

# FONTES DE RUÍDOS E RELAÇÃO SINAL-RUÍDO EM ESPECTRÔMETRO RAMAN DISPERSIVO UTILIZANDO CÂMERA CCD

A. C. Zeña, R. A. Zângaro, M. T. T. Pacheco, L. Silveira Jr.

Instituto de Engenharia Biomédica, Universidade Camilo Castelo Branco -  
UNICASTELO, São José dos Campos, SP, Brasil.  
e-mail: antonioime@hotmail.com

**Resumo:** Uns dos problemas inerentes aos sinais de espectroscopia Raman é a existência de ruídos relacionados à aquisição de dados via CCD (“Charge Coupled Device”), como ruído térmico, ruído eletrônico de leitura, ruído gerado pelo sinal óptico da amostra (ruído fóton) e ruído gerado pelos raios cósmicos, que degradam a qualidade do sinal adquirido e dificultando a interpretação analítica do espectro. Nos sistemas de medida eletrônica, a RSR (relação sinal-ruído) que mede a relação do sinal luminoso com o ruído combinado, resultado dos sinais indesejados originados no dispositivo, determina a qualidade do espectro e das medidas efetuadas. Pretende-se analisar as fontes de ruído em um espectrômetro Raman dispersivo e mostrar a necessidade do controle das fontes de ruído para permitir a maior precisão na análise dos espectros Raman.

**Palavras-chave:** fontes de ruído, relação sinal-ruído, espectroscopia Raman, dispositivos de carga acoplada (CCD).

**Abstract:** *One of the problems inherent signs of Raman spectroscopy is the existence of noise related to data acquisition via CCD (Charge Coupled Device), such as thermal noise, electronic noise, read noise generated by the sample optical signal (noise Photon) and noise generated by cosmic rays, which degrade the quality of signal acquired and making analytical interpretation of the spectrum. In electronic measurement system, the SNR (Signal-to-Noise Ratio) that measures the ratio of the light signal with combined noise, which results of unwanted signals that originate on the device, determines the quality of the spectrum and the measures carried out. It is intended to analyse the sources of noise in dispersive Raman spectrometer and show the need for control of the noise sources to allow for greater precision in the Raman spectrum analysis.*

**Keywords:** *sources of noise, signal-to-noise ratio, Raman spectroscopy, charge-coupled devices (CCD).*

## Introdução

A espectroscopia Raman é uma forma fundamental de espectroscopia molecular que é amplamente utilizado para investigar estruturas e propriedades de moléculas usando suas transições vibracionais. Ele se baseia em espalhamento inelástico da luz monocromática do laser ao irradiar uma amostra [1, 2]. Depois da filtragem

óptica adequada, a luz é dispersa por um espectrógrafo e direcionada a um detector para determinar a mudança do comprimento de onda de excitação, que aparece na forma de padrões espectrais (picos) característicos. Com esta técnica pode-se investigar amostras biológicas e fornecer em tempo real o diagnóstico de mudanças físicas e químicas muito precisas das características funcionais dos tecidos biológicos [3].

Apesar das vantagens intrínsecas de especificidade molecular na identificação dos compostos, a luz espalhada na forma de fótons Raman é normalmente muito fraca e limita as aplicações de espectroscopia Raman devido a medições com imprecisões devido ao ruído inerente aos espectros. Pilotto *et al.* [4] descreve as dificuldades encontradas na observação dos picos espectrais com respeito à intensidade do ruído e a RSR em um sistema Raman dispersivo.

O conhecimento das fontes de ruído e a estimativa da RSR são fundamentais para a precisão de uma medição espectral [5,6], principalmente em aplicações biomédicas. Verifica-se em um espectro Raman dois componentes bem definidos: o sinal útil e o ruído. O sinal útil é a parte do espectro Raman que contém a informação desejada (bandas Raman), enquanto que o ruído é considerado como tudo aquilo que não corresponde ao espalhamento Raman, isto é, não depende da estrutura molecular da amostra. Portanto, a informação útil que pode-se extrair do espectro Raman não depende unicamente do sinal Raman, mas também das distintas fontes de ruído que intervêm na sua aquisição [6].

Pretende-se revisar essas fontes de ruído gerados na câmera CCD, que causam um impacto quantitativo e qualitativo na espectroscopia Raman dispersiva visando aplicações biológicas.

## Classificação dos ruídos

A seguir enunciam-se os principais ruídos que interagem em uma câmera CCD.

**Ruído de fóton (RF):** é o ruído que ocorre devido à natureza quântica da luz. Trata-se de um ruído aleatório, distinto para cada acumulação de aquisição. A intensidade do RF é igual à raiz quadrada do número de fótons detectados,  $\sigma_f = (S)^{1/2}$  onde  $S$  é o número de fótons do sinal. É um tipo de ruído presente em todas as aquisições em que haja sinal, independente da qualidade da câmera CCD.

**Ruídos gerados pelo instrumento:** estes ruídos dependem das especificações da câmera CCD utilizada no espectrômetro. Consideram-se dois tipos de ruído: o ruído de escuro (RE) e o ruído de leitura (RL). O RE surge da variação estatística do número dos elétrons que são gerados termicamente no interior da estrutura de silício da câmera CCD. Este ruído é determinado pela expressão  $\sigma_e = (\Phi_e t)^{1/2}$  onde  $\Phi_e$  é a taxa de elétrons liberados pela temperatura e  $t$  o tempo (s). Como este ruído depende da temperatura, pode ser reduzido mediante arrefecimento da CCD. O RL é uma combinação de componentes de ruído do sistema decorrentes do processo de conversão dos transportadores de cargas geradas nos pixels da câmera CCD para um sinal de tensão e posterior conversão deste sinal de tensão analógico em um sinal digital. Identifica-se este ruído por  $\sigma_l$ , [7].

**Ruído gerado por fontes externas:** trata-se de ruídos que não são gerados pelo sinal da amostra e nem pelo instrumento (CCD). A fonte principal deste ruído são os raios cósmicos que chegam à Terra, que ao incidirem na CCD, liberam um grande número de elétrons que são indistinguíveis aos fótons-elétrons provenientes da amostra. Estes raios geram picos muito estreitos e de alta intensidade em posições aleatórias do espectro Raman.

A Figura 1 apresenta um espectro Raman típico, ilustrando os principais tipos de ruídos em estudo.

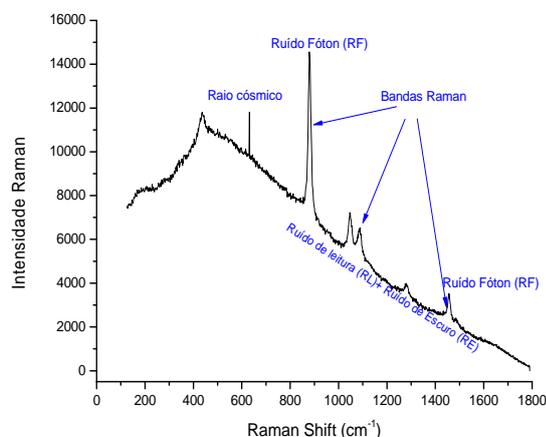


Figura 1: Ruídos de um espectro Raman obtido de uma mistura de etanol (espalhador) e café (absorvedor) com tempo de aquisição de 1s e temperatura de -75 °C.

Uma importante medida para descrever a qualidade do espectro Raman é o parâmetro da Relação Sinal-Ruído - RSR. Este parâmetro é expresso matematicamente como o quociente entre a média da intensidade do sinal medido em uma região de interesse ( $\bar{S}$ ) e o desvio padrão da intensidade do sinal nesta mesma região ( $\sigma_y$ ), desvio este obtido a partir diversas repetições da medição [8, 9]. Este parâmetro é calculado pela seguinte equação:

$$RSR = \bar{S} / \sigma_y \quad (1)$$

A Equação (1) precisa de uma estimativa de  $\sigma_y$ ,

obtida pela soma das estimativas de todos os desvios padrões das fontes de ruído, como indicado pela Equação (2):

$$\sigma_y = (\sigma_e^2 + \sigma_l^2 + \sigma_f^2)^{1/2} \quad (2)$$

onde  $\sigma_e$ ,  $\sigma_l$  e  $\sigma_f$ , são os desvios padrão do RE, RL e RF respectivamente. Se for definido  $\bar{S}$  com sendo o sinal para a banda Raman de interesse, a relação sinal ruído desta banda é definida como:

$$RSR = \bar{S} / (\sigma_e^2 + \sigma_l^2 + \sigma_f^2)^{1/2} \quad (3)$$

## Materiais e Métodos

O equipamento utilizado para análise espectral é um sistema Raman dispersivo (modelo Dimension P-1, *Lambda Solutions*, MA, EUA) que utiliza um laser de diodo sintonizado em 830 nm (infravermelho próximo), obtendo-se na saída do sistema óptico cerca de 350 mW em 830 nm. O elemento dispersor da luz, integrado ao espectrômetro, possui resolução de aproximadamente 2  $\text{cm}^{-1}$ . A faixa espectral útil compreende de 400 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ . A detenção do sinal luminoso espalhados pela amostra é detectada por uma câmera CCD *back-thinned, deep-depletion* 1340x100 pixels refrigerada por elemento termoelétrico (Peltier) ventilado, atingindo uma temperatura de -75°C. A obtenção do sinal Raman da amostra é efetuada por meio de um “Raman Probe” (modelo Vetor probe, *Lambda Solutions*, MA, EUA) acoplado ao laser e ao espectrômetro. O sistema permite o ajuste da temperatura de trabalho, do tempo de exposição da câmera CCD e o número de aquisições por amostra, e o armazenamento dos espectros para análise e interpretação.

Para determinar os parâmetros de estudo, realizou-se ensaios com a finalidade de avaliar o nível de ruído gerado pela câmera CCD em diversas situações, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Ensaios realizados visando obter parâmetros para a determinação da RSR para sinais Raman em câmera CCD.

	Faixa ou valores	Nº de espectros coletados em cada faixa ou valor
Raios Cósmicos	1 s, 1 acumulação	900
Mistura de Etanol e Café	1 s, 1 acumulação	20
Temperatura	-10°C a -75°C, intervalo de 5°C	14
Tempo de leitura (s)	[0,1-0,5], [1-5], [10-50], 100	5, 5, 5 e 1
Nº de acumulações	[1-5], [10-15], 20	5, 6 e 1

Em uma primeira etapa realizou-se um estudo estatístico das características e comportamento dos raios cósmicos na CCD, realizando-se a leitura de uma sequência de espectros com tempo de aquisição de 1s e 1 acumulação, totalizando 900 espectros.

Em uma segunda etapa analisou-se as variações do ruído de fóton, através da medição do espectro de uma mistura de um componente espalhador Raman e outro absorvedor, e que emita fluorescência. Para tal, foram realizadas 20 aquisições de espectros de uma amostra de etanol (espalhador) misturado com café (absorvedor/emissor) em intervalo de tempo de 1s e 1 acumulação.

Em uma terceira etapa foram realizadas leituras variando-se a temperatura de refrigeração da câmera CCD, o tempo de leitura e o número de acumulações, como ilustrado na Tabela 1. Para as leituras das amostras de variação de temperatura, a mesma foi variada de  $-10^{\circ}\text{C}$  até  $-75^{\circ}\text{C}$  com tempo de aquisição 1s e 1 acumulação, totalizando 14 espectros. Para a variação do tempo de leitura, definiu-se os seguintes tempos, e 1 acumulação para todas as medidas: 0,1 s a 0,5 s, 0,1 s intervalo, 1 s a 5 s, 1 s intervalo, 10 s a 50 s, 10 s intervalo, e 100 s, totalizando 16 espectros. A variação no número de acumulações foi realizada, entre 1 e 15 acumulações com intervalo de 1 acumulação, e uma leitura de 20 acumulações, todas em tempo de leitura de 1 s, totalizando 12 espectros.

## Resultados e Discussão

Com relação aos raios cósmicos (Figura 2), verificou-se seu comportamento aleatório em termos de posição do deslocamento Raman (posição na câmera CCD). Na Figura 2, que apresenta a frequência e intensidade dos raios cósmicos, verificou-se que a maior frequência de ocorrência acontece em até 20 s, sendo que cerca de 75% dos raios acontecem em até 60 s. Também verificou-se que a maior parte dos raios possuem intensidade de até 5.000 contagens, e mais de 75% possuem intensidade até 10.000 contagens.

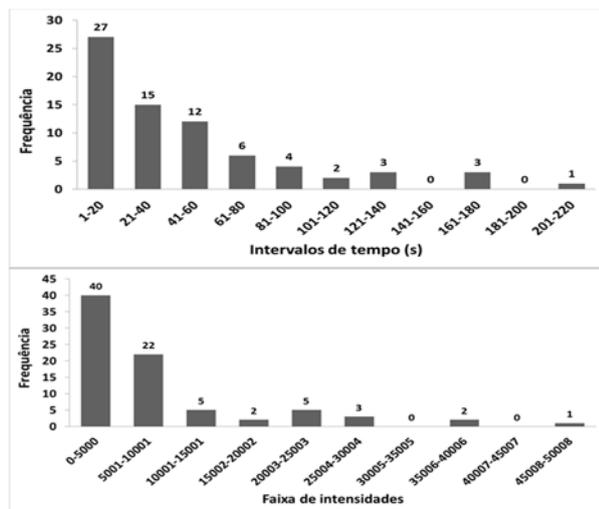


Figura 2: Frequência e intensidade dos raios cósmicos em função do tempo e dos intervalos que ocorrem respectivamente.

A fim de estimar se o ruído, medido a partir do desvio padrão em cada deslocamento Raman de várias repetições da medição é igual ao desvio padrão obtido a

partir do próprio sinal, foram efetuado cálculos de desvio padrão em uma série de 20 medidas em 1 s e 1 acumulação, temperatura  $-75^{\circ}\text{C}$ . Verificou-se que o comportamento do ruído é igual, independente se o valor do desvio é obtido em repetições ou ao longo do próprio sinal. Na segunda etapa, o ruído de fóton foi calculado a partir do desvio padrão da repetição das 20 leituras da mistura de etanol e café (eixos  $y$ ), para cada posição do deslocamento Raman (eixo  $x$ ). A intensidade média do sinal em cada posição Raman foi plotada *versus* o desvio padrão de cada posição. A Figura 3a mostra esta curva de intensidade do sinal *versus* ruído de fóton, juntamente com a equação que representa esta curva. As curvas de ruído em função da temperatura, tempo de leitura e número de acumulações foram obtidas a partir do desvio padrão obtido no mesmo espectro e são apresentadas nas Figuras 3b, 3c e 3d, juntamente com as curvas que representem estes ruídos.

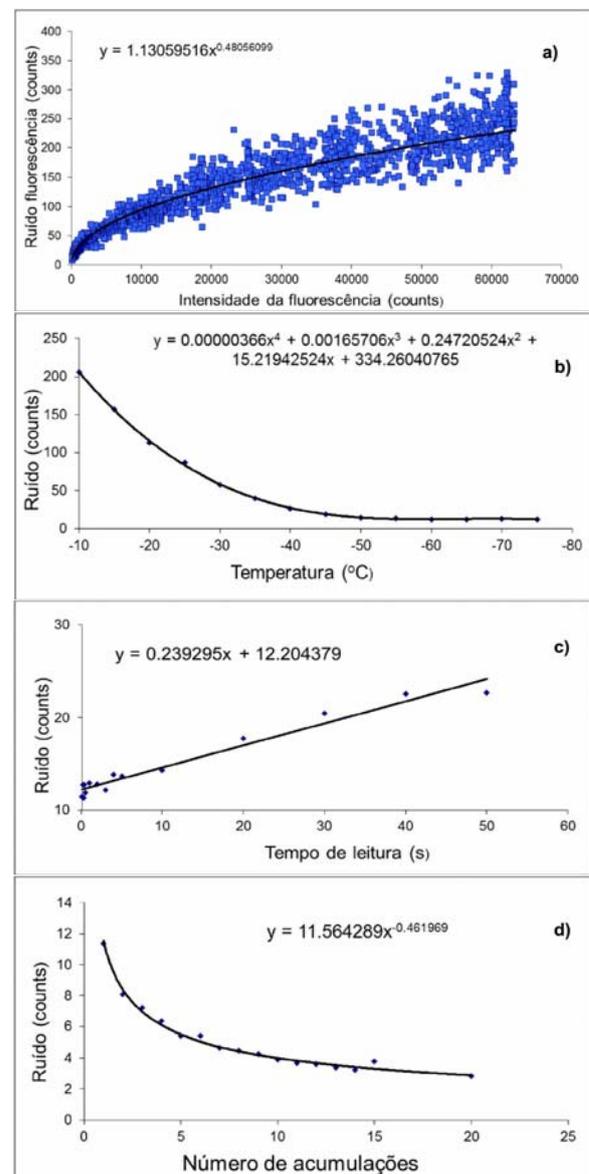


Figura 3: Plotagens das: a) intensidade da fluorescência; b) temperatura; c) tempo de leitura; d) número de acumulações.

Trabalhos da literatura mencionam três ruídos importantes: RF, RE e RL, importante para o cálculo da relação sinal-ruído e que devem ser considerados para análise de espectros Raman obtidos em uma câmera CCD [10-12].

Com as funções de intensidade da fluorescência (ruído fóton), temperatura, tempo de leitura e número de acumulações, modelou-se a equação (3) que pode ser utilizada para determinar os ruídos RF, RE e RL, inerentes a um espectro Raman obtido na CCD, e desta forma obter a RSR. Em um exemplo, para três espectros Raman identificados por espectro 1, espectro 2 e espectro 3, obtidos na CCD com as variáveis temperatura:  $-75^{\circ}\text{C}$ , acumulações: 2, e tempo de leitura: 2 s, determinou-se os valores do ruído (desvio padrão) de cada espectro obtido, resultando os valores de 9,1; 8,7 e 8,6, respectivamente. Aplicando-se à equação modelada os valores de temperatura:  $-75^{\circ}\text{C}$ , acumulações: 2 e tempo de leitura: 2 s, determinou-se o ruído do espectro como sendo 9,2, ou seja, próximo ao valor de ruído obtido experimentalmente.

## Conclusão

Na espectroscopia Raman, torna-se importante conhecer as fontes de ruído e métodos de redução de ruídos. Este trabalho mostrou que é possível identificar e analisar as características dos principais ruídos inerentes à câmera CCD, como RF, RE e RL, mediante utilização das curvas experimentais e cálculo do desvio padrão de medições repetidas. A equação geral composta pelas funções de ruído de fóton, temperatura, número de acumulações e tempo de leitura, foi capaz de estimar o valor do ruído do espectro Raman.

## Referências

- [1] Yúfera JM, Soneira MJ, Sedó MJ. Técnicas de procesado de señal aplicadas al tratamiento de espectros Raman. 1996; 8:945-48.
- [2] Smulko J, Dingari N, Soares J, Barman I. Anatomy of noise in quantitative biological Raman spectroscopy. *Future Science - Bioanalysis*. 2014;6(3): 411-421.
- [3] Moreira, Leonardo M, Silveira LJr, Santos FV, Lyon JP, Rocha R, Zângaro RA, Balbin Villverde A, Pacheco MT.T. Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis. 2008;22:1-19.
- [4] Pilotto S, Pacheco MT, Silveira LJr, Villaverde AB, Zângaro RA. Analysis of near infrared Raman spectroscopy as a new technique for a transcutaneous non-invasive diagnosis of blood components. *Lasers in Medical Science*. 2001;16(1):2-9.
- [5] McCreery RL. Raman Spectroscopy for Chemical Analysis: A series of monographs of analytical chemistry and its applications. NJ, USA: John Wiley and Sons; 2000.
- [6] Pelletier MJ. Quantitative Analysis Using Raman Spectrometry. 2003;57(1):20-42.
- [7] Vandenabeele P. Practical Raman Spectroscopy: An Introduction. United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd, Ghent University, Belgium; 2013.
- [8] Venet D, Detours V, Bersini H. A Measure of the Signal-to-Noise Ratio of Microarray Samples and Studies Using Gene Correlations. *PLOS ONE*. 2012;7(12):1-9.
- [9] Welvaert M, Rosseel Y. On the definition of signal-to-noise ratio and contrast-to-noise ratio for FMRI. *PLOS ONE*. 2014;8(11) 1-10.
- [10] Brullmann DD, D'Hoedt B. The modulation transfer function and signal-to-noise ratio of different digital filters: a technical approach. *Dentomaxillofacial Radiology*. 2011;40(2):222-229.
- [11] Schroeder I, Hansen U. Interference of shot noise of open-channel current with analysis of fast gating: patchers do not (Yet) have to care. *The Journal Of Membrane Biology*. 2009; 229:153-163.
- [12] VASEGHI SV. Advanced Digital Signal Processing and Noise Reduction. 4<sup>a</sup> ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2008.
- [13] Sabin PG, Souza MA, Breikreitz CM, Poppi JR. Desenvolvimento de um algoritmo para identificação e correção de Spikes em Espectroscopia Raman de Imagem. *Quim. Nova*. 2012;35(3):612-615.