y) (QUEIROZ; GOMES, 2001). O produto de $i(x,y)$ e $r(x,y)$ resulta em:

$$f(x,y) = i(x,y).r(x,y) \quad (1)$$

Na qual $0 < i(x,y) < \infty$ e $0 < r(x,y) < 1$, sendo $i(x,y)$ dependente das características da fonte de iluminação, enquanto $r(x,y)$ dependente das características das superfícies dos objetos (QUEIROZ; GOMES, 2001).

2.2.2 Contraste

O conceito de contraste da imagem é a diferença entre os níveis superiores e inferiores de intensidade presentes em uma imagem. Quando um número significativo de *pixels* em uma imagem possui uma alta faixa dinâmica, podemos esperar que a imagem tenha um alto contraste. Por outro lado, uma imagem com baixa faixa dinâmica normalmente tem uma aparência embaçada.

As unidades de variância são em valores de intensidade elevados ao quadrado. Ao comparar valores de contraste, no entanto, normalmente utilizamos o desvio padrão (raiz quadrada da variância), porque suas dimensões são diretamente em termos de valores de intensidade. A variância é uma medida de dispersão dos valores de z em relação à média, de forma que se trata de uma medida útil do contraste da imagem. Em geral, o n -ésimo momento da variável aleatória z em relação à média é definido na equação (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

$$\mu(z) = \sum_{k=0}^{L-1} (z_k - m)np(z_k) \quad (2)$$

Similarmente as técnicas de manipulação de contraste, as técnicas de filtragem de uma imagem implicam transformações pixel a pixel. Todavia, diferem daquelas à medida que a alteração efetuada em um pixel da imagem filtrada depende não apenas do nível de cinza do *pixel* correspondente na imagem original, mas também dos valores dos níveis de cinza dos

pixels situados em sua vizinhança. Sendo uma operação local, a filtragem espacial é uma transformação dependente do contexto em que se insere cada pixel considerado (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

2.2.3 Binarização

A técnica de segmentação dos níveis de cinza, para apenas dois níveis é denominada de binarização de uma imagem. Determina-se um valor de limiar e todos os valores dos *pixels* menores ou iguais a esse valor são mapeados em 0, enquanto os demais são mapeados em 1 (GONZALEZ; WOODS, 2010). O processo de binarização resulta em uma imagem preta e branca, a qual podem ser empregadas no sensoriamento RPS.

Binarização é uma abordagem para a segmentação fundamentada na análise da similaridade de níveis de cinza, de modo a extrair objetos de interesse mediante a definição de um limiar T que separa os agrupamentos de níveis de cinza da imagem. Uma das dificuldades do processo reside na determinação do valor mais adequado de binarização, do ponto de separação dos pixels da imagem considerada (QUEIROZ; GOMES, 2001).

2.2.4 Erosão

Erosão é umas das operações elementares da Morfologia Matemática, na qual a erosão é a interseção de todos os conjuntos obtidos a partir de translações dos *pixels* com conjuntos de Z^2 da imagem (A) pela reflexão do elemento estruturante (B), através da equação:

$$A \ominus B = \{ Z \mid (B)_Z \subset A \} \quad (3)$$

Na erosão, a partir da qual são removidos da imagem os *pixels* que não atendem a um dado padrão a erosão reduz as dimensões do objeto. Objetos menores do que os elementos estruturantes são eliminados e o número de componentes pode aumentar. Via de regra, a construção de sistemas morfológicos é implementada a partir da concepção do problema e da seleção dos operadores mais adequados à solução de interesse. A adequação de operadores constitui um dos grandes problemas encontrados na especificação dos elementos estruturantes (QUEIROZ; GOMES, 2001).

2.2.5 Dilatação

A dilatação é a união de todos os conjuntos obtidos a partir de translações dos *pixels* da imagem pelo elemento estruturante. Em geral, a dilatação faz com que o objeto cresça no tamanho. Buracos menores são eliminados e o número de componentes pode diminuir (QUEIROZ; GOMES, 2001). A dilatação de A por B é, então, o conjunto de todos os deslocamentos, z , de forma que $\hat{B}_z$ e A se sobreponham pelo menos por um elemento, através da equação:

$$A \oplus B = \{ z \mid (\hat{B})_z \cap A \neq \emptyset \} \quad (4)$$

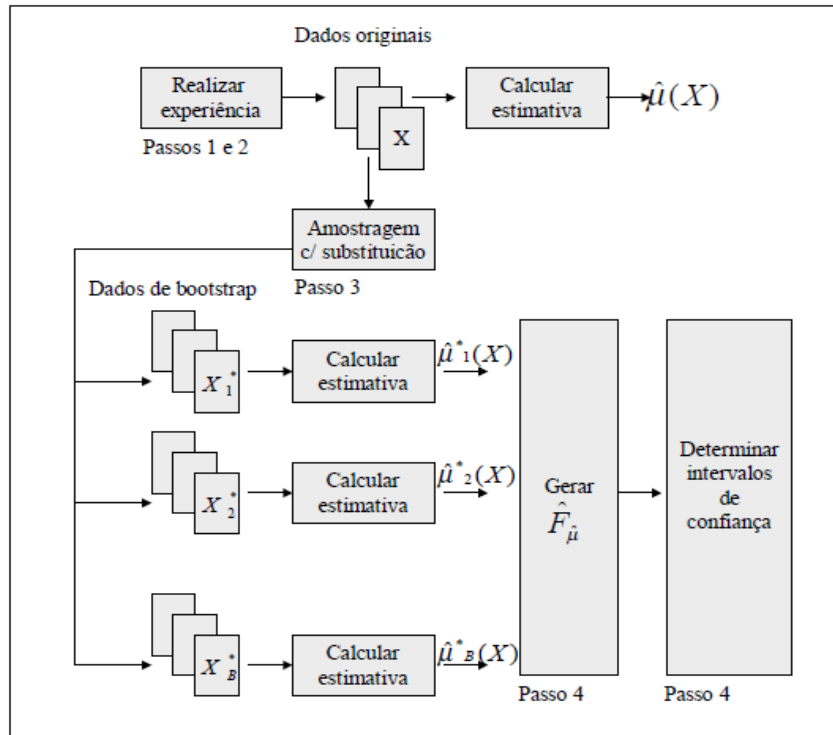
A aplicação de uma transformação de dilatação em uma imagem sem a especificação de um elemento estruturante, não produzirá nenhum efeito (QUEIROZ; GOMES, 2001). O processo de dilatação consiste em obter a reflexão de B sobre sua origem e depois deslocar esta reflexão de x . A dilatação de A por B é, então, o conjunto de todos os x deslocamentos para os quais a interseção de $(\hat{B})_x$ e A inclui pelo menos um elemento diferente de zero (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

2.3 Método *Bootstrap*

Operacionalmente o método *Bootstrap* é uma técnica que consiste em realizar amostragens de tamanho igual ao da amostra original com reposição da mesma. As etapas para realizar o *Bootstrap* são elencadas na Figura 6 que consiste no processo de realizar n amostras originando uma amostra *bootstrap*.

Este procedimento deve ser repetido para que se obtenha B amostras *bootstrap*. Em posse dessas B amostras, é possível construir intervalos de confiança dentro da região de interesse. Essa distribuição estimada é utilizada para realizar inferências e tirar informações sobre o parâmetro em estudo, e determinar, os pontos mínimos e máximos para cada uma das substâncias. Assim, é possível obter a distribuição *Bootstrap* e testar hipóteses, conforme apresentada na Figura 6 (EFRON, 1993).

Figura 6 – Esquema do processo *Bootstrap*



Fonte: Adaptação de Efron (1993).

Essa técnica *Bootstrap* permite aproximar a distribuição de uma variável aleatória pela distribuição empírica baseada em uma amostra de tamanho finito. A amostragem é feita com reposição, da distribuição da qual os dados são obtidos (Alves, 2013). A ideia básica deste método é estimar características desejadas reproduzindo-se o mecanismo probabilístico gerador dos dados originais após as técnicas de Processamento Digital de Imagens aplicadas.

O *bootstrap* aborda o cálculo do intervalo de confiança de parâmetros em circunstâncias em que outras técnicas não são aplicáveis, em particular a equação (5) demonstra, os respectivos pontos mínimos e máximos para a curva *Bootstrap* original. Em outras palavras, pode-se produzir intervalos de confiança provenientes de diferentes amostras independentes de mesmo tamanho. Assim o intervalo de confiança da média com variância conhecida é dado por:

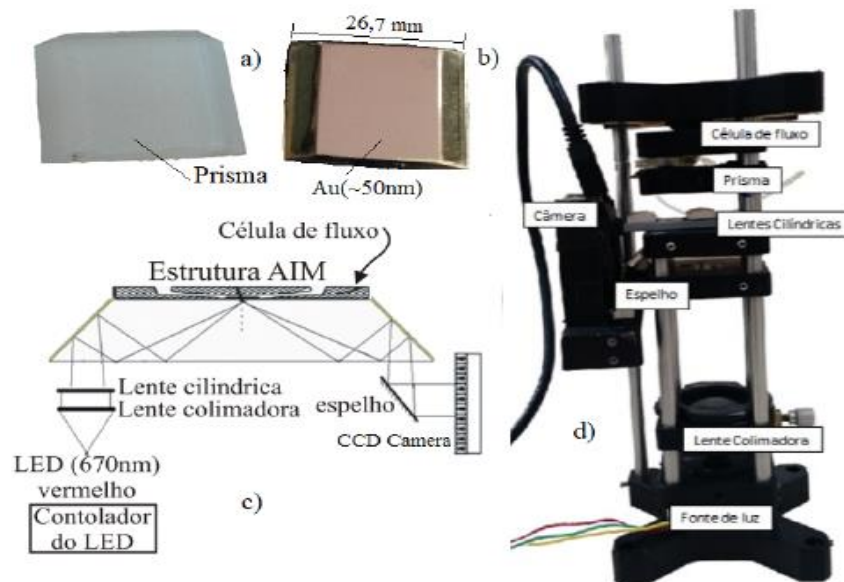
$$IC(\mu; 1 - \alpha) = \left(\bar{X} - z_{\frac{\alpha}{2}} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \bar{X} + z_{\frac{\alpha}{2}} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right)$$

(5)

3 METODOLOGIA

Foi utilizado o software MATLAB *MathWorks* para o processamento e análise das imagens em escala de cinza das substâncias H₂O, Hipoclorito e PBS, geradas a partir do sensor plasmônico. Os dados experimentais das soluções foram obtidos com o sensor RPS baseado no PPBIO (Prisma Polimérico para aplicação BIOLógicas) (GOMES *et. al*, 2019) presente no laboratório GESyCA – LCC – UFRSA. Devido a sua geometria trapezoidal, o PPBIO torna menos dispendiosa a instrumentação de um sensor RPS por evitar partes móveis e/ou rotacionais. As paredes laterais inclinadas do PPBIO são especulares para facilitar a reflexão da luz incidente (OLIVEIRA *et. al*, 2014). A Figura 7 apresenta imagens do PPBIO, bem como ilustra os detalhes dos componentes utilizados na fabricação do sensor. O sensor opera no denominado modo de interrogação angular (AIM - *Angular Interrogation Mode*), em que o feixe de luz incidente é monocromático (comprimento de onda fixo) e variando o ângulo de incidência obtém-se a condição de ressonância (OLIVEIRA *et. al*, 2014).

Figura 7 – Fotografia do PPBIO a) antes e b) depois da deposição de 50 nm de ouro. c) diagrama de blocos do sensor e d) fotografia do set-up experimental



Fonte: Adaptada de Gomes *et. al* (2019).

Com as imagens originais (geradas pelo sensor) serão aplicadas as técnicas de PDI objetivando acentuar a posição de mínimo. Além disso, será realizada uma inspeção visual na imagem a fim de decidir qual(ais) técnica(s) deve(em) ser aplicada(s). Após isso, será

analisado as formas de gerar curvas SPR a partir das imagens suavizadas. O método *Bootstrap* foi aplicado e o resultado comparado com a segmentação manual. Para estimativa de reamostragem com parâmetros de $B = 700$, $B = 1000$ e $B = 2000$ para estimar em pixel de acordo com a dimensão das imagens. O quanto estas estimativas são prováveis será determinada pelo intervalo de confiança $(1 - \alpha)$, para $\alpha \in (0,1)$.

Para o resultado dos parâmetro em cada substância, apresentaram-se os intervalos de confiança *bootstrap* segundo a notação $[L_I(x); L_S(x)]$ em que $L_I(x)$ é o limite inferior do intervalo e $L_S(x)$ é o limite superior do intervalo (Alves, 2013), para os intervalos com $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$ de acordo com as estatísticas amostrais.

$$[L_I(x), L_S(x)] = [\hat{\theta}_{(\frac{\alpha}{2})}^*, \hat{\theta}_{(1-\frac{\alpha}{2})}^*]$$

(6)

Dentre os intervalos de confiança *bootstrap* existem intervalos de confiança que apresentam melhores resultados, ou seja, é possível estabelecer o intervalo de confiança *bootstrap* adequado para cada tipo de substância analisada. Em geral as distribuições *bootstrap* estão centradas nas estimativas calculadas com as amostras originais (Alves, 2013).

Por fim, realiza-se a extração da posição de ressonância das imagens e compara-se deslocamento do mínimo a fim de computar os valores de sensibilidade para determinar sua viabilidade entre as curvas. Esta análise é fundamental para a tomada de decisão de uma melhor resposta RPS nas perspectivas de interesse, simulando para as diferentes soluções em cada intervalo de confiança.

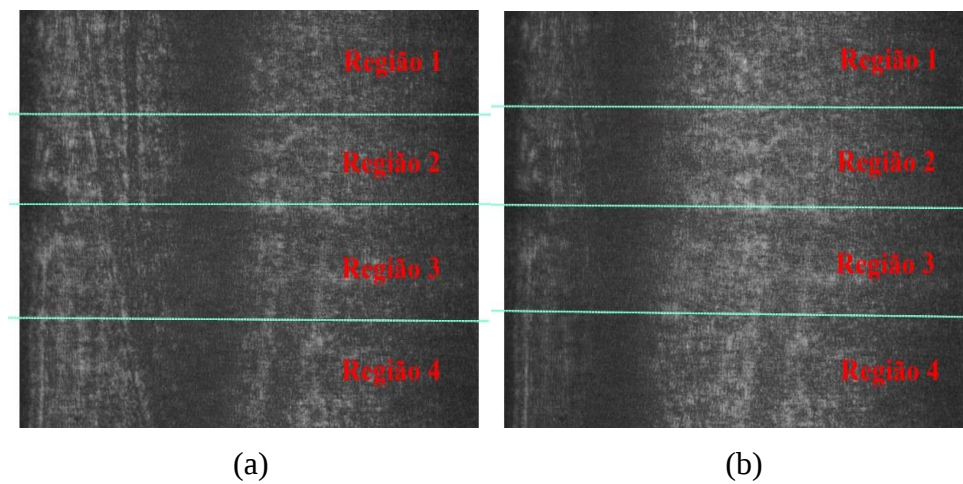
As variáveis consideradas para a análise em questão foram a relação H_2O -PBS e H_2O -Hipoclorito, na qual qualquer alteração entre os limites inferiores e limites superiores implicam consequentemente na alteração dessa análise, de quais variáveis sensíveis e o grau de sensibilidade. É possível estimar o intervalo e identificar as variáveis que mais influenciam de maneira significativa para determinar a análise de sensibilidade.

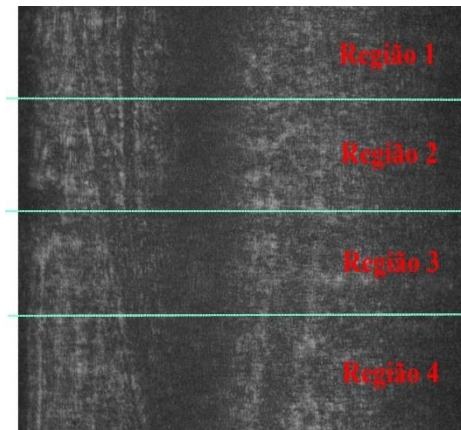
4 RESULTADOS

Os resultados desse trabalho consistem em agregar as técnicas de PDI nas imagens adquiridas por meio do sensor RPS, comparando os resultados entre as curvas RPS originais com as curvas após aplicação das técnicas de PDI, sendo o método *Bootstrap* empregado com vistas nas melhorias das curvas RPS, e assim, dispor de uma melhor interpretação da análise de sensibilidade.

É importante destacar que existiu a preocupação com as imagens no decorrer do processamento, devido à presença de sombreamentos laterais de tonalidade (extremidade da câmera) provenientes de fatores intrínsecos a instrumentação do sensor RPS utilizado para adquirir as imagens. Esse sombreamento pode impossibilitar a convergência do método de reamostragem estatística *bootstrap* e da detecção do mínimo. Para contornar essas falhas, as imagens foram então segmentadas em 4 regiões i) Região 1, ii) Região 2 iii) Região 3 e iv) Região 4, para averiguar qual melhor ponto mínimo entre as partes. A Figura 8 apresenta as curvas RPS para as três substâncias com as quatro estratégias de segmentação.

Figura 8 – (a) H₂O, (b) Hipo e (c) PBS. Imagem RPS dividida em quatro regiões



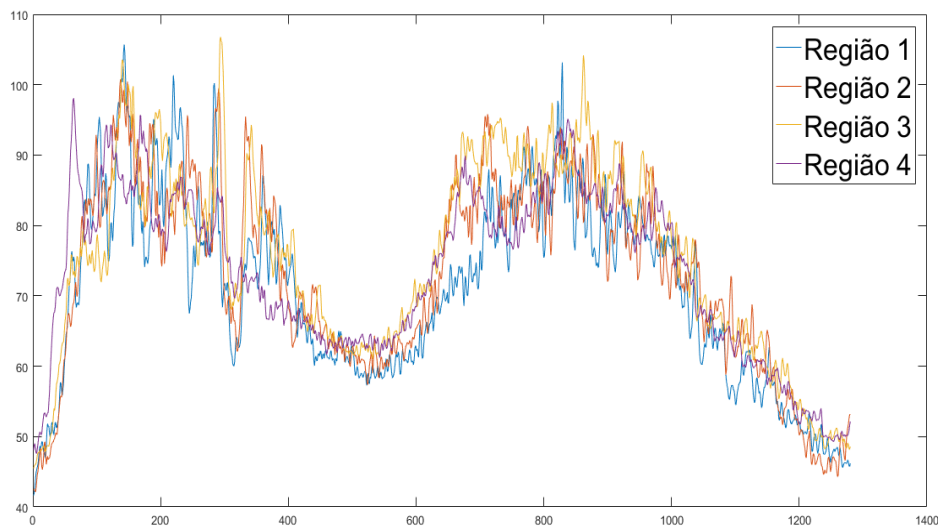


(c)

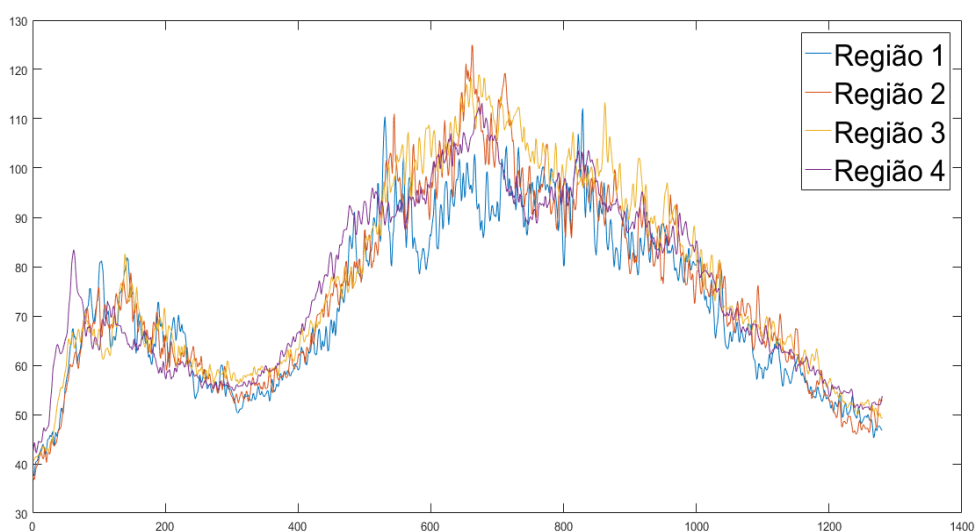
Fonte: Da própria autora.

Não há um número ideal para subdividir a imagem em regiões. Essa é uma estratégia dependente da aplicação, e em muitos casos, feita de forma manualmente pelo projetista do sensor. Outras estratégias podem ser empregadas para a geração da curva. É possível dividir logicamente a imagem em regiões, em que cada região possuirá sua respectiva curva RPS, conforme Figura 9. A divisão lógica pode fornecer curvas RPS com menos ruídos, especialmente se há falhas localizadas em uma única região da imagem.

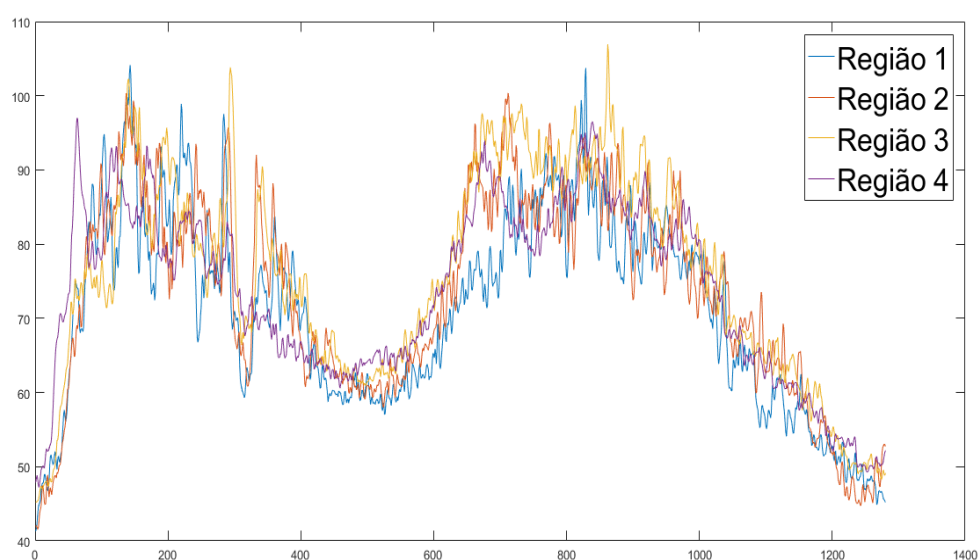
Figura 9 – (a) Curva RPS do H₂O segmentada partes em 4 partes, (b) Curva RPS do Hipo segmentada em 4 partes e (c) Curva RPS do PBS segmentada em 4 partes



(a)



(b)



(c)

Fonte: Elaborada pela autora.

A estratégia abordada para apresentar as quatro regiões foi dividir a quantidade de *pixel* total de acordo com a região. As duas primeiras regiões com $248\text{pixel}/2$ e as duas últimas com $512\text{pixel}/2$. A região 1 apresentou uma melhor curva RPS em profundidade para todas as substâncias por dispor de poucas falhas, em relação as demais curvas geradas, com um aspecto bastante ruidoso. Os valores mínimos das curvas RPS proveniente de cada região estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Posição do valor mínimo (*pixel* mínimo) das curvas RPS para as substâncias H₂O, PbS e Hipo usando as três estratégias de segmentação

Regiões	H ₂ O	PBS	HIPO
1	548	469	308
2	525	526	304
3	509	487	382
4	532	498	311

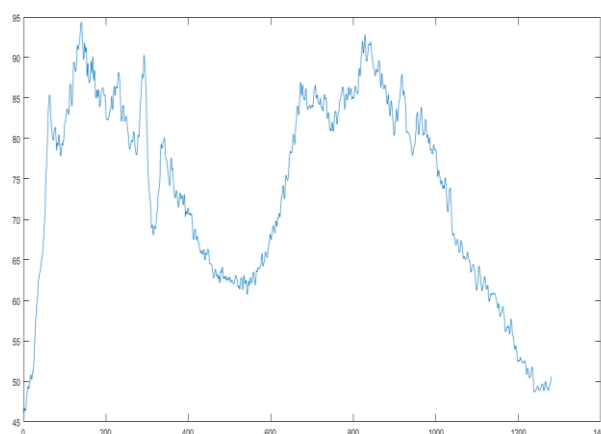
Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores apresentados na Tabela acima retratam os pontos mínimos das substâncias para cada uma das regiões analisadas, na qual o H₂O apresentou uma incidência no ponto mínimo de ressonância na região 3, o PBS apresentou ponto mínimo na região 1 e o Hipo apresentou um melhor ponto do mínimo na região 2. A seguir serão apresentados os resultados obtidos com as técnicas de PDI e com a análise *bootstrap*.

4.1 Filtros de Realce e Suavização

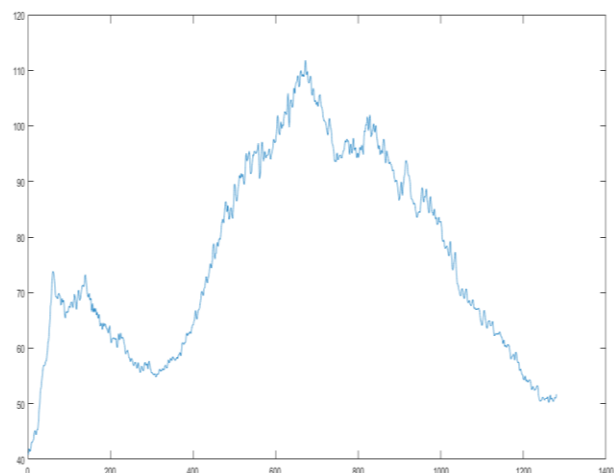
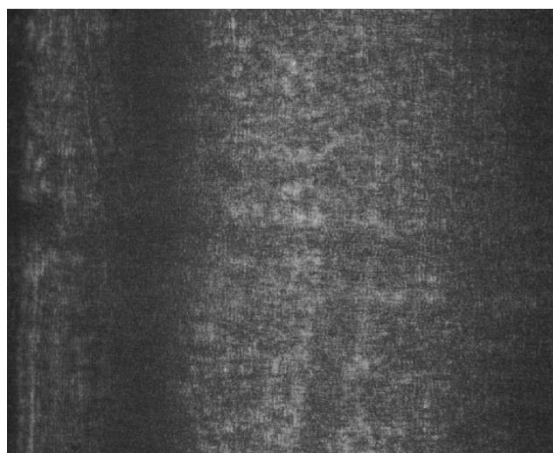
Nas Figuras 10, 11 e 12 são exibidas as substâncias originais em escala de cinza das soluções H₂O, Hipoclorito e PBS, juntamente com suas curvas RPS originais provenientes do sensor, sem nenhuma técnica de PDI, tampouco o uso do método *Bootstrap*. Na Tabela 2, é demonstrada seus respectivos pontos mínimos.

Figura 10 – Imagem Original do H₂O e a curva de RPS original gerada



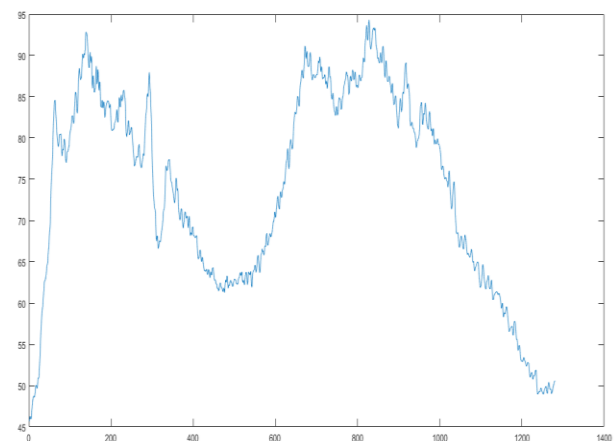
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 – Imagem Original do Hipoclorito e a curva de RPS original gerada



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 12 – Imagem Original do PBS e a curva de RPS original gerada



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 – Posição do *pixel* que representa o valor de ressonância das imagens originais

Substância	Posição do <i>Pixel</i> mínimo
H ₂ O	542
PBS	476
Hipoclorito	310

Fonte: Elaborada pela autora.

As técnicas de processamento digital de imagens foram aplicadas analisando a media, ao invés de separar por regiões, em cima das imagens originais (adquiridos pelo sensor RPS), em prol de melhorias do aspecto visual das estruturas das imagens, e assim, dispor de uma

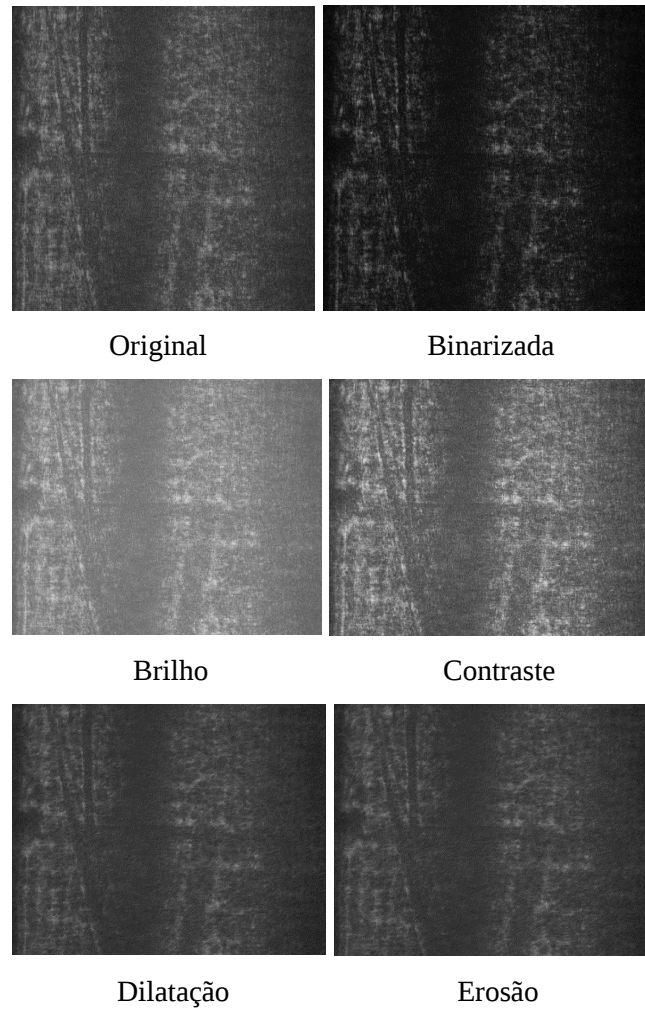
melhor interpretação da análise de sensibilidade. Técnicas de realce e suavização foram então aplicadas para redução de ruídos. As Figuras 13, 15 e 17 apresentam os resultados da aplicação das técnicas de morfologia matemática para erosão e dilatação, filtro para ajuste de brilho e contraste; e limiarização por binarização.

Através das respectivas curvas RPS, apresentadas nos gráficos das figuras 14, 16 e 18 é possível visualizar a refletividade em função do *pixel* após a aplicação das técnicas de PDI. De maneira geral, as técnicas impactam diretamente na profundidade do mínimo da curva, acentuando-o (erosão e brilho) ou mitigando-o (contraste e dilatação). Curvas com mínimo mais nítido apresentam melhores resultados para distinção entre diferentes substâncias.

O filtro de ajuste do brilho e a morfologia matemática por meio da erosão, separam as regiões de interesse e não interesse através da escolha de um ponto de corte representado por *pixel* em escala de cinza. No brilho utilizou intensidade 60 em função da sua coordenada *y* para definir o aumento do brilho em torno da imagem, intensificando sua luminosidade tanto nas partes mais claras como os contornos, assim como a região de interesse (faixa escura). Enquanto no contraste representa a diferenciação entre as regiões claras e escuras, de modo a redistribuir os tons de cinza dos *pixels* de uma imagem elevando o contraste na faixa de todos os níveis de cinza. Para a binarização determinou-se um valor de limiar de 180, e todos os valores dos *pixels* menores ou iguais a esse valor são mapeados em 0, enquanto os demais são mapeados em 1.

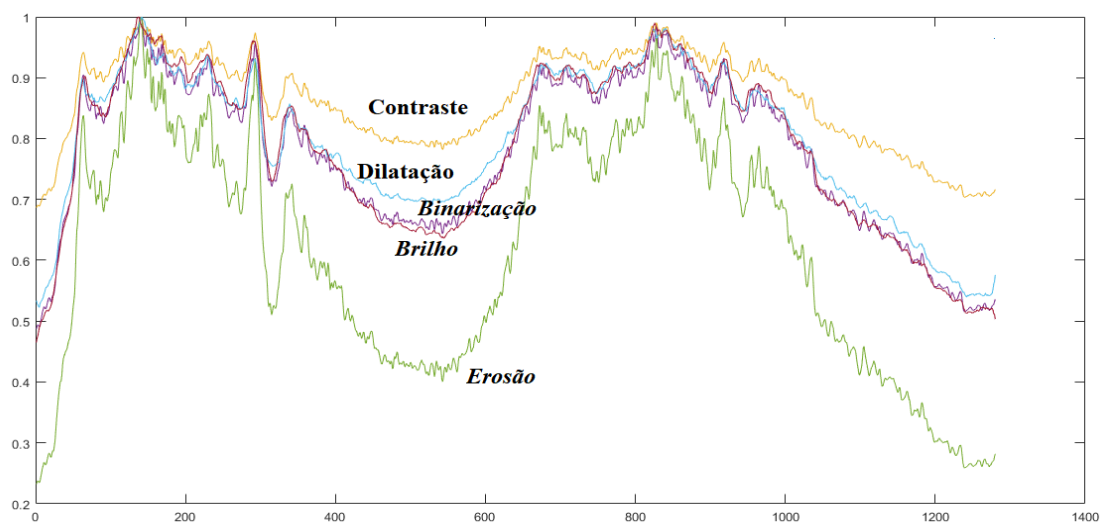
Nas operações elementares da Morfologia Matemática, na qual a erosão é a interseção de todos os conjuntos obtidos a partir de translações dos *pixels* da imagem pela reflexão do elemento estruturante $B = 10$ que gerou efeitos de eliminação de áreas de tamanho inferior ao tamanho do elemento estruturante. O resultado do brilho e erosão para as substâncias H₂O, PBS e Hipo apresentaram melhoria em sua estrutura visual principalmente na região que compõe a faixa escura gerando incidência da curva RPS bastante significativa em torno do eixo *x*, logo, a largura da linha escura também diminuiu deixando a imagem mais nítida, havendo uma variação significativa em profundidade em relação ao eixo *y*, na qual é perceptível, destacando o valor mínimo da curva de refletividade das substâncias.

Figura 13 – Técnicas de PDI no H₂O



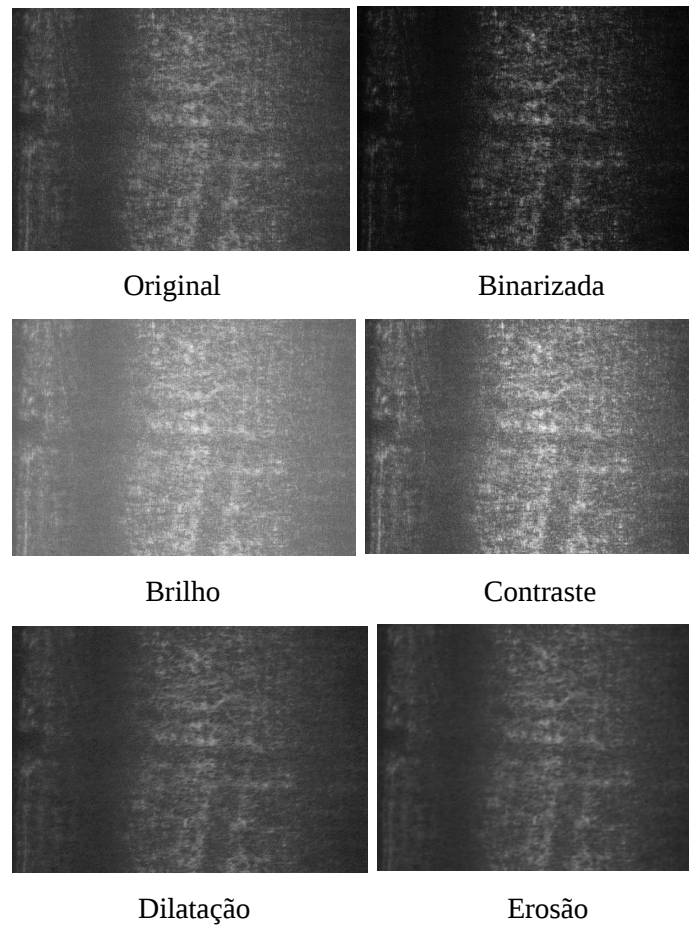
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14 – Curva RPS do H₂O com técnicas de PDI



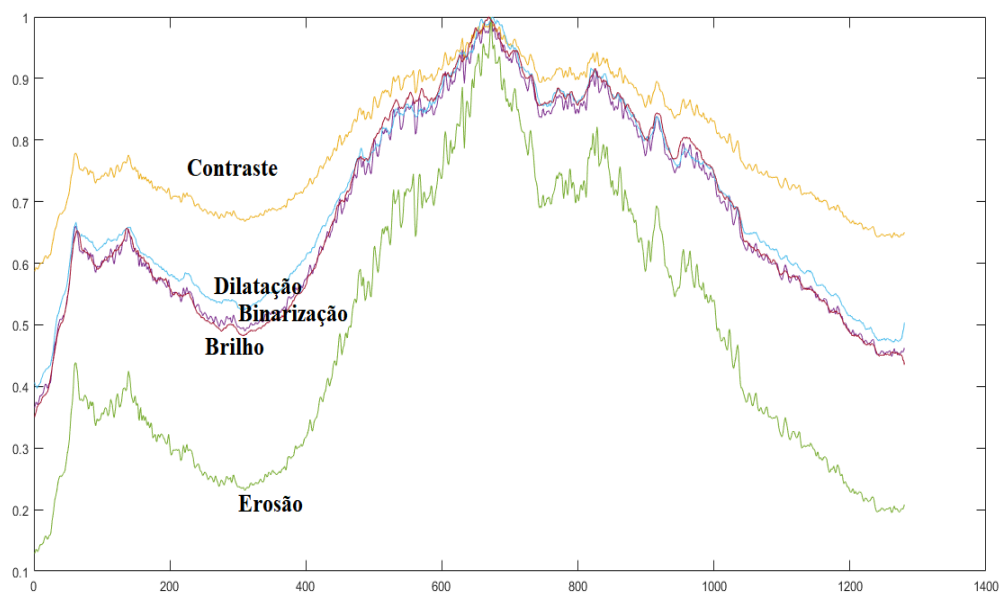
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 – Técnicas de PDI do HIPO



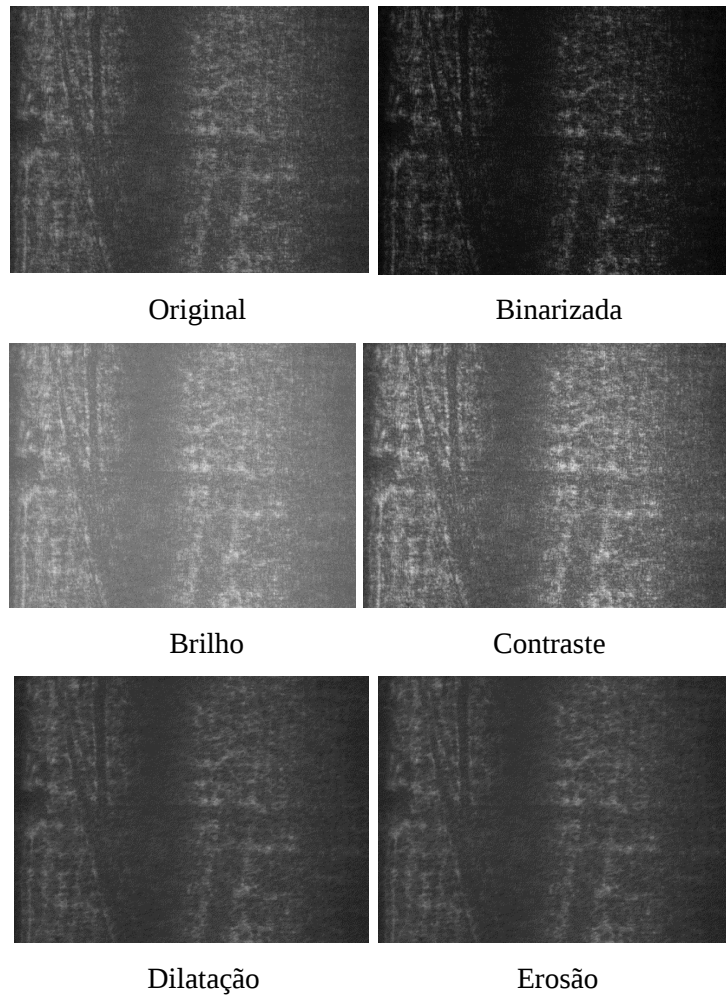
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 – Curva RPS do HIPO com técnicas de PDI



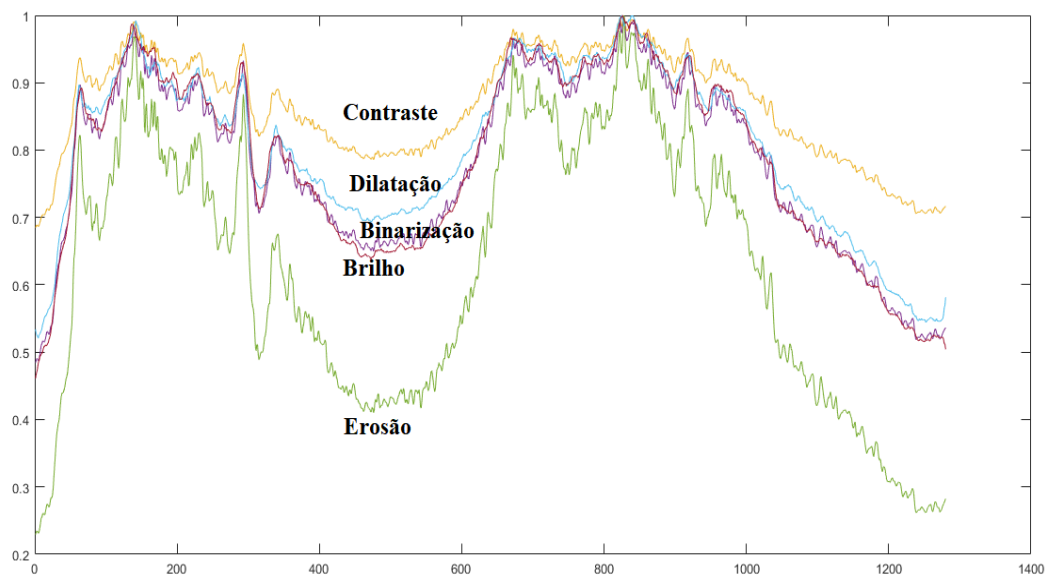
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 – Técnicas de PDI do PBS



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18 – Curva RPS do PBS com técnicas de PDI



Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 3 define as posições de ressonância (*pixel*-eixo X e refletividade - eixo Y), obtidos com cada uma das técnicas empregadas. Ao realizar as técnicas de PDI, a melhor combinação (erosão) a partir do sensor, efetuou-se o método estatístico *bootstrap* para as amostras de $B = 700$, $B = 1000$ e $B = 2000$ para os intervalos de $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$ em relação ao *pixel*-ângulo dada $\theta_{(p)} = -0.0070p + 72.765$, sendo p a posição do *pixel*. Por fim, o cálculo da sensibilidade dessa resposta é dada por $S = \frac{\Delta\theta}{\Delta n}$, na qual $\Delta\theta$ é a função do índice de refração de cada substância usada e Δn é a variação entre os mínimos de cada substância (OLIVEIRA *et. al*, 2012).

Tabela 3 – Valores mínimos das curvas de refletividade das substâncias H₂O, PBS e Hipo

Filtros	H ₂ O	PBS	Hipo
Binarização	x = 542; y = 20.18	x = 476; y = 21.09	x = 311; y = 0.3048
Contraste	x = 543; y = 33.74	x = 476; y = 0.3304	x = 311; y = 0.3048
Erosão	x = 529; y = 54.94	x = 473; y = 54.55	x = 309; y = 48.85
Dilatação	x = 545; y = 68.98	x = 473; y = 54.55	x = 306; y = 48.81
Brilho	x = 542; y = 120.8	x = 477; y = 121.6	x = 310; y = 114.8

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Estimativas *Bootstrap*

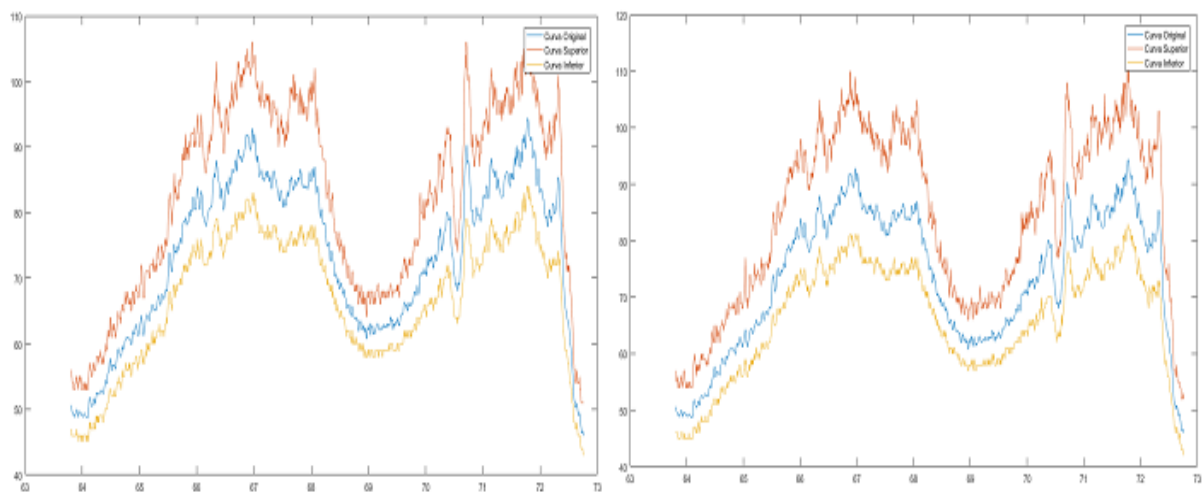
A Aplicação do método *Bootstrap* empregado neste trabalho é uma técnica estatística não paramétrica computacionalmente intensiva de reamostragem (EFRON, 1993), e tem como finalidade obter a reorganização dos pixels dentro região de interesse na dimensão da imagem, visando apresentar uma melhor curva RPS provenientes das técnicas de PDI analisadas.

O *bootstrap* não representa uma melhoria no aspecto visual da imagem, mas uma reorganização dos *pixels* para se obter uma melhor resposta RPS após aplicado o operador elementar da Erosão. Para isto, estimou-se uma distribuição de probabilidade através da relação *pixel*-ângulo dada por $\theta_{(p)} = -0.0070p + 72.765$, realizando testes de significância em cima de imagens geradas pelo sensor plasmônico.

O *bootstrap* foi configurado para gerar B amostras de 700, 1000 e 2000 para intervalos de confiança de 90%, 95% e 99% para as curvas RPS de cada substância. O *bootstrap*

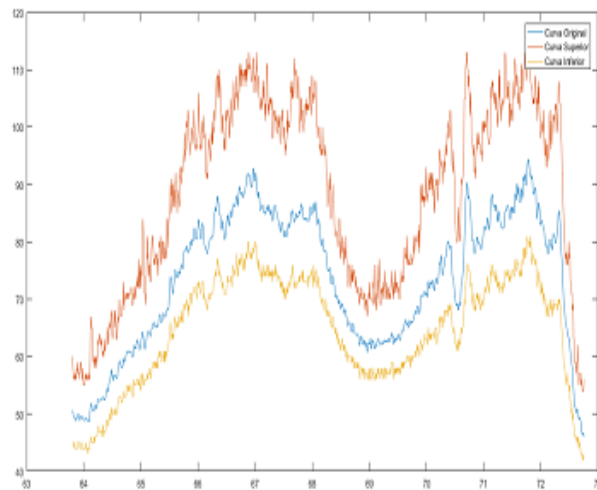
apresenta as curvas referentes aos limites inferiores (inf) e superiores (sup) em cada intervalo de confiança percorrendo a média de cada linha/coluna das imagens. As curvas em tonalidade (amarela) representa as curvas inferiores, curvas (vermelhas) representa as curvas superiores e as curvas (azuis) representa as curvas originais.

Figura 19 – Curvas RPS com *Bootstrap* da solução H₂O com as amostras de $B = 700$ para $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$



(a) H₂O com $\alpha = 0,1$ e $B = 700$

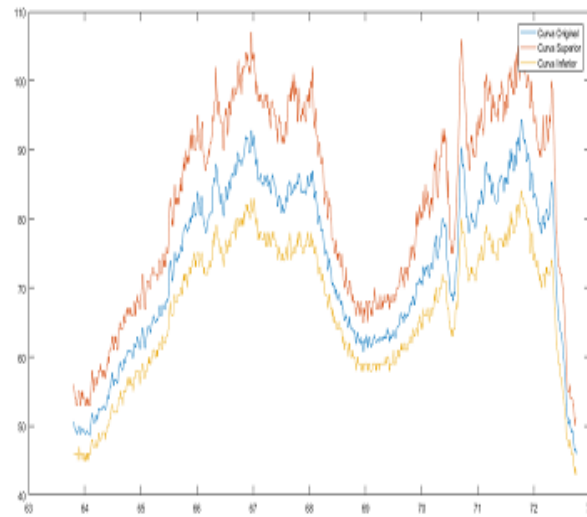
(b) H₂O com $\alpha = 0,05$ e $B = 700$



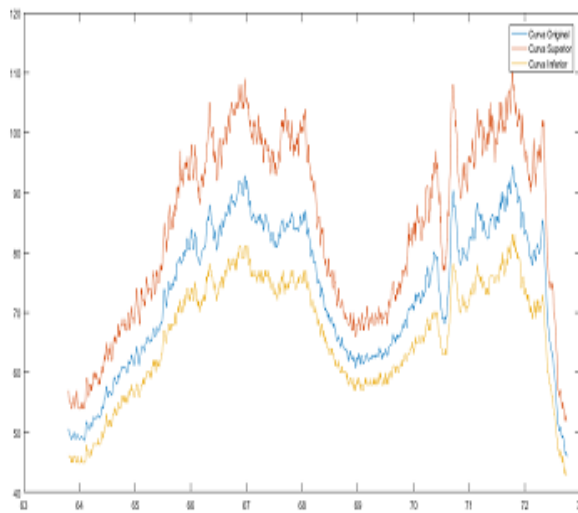
(c) H₂O com $\alpha = 0,01$ e $B = 700$

Fonte: Elaborada pela autora.

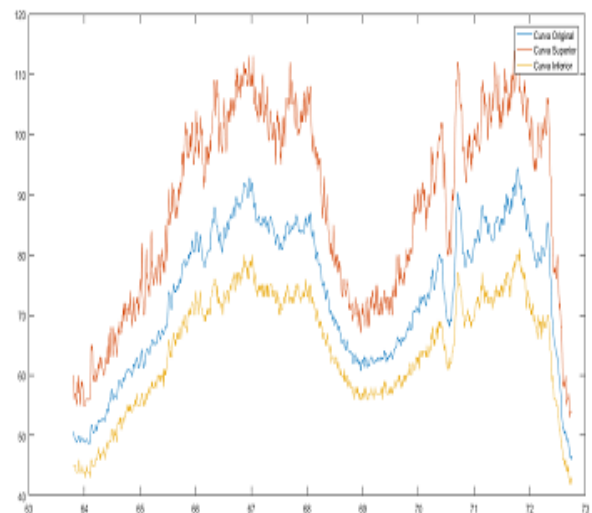
Figura 20 – Curvas RPS com *Bootstrap* da solução H₂O com as amostras B = 1000 para $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$



(d) H₂O com $\alpha = 0,1$ e B = 1000



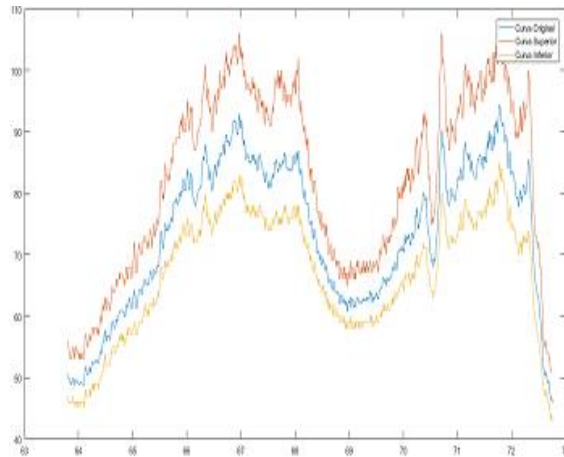
(e) H₂O com $\alpha = 0,05$ e B = 1000



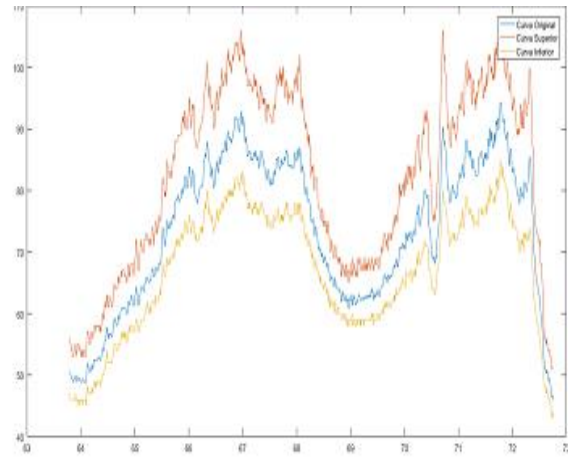
(f) H₂O com $\alpha = 0,01$ e B = 1000

Fonte: Elaborada pela autora.

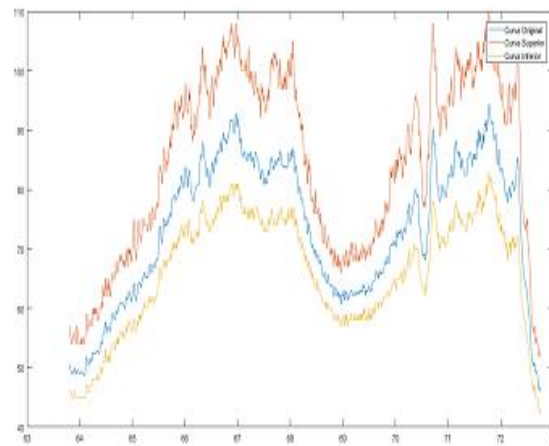
Figura 21 – Curvas RPS com *Bootstrap* da solução H₂O com as amostras $B = 2000$ para $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$



(g) H₂O com $\alpha = 0,1$ e $B = 2000$



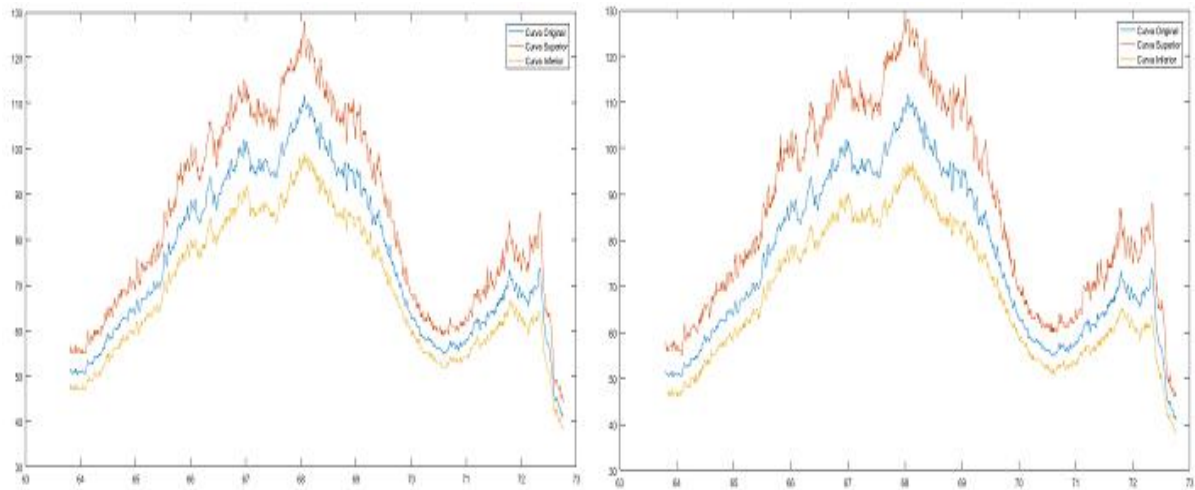
(h) H₂O com $\alpha = 0,05$ e $B = 2000$



(i) H₂O com $\alpha = 0,01$ e $B = 2000$

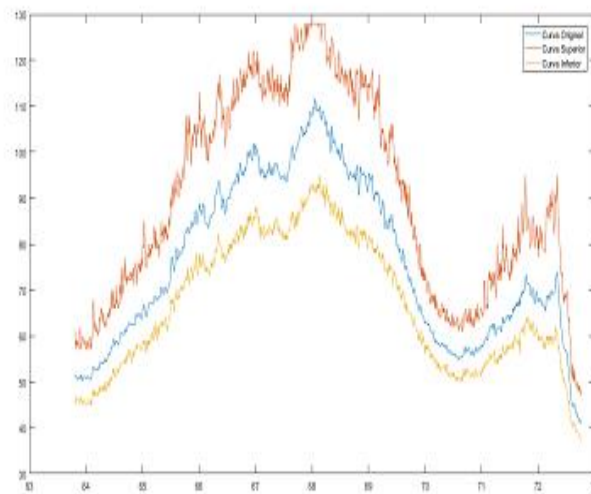
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22 – Curvas RPS com *Bootstrap* da solução Hipoclorito com as amostras de $B = 700$ para $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$



(a) Hipoclorito com $\alpha = 0,1$ e $B = 700$

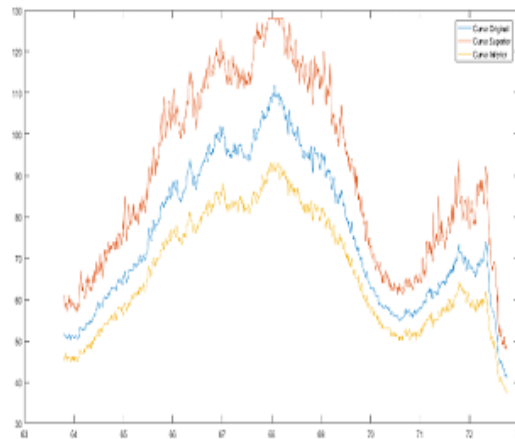
(b) Hipoclorito com $\alpha = 0,05$ e $B = 700$



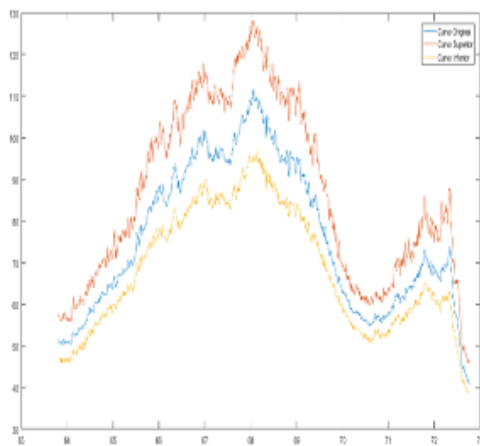
(c) Hipoclorito com $\alpha = 0,01$ e $B = 700$

Fonte: Elaborada pela autora.

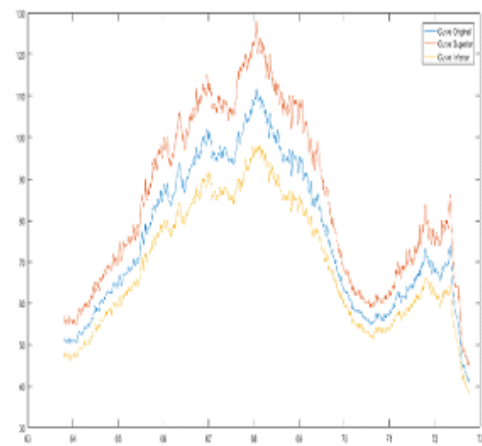
Figura 23 – Curvas RPS com *Bootstrap* da solução Hipoclorito com as amostras de $B = 1000$ para $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$



(d) Hipoclorito com $\alpha = 0,1$ e $B = 1000$



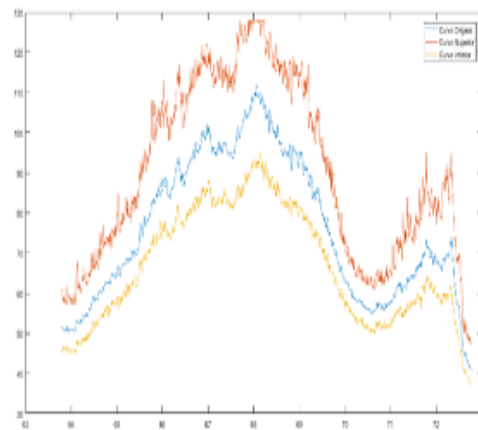
(e) Hipoclorito com $\alpha = 0,05$ e $B = 1000$



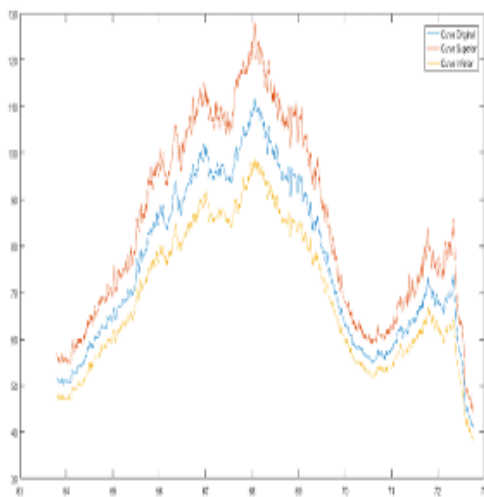
(f) Hipoclorito com $\alpha = 0,01$ e $B = 1000$

Fonte: Elaborada pela autora.

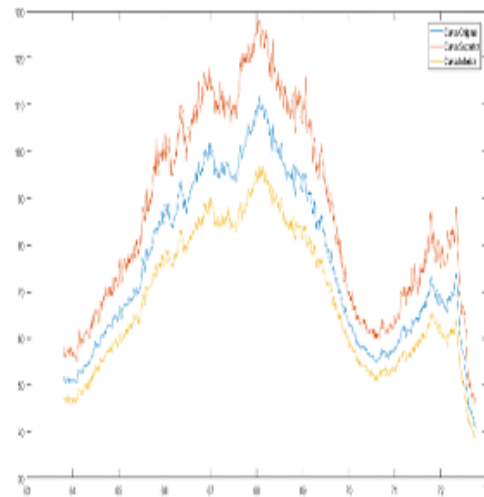
Figura 24 – Curvas RPS com *Bootstrap* da solução Hipoclorito com as amostras de $B = 2000$ para $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$



(g) Hipoclorito com $\alpha = 0,1$ e $B = 2000$



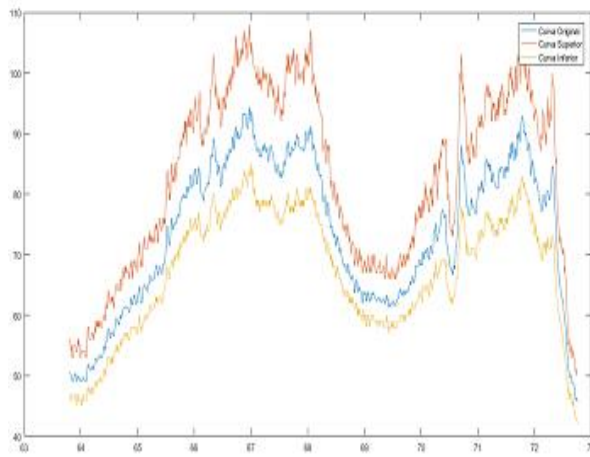
(h) Hipoclorito com $\alpha = 0,05$ e $B = 2000$



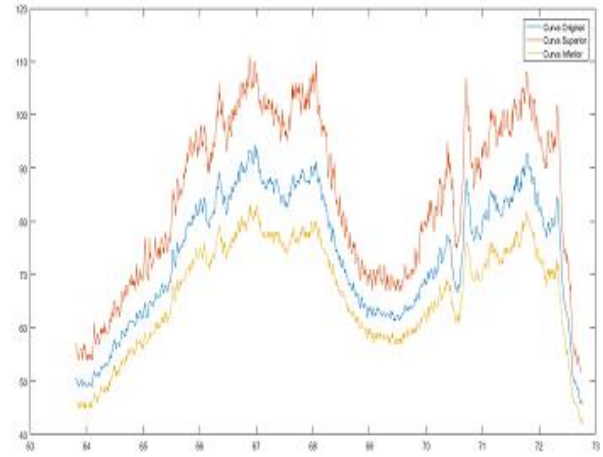
(i) Hipoclorito com $\alpha = 0,01$ e $B = 2000$

Fonte: Elaborada pela autora.

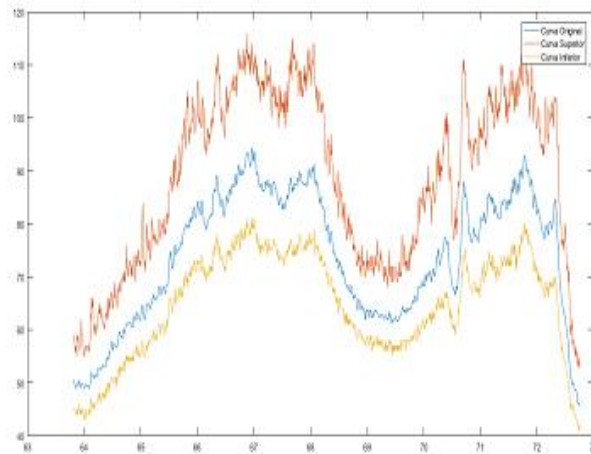
Figura 25 – Curvas RPS com *Bootstrap* da solução PBS com as amostras de $B = 700$, para $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$.



(a) PBS com $\alpha = 0,1$ e $B = 700$



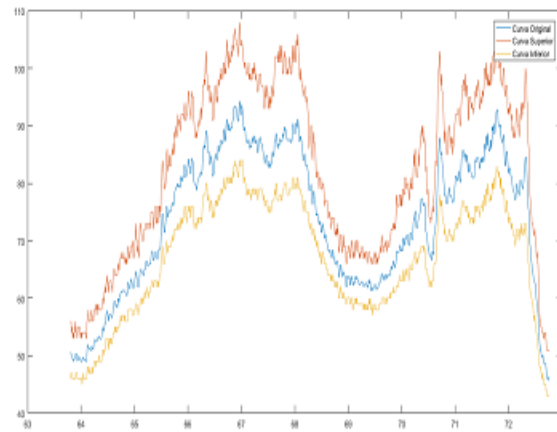
(b) PBS com $\alpha = 0,05$ e $B = 700$



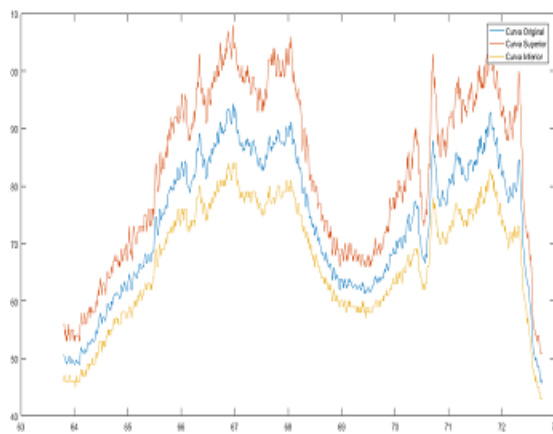
(c) PBS com $\alpha = 0,01$ e $B = 700$

Fonte: Elaborada pela autora.

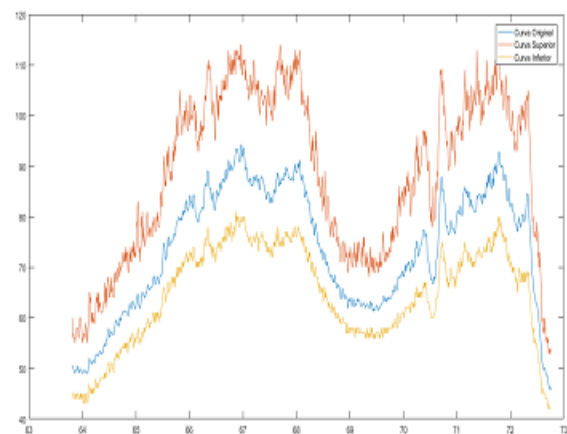
Figura 26 – Curvas RPS com *Bootstrap* da solução PBS com as amostras de $B = 1000$, para $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$.



(d) PBS com $\alpha = 0,1$ e $B = 1000$



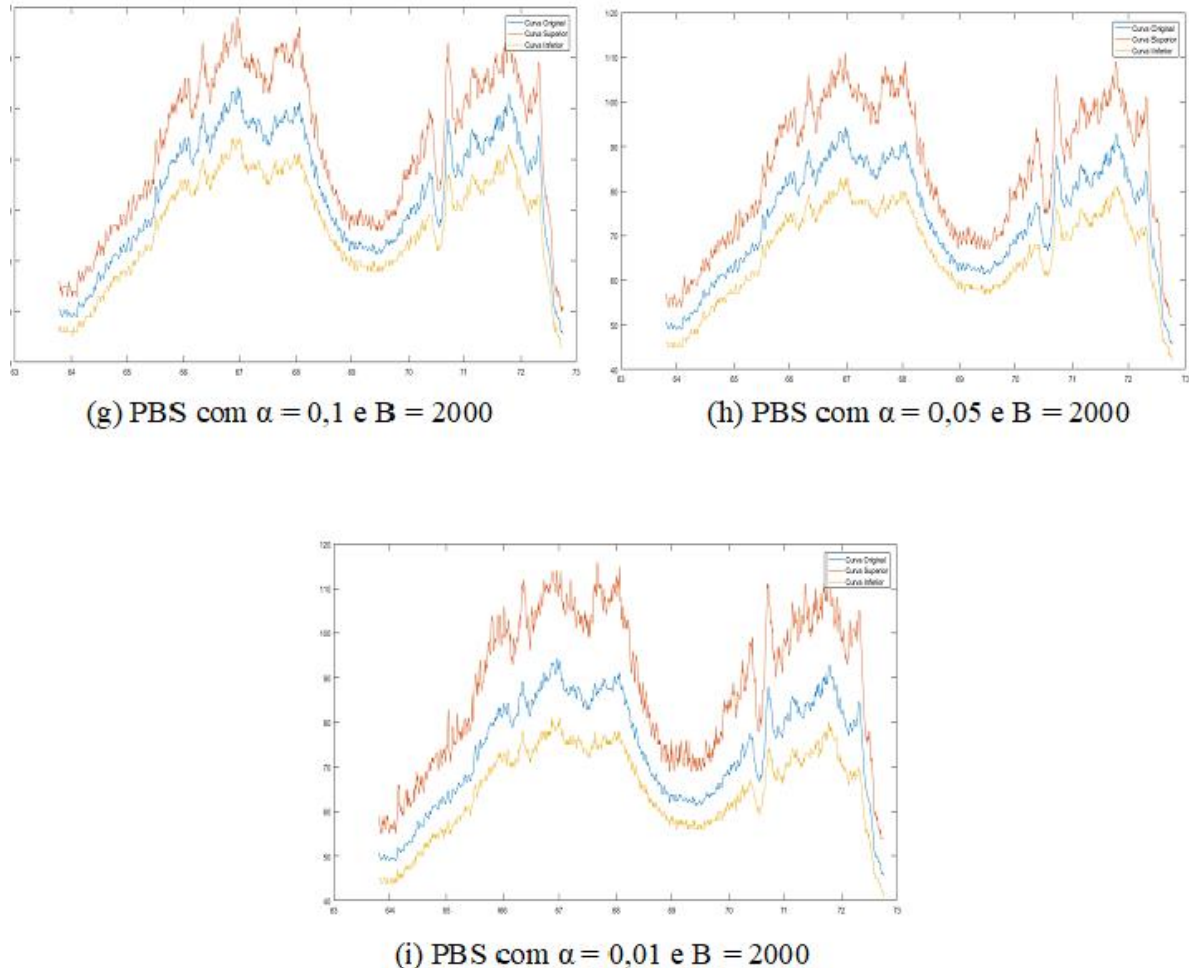
(e) PBS com $\alpha = 0,05$ e $B = 1000$



(f) PBS com $\alpha = 0,01$ e $B = 1000$

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 27 – Curvas RPS com *Bootstrap* da solução PBS com as amostras de $B = 2000$ para $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$.



Fonte: Elaborada pela autora.

Com aplicação do operador morfológico (erosão) através do processamento digital de imagens, na qual a interseção de todos os conjuntos foi obtida a partir de translações dos *pixels* da imagem, promovendo o efeito de eliminação de áreas de tamanho inferior ao tamanho do elemento estruturante B e, conseqüentemente, aumentando a região de preenchimento de *pixel*.

A partir do efeito (erosão) a curva RPS gerada apresentou uma incidência no ponto mínimo de ressonância da curva, na qual a largura da linha escura também diminuiu deixando a imagem mais nítida, havendo uma variação significativa em profundidade em relação ao eixo y .

Com uso do método *Bootstrap*, é possível construir intervalos de confiança sobre parâmetros de interesse por reamostragens, reorganizando a posição dos *pixels*, e desse modo,

estabelecer entre as substâncias (H₂O, PBS e HIPO) uma apresentação satisfatória para uma melhor resposta perante a curva RPS gerada dentro das dimensões de cada imagem. De modo geral, seus respectivos pontos mínimos e máximos são gerados por meio do método *bootstrap*, de acordo com cada um dos intervalos de confiança aplicados.

4.3 Análise de Sensibilidade

A sensibilidade (*S*) é uma métrica de desempenho que consiste em computar a taxa de variação da posição de ressonância (ângulo) pela variação do índice de refração (*n*) da substância, dada por $S = \Delta\theta/\Delta n$. A relação *pixel*-ângulo usada para obter a distribuição angular da curva RPS foi $\theta_{(p)} = -0.0070p + 72.765$.

As tabelas 4, 5 e 6 apresentam os valores mínimos das curvas RPS para os limites inferiores (Inf) e superiores (Sup) obtidos com o *bootstrap*, aprimorado com o mínimo obtido da curva processada por meio do operador morfológico da erosão.

Tabela 4 – Valores mínimos das curvas de refletividade da H₂O obtidas com o *bootstrap*

BOOTSTRAP DO H₂O EM ESCALA DE CINZA									
	B = 700			B = 1000			B = 2000		
	Inf	Sup	Original	Inf	Sup	Original	Inf	Sup	Original
<i>a</i> = 0,01	69,01	68,96	68,96	68,96	68,96	68,96	68,93	68,96	68,96
<i>a</i> = 0,1	68,92	68,96	68,96	68,96	68,96	68,96	68,92	68,97	68,97
<i>a</i> = 0,05	68,96	68,96	68,96	68,93	68,97	68,96	68,93	68,96	68,96

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5 – Valores mínimos e máximos das curvas de refletividade da substância PBS

BOOTSTRAP DO PBS EM ESCALA DE CINZA									
	B = 700			B = 1000			B = 2000		
	Inf	Sup	Original	Inf	Sup	Original	Inf	Sup	Original
$a = 0,01$	69,36	69,43	69,53	69,55	69,29	69,43	69,29	69,36	69,43
$a = 0,1$	69,37	69,36	69,43	69,43	69,43	69,43	69,29	69,36	69,43
$a = 0,05$	69,36	69,29	69,43	69,37	69,29	69,43	70,56	69,29	69,43

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6 – Valores mínimos e máximos das curvas de refletividade da substância Hipoclorito

BOOTSTRAP DO HIPOCLORITO EM ESCALA DE CINZA									
	B = 700			B = 1000			B = 2000		
	Inf	Sup	Original	Inf	Sup	Original	Inf	Sup	Original
$a = 0,01$	70,55	70,6	70,59	70,64	70,67	70,59	70,57	70,67	70,59
$a = 0,1$	70,59	70,59	70,59	70,64	70,51	70,59	70,64	70,67	70,59
$a = 0,05$	70,59	70,59	70,59	70,55	70,81	70,59	70,55	70,67	70,59

Fonte: Elaborado pela autora.

Com os valores mínimos listados, procura-se na tabela pela maior variação de $\Delta\theta$, a qual fornecerá um maior valor de sensibilidade. Os valores de $\Delta\theta$ encontram-se listados na Tabela 7 para a variação H₂O-PBS e na Tabela 8 para variação H₂O-Hipo.

Na Tabela 7, as curvas superiores da relação h₂o (sup) $\Leftrightarrow$ hipo (sup) com amostra de $B = 1000$, para $\alpha = 0,05$ apresentou um deslocamento de 1,84 entre essas duas curvas RPS. Para as curvas inferiores a melhor resposta foi para a relação h₂o (inf) $\Leftrightarrow$ hipo (inf) com

amostra $B = 2000$, $\alpha = 0,01$ com deslocamento de 1,72. Na Tabela 8 as curvas superiores da relação h_2O (sup) $\Leftrightarrow$ pbs (sup) com $B = 700$, para um intervalo de $\alpha = 0,01$ apresentou um deslocamento de 0,47 entre essas duas curvas RPS. Esse valor foi abaixo da variação obtida com as imagens originais. Para as curvas inferiores a melhor resposta foi para a relação h_2O (inf) $\Leftrightarrow$ pbs (inf) com $B = 2000$, $\alpha = 0,05$ com deslocamento de 0,82.

Tabela 7 – Análise de sensibilidade H_2O -Pbs

ANÁLISE DE SENSIBILIDADE COM <i>BOOTSTRAP</i> B = 700			
	Inf	Sup	Original
$a = 0,01$	$h_2O - pbs = 0,35$	$h_2O - pbs = 0,47$	$h_2O - pbs = 0,57$
$a = 0,1$	$h_2O - pbs = 0,45$	$h_2O - pbs = 0,4$	$h_2O - pbs = 0,47$
$a = 0,05$	$h_2O - pbs = 0,4$	$h_2O - pbs = 0,33$	$h_2O - pbs = 0,47$
ANÁLISE DE SENSIBILIDADE COM <i>BOOTSTRAP</i> B = 1000			
	Inf	Sup	Original
$a = 0,01$	$h_2O - pbs = 0,59$	$h_2O - pbs = 0,33$	$h_2O - pbs = 0,47$
$a = 0,1$	$h_2O - pbs = 0,47$	$h_2O - pbs = 0,47$	$h_2O - pbs = 0,47$
$a = 0,05$	$h_2O - pbs = 0,44$	$h_2O - pbs = 0,32$	$h_2O - pbs = 0,47$
ANÁLISE DE SENSIBILIDADE COM <i>BOOTSTRAP</i> B = 2000			
	Inf	Sup	Original
$a = 0,01$	$h_2O - pbs = 0,36$	$h_2O - pbs = 0,4$	$h_2O - pbs = 0,47$
$a = 0,1$	$h_2O - pbs = 0,37$	$h_2O - pbs = 0,39$	$h_2O - pbs = 0,46$
$a = 0,05$	$h_2O - pbs = 0,82$	$h_2O - pbs = 0,33$	$h_2O - pbs = 0,47$

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 – Análise de sensibilidade H₂O-Hipo

ANÁLISE DE SENSIBILIDADE COM <i>BOOTSTRAP</i> B = 700			
	Inf	Sup	Original
$a = 0,01$	h ₂ O – hipo = 1,54	h ₂ O – hipo = 1,64	h ₂ O – hipo = 1,63
$a = 0,1$	h ₂ O – hipo = 1,67	h ₂ O – hipo = 1,63	h ₂ O – hipo = 1,63
$a = 0,05$	h ₂ O – hipo = 1,63	h ₂ O – hipo = 1,63	h ₂ O – hipo = 1,63
ANÁLISE DE SENSIBILIDADE COM <i>BOOTSTRAP</i> B = 1000			
	Inf	Sup	Original
$a = 0,01$	h ₂ O – hipo = 1,68	h ₂ O – hipo = 1,7	h ₂ O – hipo = 1,63
$a = 0,1$	h ₂ O – hipo = 1,68	h ₂ O – hipo = 1,55	h ₂ O – hipo = 1,63
$a = 0,05$	h ₂ O – hipo = 1,62	h ₂ O – hipo = 1,84	h ₂ O – hipo = 1,63
ANÁLISE DE SENSIBILIDADE COM <i>BOOTSTRAP</i> B = 2000			
	Inf	Sup	Original
$a = 0,01$	h ₂ O – hipo = 1,64	h ₂ O – hipo = 1,71	h ₂ O – hipo = 1,63
$a = 0,1$	h ₂ O – hipo = 1,72	h ₂ O – hipo = 1,7	h ₂ O – hipo = 1,62
$a = 0,05$	h ₂ O – hipo = 1,62	h ₂ O – hipo = 1,71	h ₂ O – hipo = 1,63

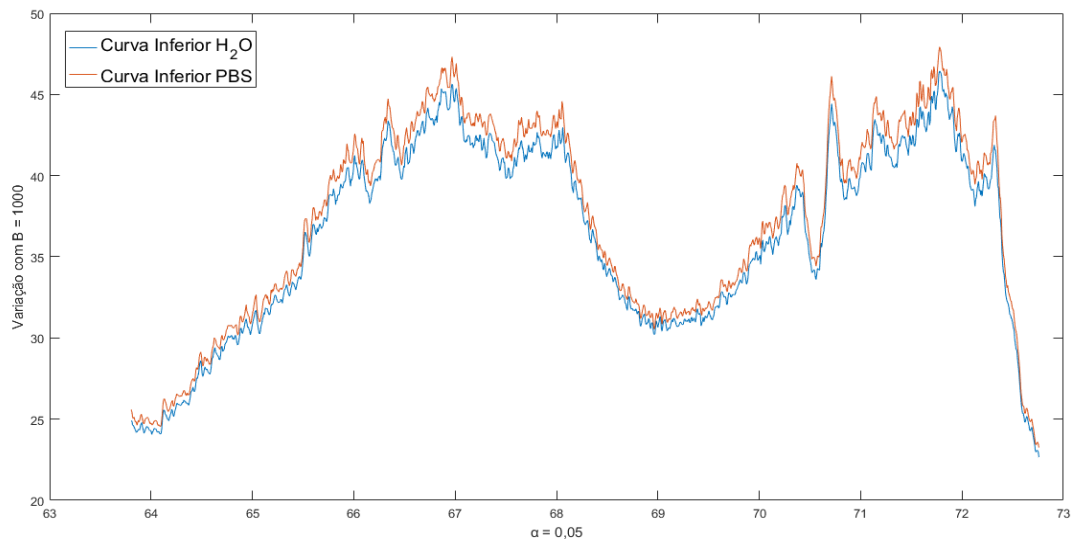
Fonte: Elaborada pela autora.

Uma vez que a configuração h₂O (sup) $\Leftrightarrow$ hipo (sup) com $B = 1000$, $\alpha = 0,05$, forneceu um deslocamento de 1,84 – enquanto a configuração de curvas original apresentou variação de 1,63 – o parâmetro B foi fixado. Para o mesmo parâmetro de $B = 1000$, a melhor

configuração do par H₂O-PBS é a relação h₂O (inf) $\Leftrightarrow$ pbs (inf) com deslocamento de 0,54 para $\alpha = 0,01$.

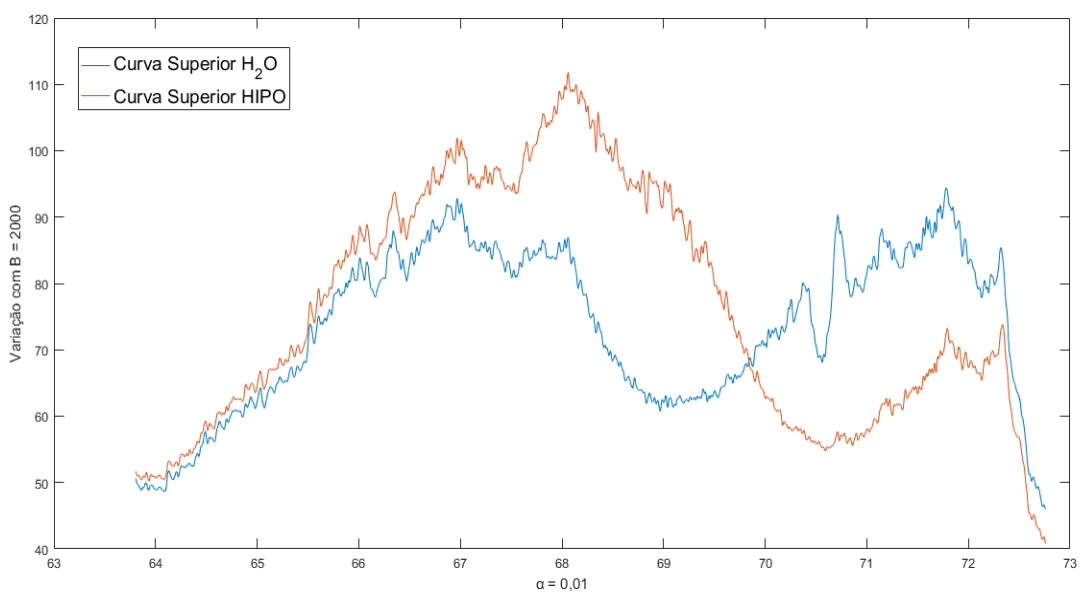
As Figuras 28 e 29 apresentam as curvas RPS para as configurações para a relação da h₂O (inf) $\Leftrightarrow$ pbs (inf) com $B = 1000$ e $\alpha = 0,05$. Para a relação da h₂O (sup) $\Leftrightarrow$ hipo (sup) com $B = 2000$ com $\alpha = 0,01$ na sua composição da melhor resposta para a análise de sensibilidade.

Figura 28 – Curvas RPS relação h₂O (inf) $\Leftrightarrow$ pbs (inf)



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 29 – Curvas RPS relação h₂O (sup) $\Leftrightarrow$ hipo (sup)



Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como finalidade mostrar um estudo de imagens fornecidas pelo sensor RPS proveniente de três substâncias diferentes: H₂O, PBS e Hipoclorito. As imagens geradas em níveis de cinza apresentaram aspectos ruidosos, e para tratamento dessas imagens foram adotadas técnicas de Processamento Digital de Imagens (PDI) com foco para filtragem, suavização e operadores morfológicos, seguido do *Bootstrap*, uma ferramenta estatística para obtenção de intervalos de confiança, esse método tem como parâmetro abordar qual melhor curva gerada a partir das técnicas de PDI, para estabelecer o uso da reamostragem com reposição da amostra original, para gerar novas amostras *bootstrap*. Em posse das amostras é possível estimar os pontos inferiores e superiores em relação a curva RPS original. Foi perceptível a presença de falhas no momento da captura das imagens devido a fatores interno/externo, no que influencia na incidência da curva RPS em alguns pontos da imagem. Para o devido tratamento dessas falhas foi comumente usada as técnicas de PDI.

Com a utilização dos filtros por meio da ressonância (*pixel*-eixo X e refletividade- eixo Y), obtidos com cada uma das técnicas empregada, as técnicas de PDI na qual apresentaram uma melhor combinação (erosão) a partir do sensor, em seguida combinado ao uso do método *Bootstrap* foi possível simular intervalos de confiança úteis para estimar parâmetros das distribuições de interesse, fornecendo uma melhor resposta para as curvas superiores da relação h₂O (sup) $\Leftrightarrow$ hipo (sup) com $B = 2000$, $\alpha = 0,01$ com um deslocamento de 1,84 entre essas duas curvas SPR. Para as curvas inferiores a melhor resposta apresentada foi para a relação h₂O (inf) $\Leftrightarrow$ hipo (inf) com $B = 1000$, $\alpha = 0,05$ com deslocamento de 1,72. Enquanto as curvas superiores com a relação h₂O (sup) $\Leftrightarrow$ pbs (sup) com $B = 700$, $\alpha = 0,01$ apresentou um deslocamento de 0,47 entre essas duas curvas RPS. Por fim, a análise de sensibilidade que computou a taxa de variação da posição de ressonância (ângulo) pela variação do índice de refração (n) de cada substância.

Como trabalhos futuros sugere-se o desenvolvimento focado na análise de outras técnicas de PDI; a investigação com mais imagens em níveis de cinza e RGB para diferentes substâncias; além da realização de uma investigação mais cuidadosa e criteriosa no emprego da técnica *Bootstrap* e abordando outros métodos estatísticos como o percentil.

REFERÊNCIAS

- AL-QAZWINI, Y. *et al.* Refractive index sensor based on SPR in symmetrically etched plastic optical fibers. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 246, p. 163-169, 2016.
- ALVES, E. J. **Métodos de bootstrap e aplicações em problemas biológicos**. 2013. 90f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2013.
- DAVISON, A. C.; HINKLEY, D.V. **Bootstrap methods and their application**, Cambridge University Press, 1997.
- EFRON, R. T. B. **An Introduction to the Bootstrap**, Chapman and Hall, 1993.
- 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.
- GOMES, J. C. M. *et al.* Smart SPR Sensor: uso de aprendizagem de máquina para geração de resposta inteligente em sensores baseado na ressonância de plasmon de superfície. In: Simpósio Brasileiro de Automação Inteligente, 14., Minas Gerais, 2019. **Anais...**p. 1399-1404.
- GONZALEZ, R.; WOODS, R. **Processamento Digital de Imagens**. 3 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, p.19-80, 2010.
- HAFID, I. *et al.* Sensitivity Improvement of an Impedimetric Immunosensor Using Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. **Journal of Sensors**, p. 1-12. 2009.
- KANSO, M.; CUENOT, S.; LOUARN, G. Sensitivity of optical fiber sensor based on surface plasmon resonance: modeling and experiments. **Plasmonics**, v. 3, n. 2-3, p. 49-57, 2008.
- MANTEIGA, W. G.; SÁNCHEZ, J. M. P, ROMO, J. The bootstrap – A Review. **In: Computational Statistics**. v. 9. 165-205, 1994.
- MARQUES FILHO, O.; VIEIRA NETO, H. **Processamento Digital de Imagens**. Rio de Janeiro: Brasport, p. 23, 1999.
- MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – a review. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 6, p. 153–159, 2016.
- OLIVEIRA, *et al.* **Sensor SPR para detecção de adulteração em biocombustível**, 2014.
- OLIVEIRA, L. C. **Construção e Caracterização de Sensores SPR: Influência da Camada Metálica e do Substrato Dielétrico**. 127f. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) –

Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Campina Grande, 2016.

OTTO, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. **Zeitschrift für Physik**, v. 216, n. 4, p. 398-410, 1968.

PEREIRA, E. G. et al. Implementation of a fpga-based data acquisition and processing system for image sensors employed in spr biosensing. **Proceedings of then International Instrumentation and Measurement Technology Conference**, IEEE, 2014.

QUEIROZ, J. E. R.; GOMES, H. M. Introdução ao processamento digital de imagens. **RITA: Revista de Informática Teórica e Aplicada**, Rio Grande do Sul, v. 8, n. 1, 2001.

RITCHIE, R. H. Plasma losses by fast electrons in thin films. **Physical Review**, v. 106, n. 5, p. 874, 1957.

SANTOS, J. F. L. et. al. **Ressonância de Plasmon de Superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares**, 2016.

SCARANO, S. *et. al.* **Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors**. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, n. 5, p. 957 – 966, 2010.

SHARMA, A. K.; JHA, R.; GUPTA, B. D. Fiber-optic sensors based on surface plasmon resonance: a comprehensive review. **IEEE Sensors Journal**, v. 7, n. 8, p. 1118-1129, 2007.

SILVA, Maria Laís Félix. **Estudo e Desenvolvimento de Sensor em Fibra Óptica Polimérica Baseada na Ressonância de Plasmons de Superfície**, Dissertação de Mestrado, Instituto Federal da Paraíba, 2017

SOUZA, L. C. **Agrupamento e Regressão Linear de Dados Simbólicos Intervalares Baseados em Novas Representações**. Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SRIVASTAVA, Sachin Kumar; GUPTA, Banshi Dhar. **A multitapered fiber-optic SPR sensor with enhanced sensitivity**. *IEEE Photonics Technology Letters*, v. 23, n. 13, p. 923, 2011.

THIRSTRUP, C. *et al.* Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 100, n. 3, p. 298-308, 2004.

TURBADAR, T. Complete absorption of light by thin metal films. **Proceedings of the Physical Society**, v. 73, n. 1, p. 40, 1959.

WOOD, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. **Proceedings of the Physical Society of London**, v. 18, n. 1, p. 269, 1902.