

Medição Óptica da Atividade Elétrica Celular

Neste capítulo é apresentada a base teórica necessária para o estudo da influência das resoluções espacial e temporal na morfologia do potencial de ação óptico. Primeiramente, são apresentados aspectos importantes da eletrofisiologia celular, a composição do potencial de ação de células cardíacas e a descrição matemática da resposta elétrica de uma célula cardíaca para a simulação do potencial de ação cardíaco. Em seguida, a técnica de mapeamento óptico da atividade elétrica cardíaca e os componentes de sua instrumentação são discutidos. E, finalmente, são apresentados os procedimentos de filtragem e processamento digital, cuja utilização se faz necessária para melhorar a qualidade dos sinais adquiridos em imageamentos da atividade elétrica cardíaca, e seus efeitos nos sinais ópticos que devem ser avaliados.

Este capítulo foi dividido em três partes: Eletrofisiologia celular; Mapas ópticos e sua instrumentação e Processamento de sinais.

2.1

Eletrofisiologia Celular ^[25-29]

A membrana celular é uma estrutura lipoproteica que apresenta como característica básica a permeabilidade seletiva a diversos íons presentes no organismo, fazendo com que as concentrações iônicas no meio intracelular e no meio extracelular sejam diferentes. Moléculas podem ser transportadas através da membrana por processos ativos ou passivos, sendo os processos ativos aqueles que necessitam de energia para serem realizados. As diferenças de concentração de íons entre o meio externo e interno são geradas e mantidas por processos ativos que usam energia para forçar uma entrada ou saída de íons contrária ao gradiente de concentração iônica. Um exemplo é a bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$, que usa energia proveniente da quebra da molécula de ATP (adenosina trifosfato) em ADP

(adenosina difosfato) e fosfato para bombear Na^+ para fora da célula e trazer K^+ para o meio interno.

Essa diferença em concentração faz com que toda célula possua uma diferença de potencial entre o meio externo e o meio interno. Em repouso, o interior da célula encontra-se negativamente carregado, enquanto o exterior encontra-se positivamente carregado, porém esta diferença de potencial em repouso (V_r) possui diferentes valores para diferentes tipos celulares. Células que respondem de forma característica a um estímulo elétrico e possuem a habilidade de propagá-lo são chamadas *excitáveis*, e a mudança do potencial elétrico transmembrana que é desencadeada pelo estímulo é chamada *potencial de ação*.

Uma célula em repouso tem os gradientes iônicos transmembranares mantidos por processos ativos sendo o principal a ação da bomba Na^+ , K^+ , carregando a membrana eletricamente e transformando-a num capacitor. Cada íon, individualmente, contribui na composição deste capacitor, conforme sua concentração de equilíbrio. Este potencial de equilíbrio foi descrito por Nerst e é característico para cada íon. O sódio, por exemplo, sendo um cátion primariamente extracelular, tem um potencial de equilíbrio ao redor de +65 mV. O potássio, por outro lado, sendo um cátion primariamente intracelular, apresenta um potencial de equilíbrio ao redor de -95 mV. Esse potencial de equilíbrio é chamado de *potencial de Nerst* e, para um íon S, é dado por:

$$V_s = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[S]_e}{[S]_i} \right) \quad (1)$$

Onde $[S]_e$ e $[S]_i$ são as concentrações externas e internas do íon S respectivamente; R é a constante universal dos gases, T a temperatura absoluta, F é a constante de Faraday e z é a carga do íon S.

Ao receber um estímulo elétrico que ocasione uma despolarização elevada o suficiente para ultrapassar certo valor (específico de cada célula) denominado limiar, a membrana altera sua permeabilidade seletiva, permitindo a ocorrência de diversas correntes elétricas que desencadearão o processo conhecido como potencial de ação. A possibilidade de a membrana mudar sua permeabilidade se deve à complexa estrutura interna dos poros de membrana, os chamados canais de membrana.

A noção de canais iônicos foi sugerida primeiramente por Bernard Katz e Ricardo Miledi [30,31] e as correntes iônicas que passam através de canais iônicos foram medidas com sucesso pela primeira vez em 1976 utilizando o *Patch-Clamp-Apparatus*, desenvolvido por Erwin Neher e Bert Sakmann [32]. Esta técnica permite a medição de correntes iônicas passando através de um pequeno pedaço da membrana celular, contendo apenas poucos ou um único canal iônico. A técnica consiste em uma pipeta de vidro limpa, chamada de microeletrodo, na qual é introduzida uma solução salina e colocada em contato com uma célula intacta. Uma sucção suave leva à formação de uma vedação entre o vidro e a membrana celular e assegura que a corrente que passa através da pipeta é idêntica à corrente que passa através da porção da membrana da célula que está sendo observada. O fluxo dos íons que passam pela membrana através de um único canal e as transições entre os diferentes estados de um canal são monitorados diretamente com uma resolução temporal de microssegundos [33,34].

2.1.1

Cardiomiócito

A célula do músculo cardíaco, ou cardiomiócito, é uma célula excitável e possui potencial de ação característico. Ao receber um estímulo elétrico com intensidade suficiente, o primeiro canal a ser ativado no processo é o canal de sódio e sua abertura e fechamento são controlados por um mecanismo dependente da voltagem. Durante o repouso, o potencial no interior da membrana celular é negativo em relação ao meio externo. Quando a célula cardíaca sofre uma despolarização que atinge o limiar de excitabilidade, o poro se abre, permitindo a entrada de altas quantidades de sódio a favor de um gradiente eletro-químico. Uma região mais estreita do canal, sensível à voltagem, atua como filtro seletivo e garante que apenas íons de sódio atravessem a membrana. O potencial transmembranar se eleva, tendendo ao potencial de equilíbrio para o sódio, que é de +65mV, porém a inativação dos canais de sódio ocorre alguns milissegundos depois, controlada por uma alça proteica intracelular. Esse mecanismo auto inibitório bloqueia mecanicamente o poro e interrompe a passagem de sódio. A entrada de sódio na célula promove alterações no potencial de membrana, deflagrando a abertura de muitos outros canais e determinando assim as fases do

potencial de ação. A Figura 1 mostra o potencial de ação cardíaco destacando as fases de cada região, e a polaridade da célula, e correntes de entrada e saída de íons em cada fase do potencial de ação.

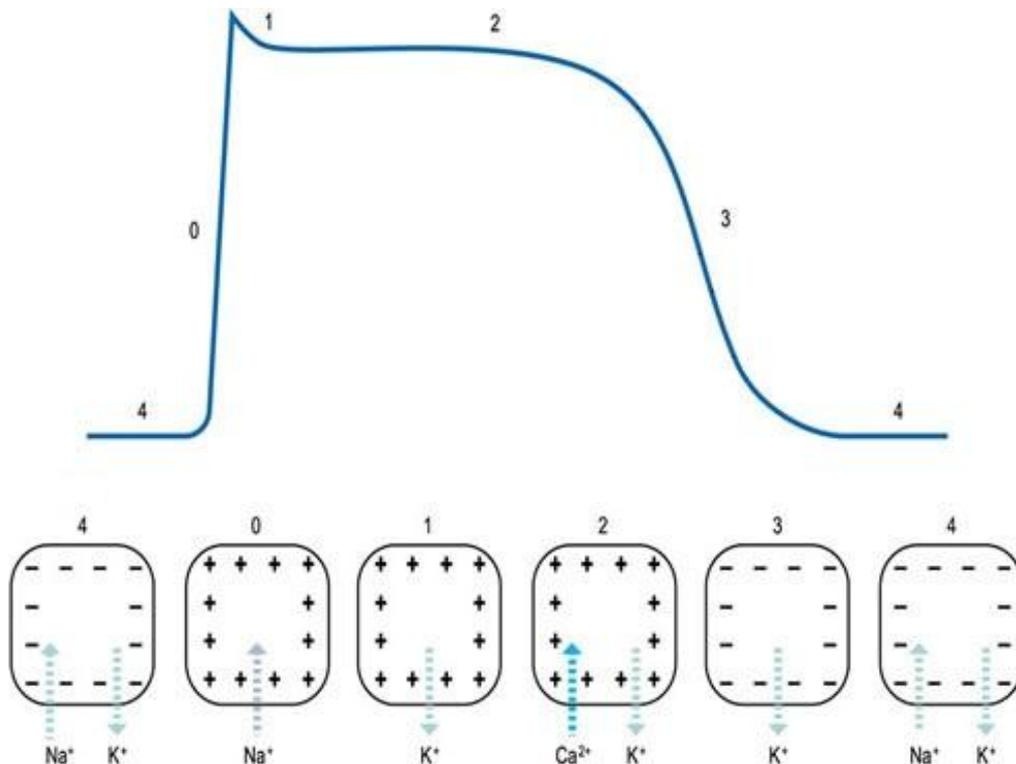


Figura 1: Potencial de ação cardíaco mostrando cada fase: (4) Repouso, (0) Despolarização, (1) Repolarização Inicial, (2) Platô, (3) Repolarização, e as correntes iônicas relacionadas com a mudança de potencial em cada fase.

A entrada de sódio durante da fase 0 implica em um potencial de membrana positivo em relação ao potencial de equilíbrio para o potássio, desta forma, canais transitórios de potássio se abrem causando uma corrente de saída deste íon, auxiliando na repolarização da célula e contribuindo para a espícula da fase 1. Porém esses canais transitórios rapidamente se inativam. Durante a fase 2, ou platô, há uma corrente despolarizante de cálcio, cuja entrada do íon cálcio estimula a liberação do cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático da célula, ocasionando um aumento do nível de cálcio no meio intracelular e promovendo a contração do cardiomiócito. Durante o repouso, a concentração de cálcio é mantida baixa no interior da célula por meio da recaptura ativa do cálcio pelo retículo sarcoplasmático e pela atuação de um trocador sódio-cálcio na membrana

celular. A entrada de cálcio nesta fase é contrabalançada principalmente por uma corrente repolarizante de potássio (através de canais retificadores tardios). Os canais de cálcio se inativam com o tempo, enquanto mais canais retificadores de potássio se abrem. Um maior número de canais abertos de potássio resulta na repolarização da célula (fase 3). Todo o processo, entre a abertura dos canais de sódio e a repolarização, dura algumas centenas de milissegundos, porém a duração do potencial de ação varia para cada espécie. A cada potencial de ação, o cardiomiócito ganha íons de sódio e perde íons de potássio. No entanto, a manutenção da homeostase¹ intracelular é garantida pelo mecanismo de bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, que retira três íons de sódio da célula para cada dois íons de potássio que entram, atuando também no processo de repolarização celular.

É importante ressaltar que o mecanismo descrito sofre modificações para certos tipos de células cardíacas como, por exemplo, as células das fibras de Purkinje², que apresentam potenciais de ação muito longos e maior velocidade de despolarização, adequados para as funções que esse sistema de condução exerce.

O nódulo sino-atrial, ou sinusal, é uma estrutura anatômica do coração responsável pela geração dos impulsos cardíacos normais. A condução do impulso é dependente da direção, ocorrendo três vezes mais rápido no sentido longitudinal (isotrópica) do que no transversal (anisotrópica) das células, pois os cardiomiócitos, com formato longo e fino, são conectados por um maior número de *gap junctions* (discos intercalares), estruturas com baixa resistência elétrica, em suas terminações do que em suas laterais. Uma representação do processo de propagação do estímulo elétrico no coração é vista na Figura 2.

Os impulsos gerados no nódulo sinusal se propagam pelo átrio, promovendo a sístole atrial (correspondente à onda P do eletrocardiograma). A condução é mais lenta no nódulo atrioventricular, permitindo que o sangue ejetado pelos átrios penetre nos ventrículos. Após atravessar o nódulo atrioventricular, os impulsos elétricos atingem o sistema de condução ventricular, no qual a corrente de sódio é muito elevada, permitindo uma dissipação do impulso de forma ordenada e isotrópica, no sentido longitudinal e na direção do endocárdio para o

¹ *O princípio da homeostase estabelece que, dentro de determinados limites, o organismo tende a manter a estabilidade do meio interno, apesar das variações no meio externo.*

² *As fibras de Purkinje localizam-se nas paredes internas ventriculares do coração e são especializadas na condução rápida do impulso elétrico no coração fazendo que este se contraia de forma coordenada.*

epicárdio, produzindo a sístole ventricular (complexo QRS no eletrocardiograma). Ocorre então a repolarização dos átrios (junto com o complexo QRS, não visível no eletrocardiograma) e dos ventrículos (onda T no eletrocardiograma).

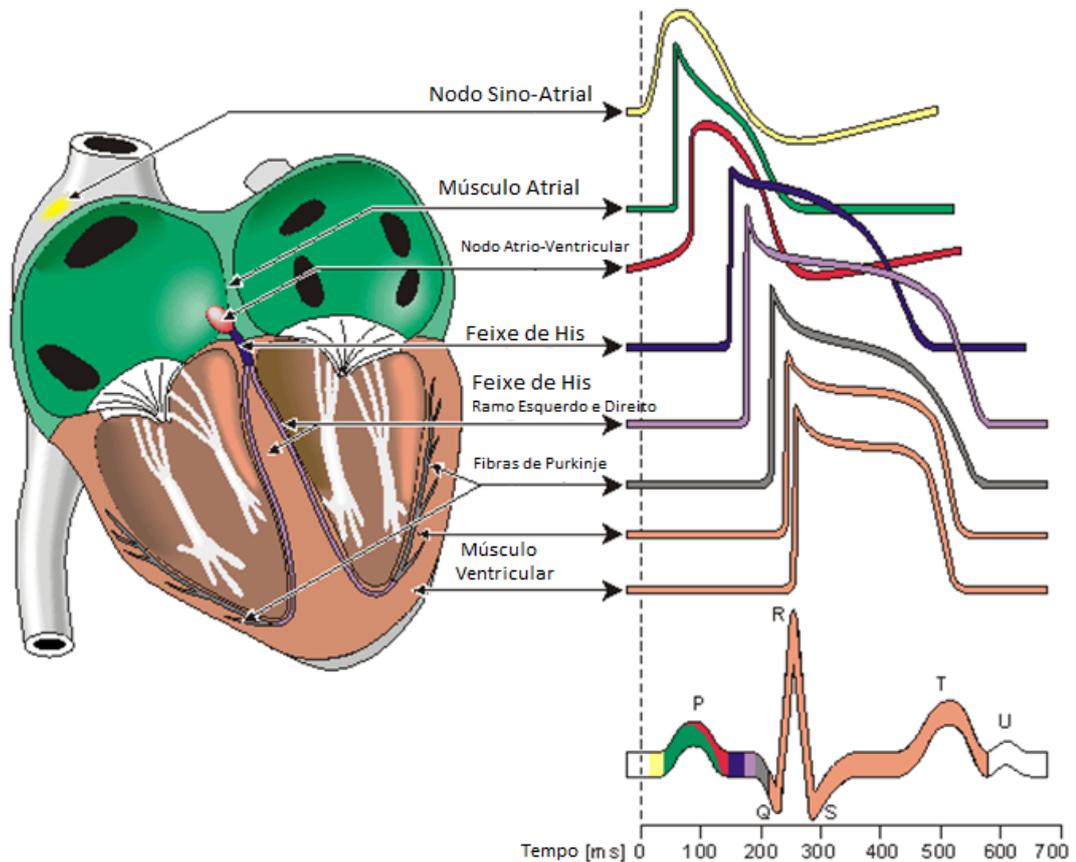


Figura 2: Esquema da contração cardíaca, potenciais de ação de cada tipo celular e resposta resultante de eletrocardiograma.

2.1.2

Correntes Transmembranares e Modelagem Matemática

A membrana celular contém canais iônicos que permitem íons específicos atravessarem a membrana, por um processo passivo governado pelo gradiente de concentração e pelo potencial da membrana. Para entender a resposta elétrica de uma célula é necessário entender o funcionamento dos canais iônicos e, conseqüentemente, a regulação das correntes iônicas que passam através desses canais.

O potencial de ação de uma célula é o resultado da dinâmica de vários íons que atravessam a membrana por processos ativos ou passivos, e modelos

matemáticos para simular o potencial de ação ajudam a entender a eletrofisiologia celular. Hodgkin e Huxley [28] desenvolveram o primeiro modelo quantitativo do sinal elétrico celular em um axônio gigante de lula, explicando o potencial de ação no tecido nervoso. A teoria de Hodgkin-Huxley foi expandida para outras células excitáveis e vem sendo amplamente aperfeiçoada para células cardíacas.

A membrana celular separa dois meios carregados e pode ser modelada como um capacitor. Sua capacitância por unidade de área (C_m) é tipicamente $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ e obedece a seguinte relação:

$$C_m = \frac{Q}{V}, \quad (2)$$

onde Q é a quantidade de carga, dada em coulombs e V é o potencial eletroestático, dado em volts.

Os canais iônicos são modelados como resistências variáveis e um simples modelo de circuito simula o potencial membranar, onde a membrana age como um capacitor em paralelo com resistências variáveis, como representado na Figura 3. Cada resistência representa um canal iônico permeável ao íon S , com uma condutividade G_S , corrente I_S e fonte com energia igual à energia de repouso (E_S) do íon S . No modelo de Hodgkin-Huxley foram descritas as correntes passando por canais de sódio e potássio e uma corrente de fuga incluindo todos os outros canais que não foram descritos explicitamente.

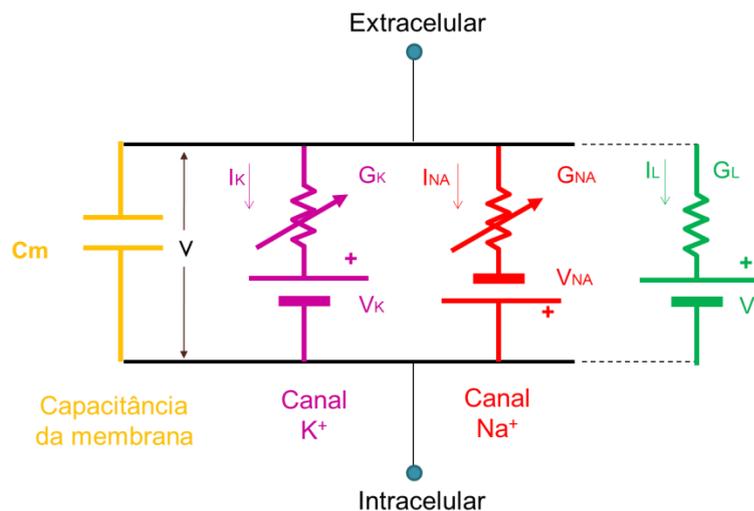


Figura 3: Representação da modelagem matemática do potencial de ação por Hodgkin e Huxley, possuindo canais de sódio e potássio e uma corrente de vazamento, que inclui os outros canais não descritos explicitamente.

Cada uma dessas resistências representa um tipo de canal iônico presente na membrana celular e, conseqüentemente, a corrente iônica que atravessa este canal. A capacitância da membrana é considerada constante e a soma das correntes que atravessam o capacitor e das correntes iônicas é zero, desta forma obtemos através de (2):

$$C_m \frac{dV}{dt} + I = 0 \quad (3)$$

onde I é a soma de todas as correntes que atravessam a membrana celular por processos ativos ou passivos e V é a diferença de potencial da membrana celular.

Não há nenhuma equação universal para as correntes iônicas. A corrente em cada canal iônico depende da voltagem da membrana e das concentrações internas e externas do íon em questão. A abertura e fechamento de cada canal iônico serão responsáveis pelas alterações no potencial membranar e, dessa forma, são a base da resposta elétrica celular.

No formalismo de Hodgkin-Huxley, a corrente que atravessa a membrana por todos os canais de um mesmo tipo é o produto de dois termos:

$$I_S = G_S(V - V_S) \quad (4)$$

onde G_S é a condutância do canal para um íon S , V_S é o potencial de Nerst para o íon S , e V é a voltagem da membrana.

A condutância de cada canal é variável e dependente do potencial da membrana e do gradiente de concentração do íon que atravessa o canal. Dados experimentais da relação corrente-voltagem de vários tipos de canais iônicos são usados como base para modelar a condutância desses canais. A maioria dos canais, como os canais de sódio rápidos, possuem comportas que abrem e fecham, permitindo ou não a entrada e saída de íons. Essa regulação de abertura e fechamento das comportas foi descrita matematicamente por Hodgkin e Huxley e é única para cada tipo de canal.

Para os canais de sódio rápidos tem-se:

$$G_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h j \quad (5)$$

Onde \bar{g}_{Na} é constante e m , j e h da equação (5) são descritos por:

$$\frac{dw}{dt} = \alpha_w(1 - w) - \beta_w w, \quad \text{onde } w = m, h, j \quad (6)$$

As quantidades m , h e j são adimensionais e podem variar entre 0 e 1, representando a razão de abertura das comportas contidas no canal de sódio rápido. As quantidades α_w e β_w são funções de V , independem do tempo e têm dimensão t^{-1} , onde α_w determina a taxa de transferência de íons do exterior para o interior da célula e β_w determina a taxa de transferência de íons do interior para o exterior da célula. Para determinar α_w e β_w são necessários dados experimentais do canal estudado durante ativação e inativação.

Para cada novo canal é necessária a formulação de sua condutância, com a utilização de dados experimentais de *patch-clamp*³ para determinação de constantes. Entretanto, a complexidade da célula cardíaca e sua dinâmica iônica tornam a modelagem do potencial de ação de um cardiomiócito complicada, obrigando a inclusão de vários novos tipos de canais iônicos e dinâmica detalhada do cálcio intracelular. A existência de uma reserva de cálcio contida no retículo sarcoplasmático que será liberada durante o processo do potencial de ação, e posteriormente preenchida, tem que ser levada em conta, de forma a simular a dinâmica do íon cálcio de acordo com a realidade.

A utilização de técnicas de *voltage-clamp*⁴ para o estudo experimental das correntes iônicas transmembranares nas células do músculo cardíaco mostrou que a análise quantitativa dos vários componentes das correntes iônicas que contribuem para o potencial de ação cardíaco é muito mais complexa que para neurônios [30,36]. Avanços nos modelos matemáticos do potencial de ação cardíaco baseados nos dados experimentais de *voltage-clamp* vêm sendo utilizados para melhorar o entendimento de vários aspectos da eletrofisiologia cardíaca. Ultimamente, modelos do potencial de ação de um cardiomiócito apresentam informações detalhadas das correntes iônicas e ciclo iônico intracelular para o estudo de patologias como insuficiência cardíaca, defeitos genéticos, hiper-concentração de um íon [20-24,37-46], etc.

³ *Patch-clamp* é uma técnica usada para analisar o desempenho de um simples canal, baseada no isolamento de uma pequena área de membrana com uma pipeta de vidro, permitindo a medição do fluxo de íons na área isolada e o cálculo do número de vezes que o canal abriu ou fechou.

⁴ *Técnica de patch-clamp com sistema para manter a voltagem da membrana celular fixa, medindo a corrente que passa através de uma área da membrana celular.*

2.2

Mapas ópticos e sua instrumentação

A utilização de corantes fluorescentes para a medição de propriedades celulares é um procedimento amplamente difundido e depende principalmente das especificações do corante utilizado [47]. Para imageamento da atividade elétrica das células podem ser utilizados corantes potenciométricos, cuja variação de fluorescência depende do potencial da membrana celular.

2.2.1

Corantes Potenciométricos ^[19,47-49]

Para a obtenção de informações da atividade elétrica das células por fluorescência podem ser utilizados corantes da família ANEPPS (como o Di-4-ANEPPS), cuja intensidade da fluorescência muda quando a diferença de potencial elétrico entre o meio externo e interno da célula se altera (~10% para cada 100 mV com o Di-4-ANEPPS). A excitação deste corante, em nível molecular, envolve o movimento de carga positiva, que no estado fundamental está no nitrogênio do anel piridínio (Figura 4). O di-4-ANEPPS possui máximo de excitação aproximadamente em 502 nm e máximo de emissão em 723 nm.

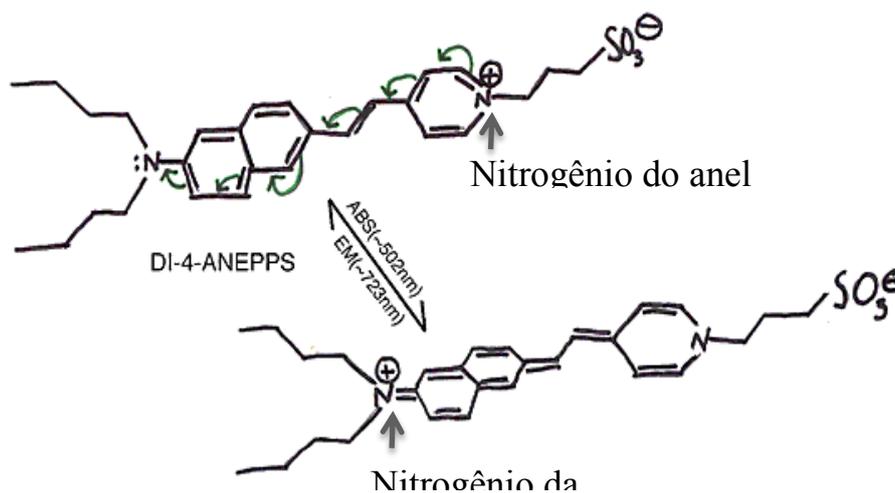


Figura 4: Absorção e Emissão do corante di-4-ANEPPS: a carga desloca-se por ressonância, para o final da molécula e se localiza no nitrogênio da anilina

[Figura adaptada da referência 47].

Quando o corante dissolvido em etanol 70% é excitado óticamente utilizando uma radiação com comprimento de onda na faixa do verde (~502 nm), a carga desloca-se por ressonância do nitrogênio do anel piridínio, para o final da molécula e se localiza no nitrogênio da anilina. As moléculas de ANEP se orientam de forma a ficarem perpendiculares à superfície da membrana, como mostra a Figura 5, garantindo que a redistribuição de carga induzida pela excitação ocorrerá paralela ao campo elétrico presente na membrana. Uma mudança na diferença de potencial através da membrana causará um deslocamento espectral resultante da interação direta do campo elétrico e os momentos de dipolo do estado excitado e fundamental da molécula. A variação da intensidade da fluorescência do corante dá informação sobre a resposta da célula à aplicação do campo.

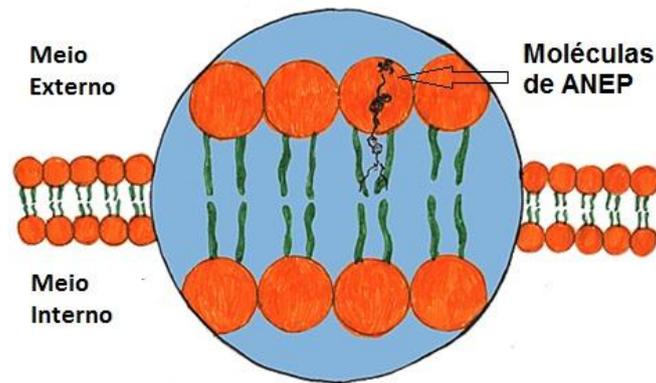


Figura 5: Orientação das Moléculas de ANEP no interior da membrana celular.

A Figura 6A mostra os espectros de fluorescência em função do tempo de um coração isolado de coelho corado com Di-4-ANEPPS, detectados utilizando duas fotomultiplicadoras (540 nm e > 610 nm) simultaneamente. A razão entre as duas fluorescências (Figura 6B) remove a distorção no sinal causada pelo movimento do tecido cardíaco e reproduz o potencial de ação cardíaco medido simultaneamente por eletrodo intracelular (Figura 6C).

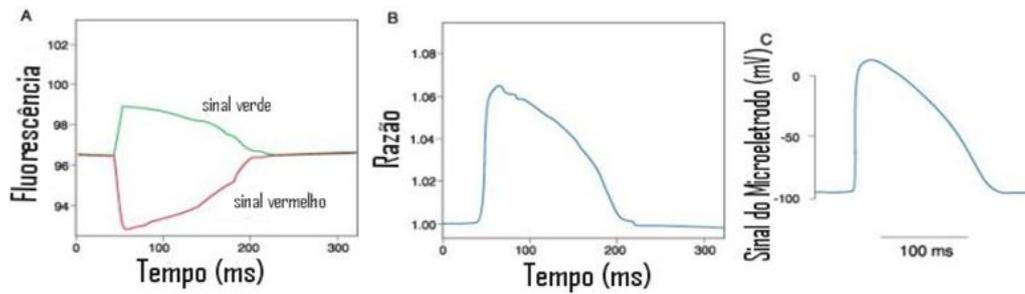


Figura 6: Detecção do potencial de ação de um coração isolado de coelho corado com Di-4-ANEPPS. A excitação foi feita com um laser de argônio operando em 488nm e a detecção foi feita simultaneamente com fotomultiplicadoras em 540 nm e 610 nm (A). Razão entre as duas curvas de fluorescência (B). Um microeletrodo intracelular foi utilizado simultaneamente às medidas (C) [49]

2.2.2

Sensores CCD

Em 1969, F. Sangster e K. Teer [50], dos Laboratórios de Pesquisa da Philips, inventaram um dispositivo capaz de transferir pacotes de carga entre transistores. Em seguida, W. Boyle e G. Smith [51], dos laboratórios Bell, desenvolveram este conceito inventando um mecanismo de transporte de carga de um capacitor para outro. Esse novo dispositivo recebeu o nome de *Charge Coupled Device* ou simplesmente CCD, consistindo em um circuito integrado que contém uma série de capacitores acoplados sensíveis à luz, podendo ser usado como um sensor de imagem.

O sensor CCD é composto por uma série de capacitores de metal-óxido-semicondutor (MOS), que podem acumular e armazenar carga devido a sua capacitância, sendo que cada capacitor representa um pixel. Aplicando uma voltagem externa às placas superiores da estrutura MOS, cargas podem ser armazenadas como resultado do poço de potencial criado. Após a luz incidente atingir o sensor, gerando elétrons pelo efeito fotoelétrico, cada pixel, isto é, cada capacitor, transfere sua carga ao vizinho por meio de aplicações de voltagem nos chamados *gates*. Este processo se repete sucessivamente até que toda carga acumulada gere um sinal de voltagem de saída que seguirá para amplificação. Desta forma as cargas podem ser transferidas coluna a coluna para uma “linha

registradora” e depois para o elemento de saída, sequencialmente. A corrente elétrica passa por um conversor analógico-digital (ADC) e a imagem resultante está digitalizada. A imagem, então, será a exibição da distribuição das cargas. Pode-se entender com mais detalhes o funcionamento de uma CCD observando a Figura 7.

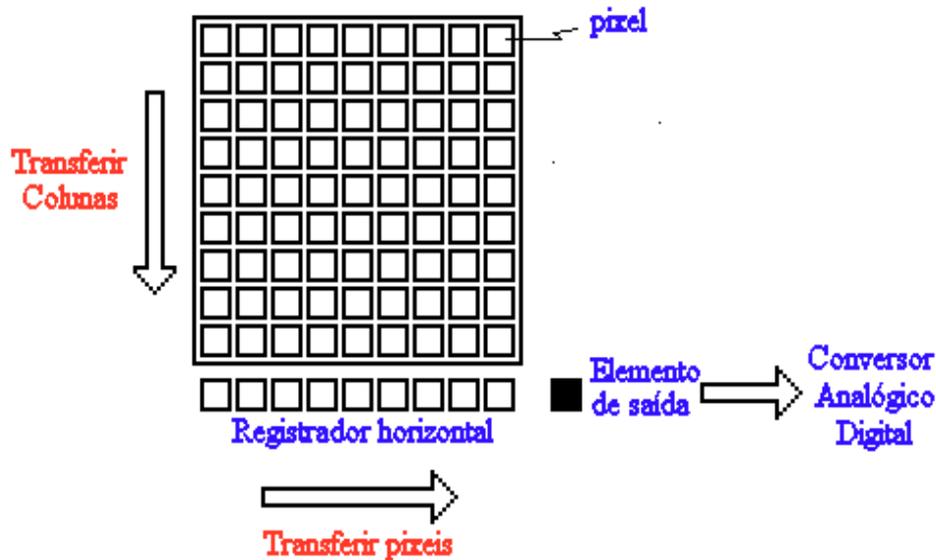


Figura 7: Esquema de um sensor CCD [52].

As vantagens da utilização de CCDs vêm de características como sua boa resolução espacial, ótima eficiência quântica⁵ permitindo detecções de sinais fracos, larga janela espectral, baixo ruído e boa linearidade. Porém, uma desvantagem imediata é o alto custo de sensores CCD de boa qualidade e sua baixa sensibilidade no ultravioleta.

Atualmente, a tecnologia de imageamento possui várias opções para rápida aquisição do sinal de fluorescência, incluindo fotomultiplicadoras, câmeras CCDs e conjuntos de fotodiodos [9]. Os sensores CCD possuem uma vantagem significativa na detecção de mapas ópticos em corações isolados, pois possuem alta resolução espacial devido à grande quantidade de pixels no sensor. Entretanto a taxa de aquisição é geralmente menor, podendo ser aumentada pela binagem dos pixels.

⁵ A eficiência quântica de um fotocondutor é definida como sendo a relação entre o número de elétrons que se deslocam no circuito externo por unidade de tempo e o número de fótons que penetram no fotocondutor por unidade de tempo.

O processo de binagem consiste na combinação de vários pixels em um único pixel, referido como *superpixel*. Para entender o processo considera-se o caso de uma binagem 2x2 ilustrado na Figura 8. Um esquema de 4x4 pixels está representado na Figura 8A juntamente com um registrador em série e um pixel de soma, que podem acumular carga de mais de um pixel. A luz incidente atinge o sensor, gerando elétrons que acumulam em cada pixel, mostrado na Figura 8B. A carga em cada pixel do sensor é transferida para o *gate* acima configurando o arranjo mostrado na Figura 8C. Repetindo o processo anterior de forma a transferir a carga contida em cada pixel para o *gate* acima, acumula-se de carga de duas linhas no registrador em série, como representado na Figura 8D. O passo seguinte transfere os elétrons do registrador em série para o pixel de soma, como mostra a Figura 8E, e a carga combinada é acumulada no pixel de soma. Esse processo se repete até que todos os elementos do conjunto de capacitores sejam transferidos (Figura 8F).

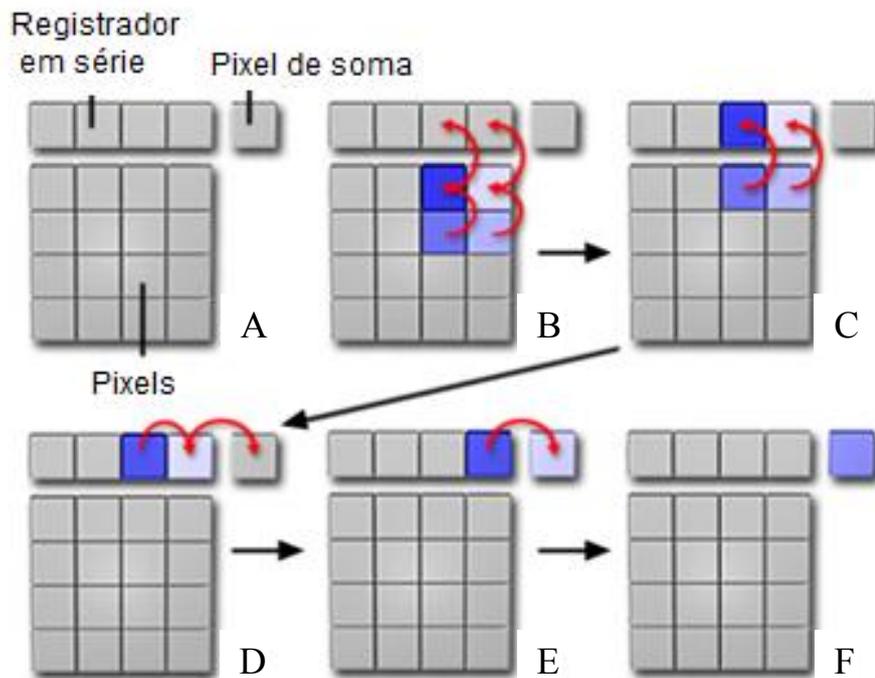


Figura 8: Representação do processo de binagem 2x2 de um sensor CCD [53].

O processo de binagem possui duas grandes vantagens, que consistem no aumento da razão sinal-ruído e na possibilidade de aumentar a taxa de aquisição, porém causa uma piora na resolução espacial da imagem adquirida.

2.3

Processamento de Sinais

Um método amplamente utilizado para melhorar a resolução espacial ou temporal de um sinal de mapeamento óptico é a aplicação de um processamento digital no sinal, como filtragem e interpolação. Neste trabalho são utilizados os filtros Butterworth, com objetivo de reduzir o ruído do sinal experimental, e as interpolações por *Cubic Spline* e *Spline Fit*, com o objetivo de melhorar a resolução temporal do sinal experimental.

2.3.1

Filtro Butterworth

Os filtros de Butterworth são especificados de modo a terem uma função de transferência com o mínimo de oscilações tanto na banda passante como na banda de rejeição. Como em todos os gêneros de filtros, o modelo típico é o filtro passa-baixa, que pode ser modificado para se tornar um filtro passa-alta, ou colocado em série com outros filtros para formar filtros passa-faixa ou rejeita-faixa, e versões de ordem mais elevadas destes.

A magnitude da resposta em frequência de um filtro Butterworth passa-baixa de ordem n pode ser definida matematicamente como:

$$G_n(\omega) = |H_n(j\omega)| = \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{\omega}{\omega_c})^{2n}}} \quad (7)$$

onde G é o ganho do filtro, H é a função de transferência, n é a ordem do filtro, ω é a frequência angular do sinal em radianos por segundo e ω_c é a frequência de corte [54].

2.3.2

Interpolação por Cubic Spline e Spline Fit

Os métodos de interpolação são utilizados para adicionar novos pontos dentro de um conjunto de pontos conhecidos. Esses métodos são amplamente utilizados para construir uma função que passa pelos dados conhecidos gerando novos pontos de dado, coerentes com o conjunto conhecido.

O termo "*spline*" faz referência a uma ampla classe de funções que são utilizadas em aplicações que requerem a interpolação de dados, ou a suavização

de curvas. Os *splines* são utilizados para trabalhar tanto em uma como em várias dimensões.

Um *spline* é uma curva definida em porções mediante polinômios. Nos problemas de interpolação, utiliza-se com frequência a interpolação mediante *splines* por gerar resultados similares ao conjunto de dados conhecidos, requerendo somente o uso de polinômios de baixo grau, evitando assim as oscilações, indesejáveis na maioria das aplicações, encontradas ao interpolar mediante polinômios de grau elevado.

A técnica de aproximação consiste na divisão do intervalo de interesse em vários subintervalos e na interpolação, da forma mais suave possível, nestes subintervalos com o uso de polinômios de pequeno grau. Cada subintervalo é separado por “nós” que definem os limites dessas subdivisões e são pontos do conjunto original de dados. Seja uma subdivisão do intervalo $[a,b]$. Uma função *spline* de grau p com nós nos pontos (x_i, f_i) para $i = 0, \dots, m$ é uma função $S_p(x)$ com as propriedades:

a) em cada subintervalo $[x_i, x_{i+1}]$ ($i = 0, \dots, m-1$), $S_p(x)$ é um polinômio de grau p .

b) $S_p(x)$ é contínua em $[a,b]$ e tem derivada contínua em $[a,b]$ até ordem p .

A *spline* interpolante é a função $S_p(x)$ tal que $S_p(x_i) = f_i$ ($i=0, \dots, m$) onde p é o maior grau entre os polinômios utilizados.

Nesta tese utilizaram-se dois tipos de função *spline* denominadas *Cubic Spline* e *Spline Fit*.

O chamado *Cubic Spline* utiliza na interpolação polinômios de terceiro grau para cada segmento e sua forma será:

$$y = a_i (x - x_i)^3 + b_i (x - x_i)^2 + c_i (x - x_i) + d_i \quad (8)$$

O intervalo entre os nós pode ser desigual e é dado por: $h_i = x_{i+1} - x_i$.

O *Spline Fit* é uma técnica de análise de dados para estimar, pelo método de mínimos quadrados, os parâmetros de um modelo de aproximação polinomial por *spline*. Neste caso, o grau de liberdade está conectado com o valor do parâmetro “*break*” que estabelece o número de nós a serem utilizados. Desta forma a suavização da curva *spline* é controlada pela seleção do valor do *break*. Quanto maior este valor menor serão os intervalos entre os nós e menor será a suavização da curva.

É possível definir *breaks* com valores distintos para diferentes partes do conjunto de dados original. Essa propriedade permite definir segmentos com maior ou menor suavização para o conjunto original de dados, de forma a interpolar dados cujo comportamento requer diferentes padrões de suavizações em diferentes segmentos.