

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA
INSTITUTO DE FÍSICA**

**ANÁLISE DA ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO ÓPTICO EM PHANTOMS
DE TECIDO BIOLÓGICO UTILIZANDO A TÉCNICA DE IMAGEM NO DOMÍNIO
DE FREQUÊNCIA ESPACIAL**

LUISMAR BARBOSA DA CRUZ JUNIOR

Uberlândia

2018

**ANÁLISE DA ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO ÓPTICO EM PHANTOMS
DE TECIDO BIOLÓGICO UTILIZANDO A TÉCNICA DE IMAGEM NO DOMÍNIO
DE FREQUÊNCIA ESPACIAL**

*Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Física da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito para obtenção do Título de Mestre
em Física.*

Uberlândia, 27 de julho de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C957a Cruz Junior, Luismar Barbosa da, 1991-
2018 Análise da absorção e espalhamento óptico em phantoms de tecido biológico utilizando a técnica de imagem no domínio de frequência espacial [recurso eletrônico] / Luismar Barbosa da Cruz Junior. - 2018.

Orientador: Adamo Ferreira Gomes do Monte.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Física.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1188>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Física. 2. Espalhamento (Física). 3. Absorção. 4. Imagens ópticas.
I. Monte, Adamo Ferreira Gomes do (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDU: 53

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA



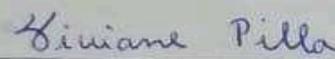
LUISMAR BARBOSA DA CRUZ JUNIOR

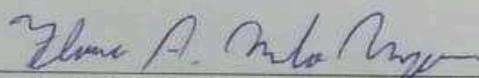
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física, do Instituto de Física, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física.

Uberlândia, 27 de Julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Adamo Ferreira Gomes do Monte
Universidade Federal de Uberlândia - UFU


Prof. Dr. Viviane Pilla
Universidade Federal de Uberlândia - UFU


Prof. Dr. Flavio Augusto de Melo Marques
Universidade Federal de Lavras - UFLA

DEDICATÓRIA

Dedico à Danielly.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Física, PPGFIS, pela oportunidade de realização de trabalhos em minha área de pesquisa e ao CNPq, Capes e FAPEMIG quanto à aprovação de projetos de pesquisa.

Aos Professores e amigos do Instituto de Física da UFU, que participaram da minha formação acadêmica. Aos colegas do PPGEE pelo seu auxílio nas tarefas desenvolvidas durante o curso.

Ao Prof. Dr. Adamo Ferreira Gomes do Monte pela excelente orientação, paciência, dedicação e ensinamentos para a realização deste trabalho.

A minha família por todo apoio durante todos estes anos de estudo, principalmente ao meu pai por todo suporte ao longo de minha graduação e minha querida avó e tia por todo carinho e amor que me deram desde pequeno.

Por fim, agradeço a minha companheira Danielly por todos os incríveis momentos que tive e tenho ao seu lado. Por suportar todos os momentos difíceis e me ajudar a superá-los.

RESUMO

Atualmente o método mais utilizado para análise de tumor em tecidos biológicos é através da biopsia, técnica a qual demanda tempo, alto custo e incômodo ao paciente. Para reduzir estes transtornos e aumentar a eficácia dos exames de tumores é proposto a técnica de Imagem no Domínio de Frequência Espacial (do inglês *SFDI*) para obter parâmetros ópticos de análise. A técnica de *SFDI* se baseia na reflexão e absorção da luz, podendo medir e mapear coeficientes de absorção (μ_a) e espalhamento ópticos (μ_s) em tecidos e *phantoms*, sem haver contato direto, as quais são obtidas combinando uma iluminação periódica modulada espacialmente com um sistema de imagem baseado em câmera. Neste trabalho o objetivo é utilizar a técnica de *SFDI* para analisar parâmetros biológicos de absorção e espalhamento de três cromóforos: hemoglobina, lipídeo e água. Inicialmente esses parâmetros foram determinados utilizando a técnica de esfera integradora, posteriormente comparou esses resultados com o processamento de dados pela técnica de *SFDI*. Por fim aplicou-se a técnica de imagem em *phantom* biológico a base de carne de ave e gordura bovina. Os resultados indicam que a técnica foi sensível a variações nas concentrações dos cromóforos, deste modo, dando indícios de uma possível aplicação médica na detecção de tumores.

Palavras-chaves: Caracterização, SFDI, Absorção, Espalhamento.

ABSTRACT

Currently, the most widely method used for tumor analysis in biological tissues is through biopsy, a technique that demands time, high cost and inconvenience to the patient. To reduce these disorders and to increase the effectiveness of the tumor examinations, the technique of Spatial Frequency Domain Image (SFDI) was proposed to obtain optical parameters of analysis. The SFDI technique is based on light reflection and absorption, and it can measure and map optical absorption (μ_a) and scattering coefficients (μ_s) in tissues and phantoms without direct contact, which are obtained by combining a spatially modulated periodic illumination with a camera-based imaging system. In this work we aim to use the SFDI technique to analyze biological parameters of absorption and scattering of three different chromophores: hemoglobin, lipid and water. Initially measurements were made using the integrate sphere technique, later the results were compared with the data processing by the SFDI technique. Finally, the biological phantom image technique was applied based on avian meat and bovine fat. The results indicate that the technique is sensitive to variations in concentrations of chromophores, thus giving indications of a possible medical application in detection of tumors.

Keywords: Characterization, SFDI, Absorption, Scattering.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	16
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	17
2.1	INTERAÇÃO DA LUZ EM MEIOS OPACOS	17
2.1.1	REFRAÇÃO	17
2.1.2	ABSORÇÃO	21
2.1.3	ESPALHAMENTO DA LUZ	26
2.2	PROPAGAÇÃO DA LUZ EM MEIOS OPACOS	29
2.2.1	EQUAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA RADIATIVA (ETR).....	29
2.2.2	APROXIMAÇÃO DE DIFUSÃO	30
2.2.3	IMAGEM NO DOMÍLIO DA FREQUÊNCIA ESPACIAL (SFDI)	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1	MONTAGEM EXPERIMENTAL.....	38
3.1.1	EQUIPAMENTO DO <i>SFDI</i>	38
3.1.2	EQUIPAMENTO DA ESFÉRA INTEGRADORA	42
3.1.3	PREPARAÇÃO DOS <i>PHANTOMS</i>	44
3.2	AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DAS IMAGENS PELO <i>SFDI</i>	48
3.3	REFERÊNCIA: ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO <i>ZnPC</i>	52
3.4	IMAGEM DE MAPEAMENTO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE <i>SFDI</i>	55
3.4.1	ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO: FTALOCIANINA DE ZINCO	55
3.5	APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DO <i>SFDI</i>	60
4	CONCLUSÃO.....	66
5	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
6	REFERÊNCIAS	68
7	ANEXO I.....	72
8	ANEXO II.....	77
9	ANEXO III.....	83
10	ANEXO IV	86

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO DA PROPAGAÇÃO DA LUZ DE UM MEIO (1) PARA UM MEIO (2) E A MUDANÇA NA DIREÇÃO E VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DA LUZ APÓS A PASSAGEM NA INTERFACE DE INTERAÇÃO ENTRE OS DOIS MEIOS.	19
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DA LEI DE LAMBERT-BEER. A PROPAGAÇÃO DA LUZ ATRAVÉS DE UM MEIO MATERIAL, ONDE HÁ ATENUAÇÃO PELO MEIO DURANTE O PROCESSO DE TRANSMISSÃO.....	24
FIGURA 3: ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA JANELA ÓPTICA (OU JANELA TERAPÊUTICA) DOS PRINCIPAIS CROMÓFOROS DO TECIDO BIOLÓGICO ANIMAL COMO HEMOGLOBINA (Hb), OXIHEMOGLOBINA (HbO ₂), ÁGUA E LIPÍDEOS. (SOTO, 2016).....	26
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DO EVENTO DE ESPALHAMENTO ONDE HÁ MUDANÇA DE DIREÇÃO DO FÓTON INCIDENTE APÓS A INTERAÇÃO COM O MEIO ESPALHADOR EM UM SISTEMA SEM PERDAS DE ENERGIA (SOTO, 2016).	27
FIGURA 5: (A) ESQUEMA DAS CONDIÇÕES DE CONTORNO UTILIZADOS NA AQUISIÇÃO DOS PARÂMETROS DA FONTE.....	31
FIGURA 6: LOOKUP TABLE DE DOIS COMPONENTES DA REFLECTÂNCIA (R_{AC} E R_{DC}) GERADO ATRAVÉS DO MODELO DE DIFUSÃO UTILIZADO COMO EXEMPLO (CUCCIA, 2009). NOTA-SE QUE PARA $R_{AC}(F_x=0.05) = 0.06$ E $R_{DC}(F_x=0.05) = 0.55$ OBTEMOS ENTÃO $M_A \approx 0.03$ E $M_S \approx 1.4$	36
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE SFDI IN VIVO (CUCCIA, 2009) (ADAPTADO).....	37
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EQUIPAMENTO DA TÉCNICA DE SFDI (NADEAU, ET AL., 2003, ADAPTADO). EM (1) ESTÁ REPRESENTADO O PROJETOR, (2) A AMOSTRA, (3) DISCO DE FILTROS E (4) CÂMERA DE CAPTURA DAS IMAGENS.	39
FIGURA 9: (A) PROJETOR VIVITEK; (B) VISTA SUPERIOR DO PROJETOR DESMONTADO E ACOPLADO A ESTRUTURA DO EQUIPAMENTO E (C) VISTA FRONTAL COM OS COMPONENTES ÓPTICOS E ELETRÔNICOS FIXADOS A PLACA SUPERIOR E INFERIOR DO PROJETOR DO SFDI.	39
FIGURA 10: (A) VISTA FRONTAL E (B) VISTA LATERAL DO PROJETOR E DA CÂMERA DO SFDI, POR FIM, É MOSTRADO EM (C) A CAPACIDADE DE MOBILIDADE DO BRAÇO ACOPLADO À	

APARELHAGEM, ONDE FOI FIXADO A UM BRAÇO MECÂNICO DOBRÁVEL, VISTO QUE PRETENDE-SE FAZER IMAGENS FUNCIONAIS.	40
FIGURA 11: (A) VISTA FRONTAL E (B) VISTA DA PARTE TRASEIRA (FECHADA) DA MESA ONDE ESTÁ FIXADO O APARELHO DE <i>SFDI</i> PARA OBTER IMAGENS MÉDICAS. EM (C) TEMOS A REGIÃO TRASEIRA CONTENDO A PARTE ELETRÔNICA DO EQUIPAMENTO.	41
FIGURA 12: (A) IMAGEM DO EQUIPAMENTO DE ESFERA INTEGRADORA UTILIZADA NESTE TRABALHO (B) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EQUIPAMENTO.	43
FIGURA 13: <i>PHANTOMS</i> DE CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE <i>SFDI</i> CONTENDO 5 MG DE TiO_2 , 150 ML DE PDMS E 70 MG DE CORANTE.	45
FIGURA 14: <i>PHANTOMS</i> DE SIMULAÇÃO PREPARADOS EM NOSSO LABORATÓRIO, UTILIZANDO FTALOCIANINA DE ZINCO COMO MEIO ABSORVEDOR.	47
FIGURA 15: PAINEL FRONTAL DA INTERFACE EM LABVIEW DO PROGRAMA QUE COLHE AS IMAGENS A SEREM TRABALHADAS.	49
FIGURA 16: IMAGENS OBTIDAS A PARTIR DO PROGRAMA EM LABVIEW DO <i>SFDI</i> , REPRESENTANDO AS FASES $\theta = 0, 120, 240$ RADIANS E NA FREQUÊNCIA ESPACIAL FIXA EM 400 NM EM <i>PHANTOM</i> DE FTALOCIANINA.	50
FIGURA 17: IMAGENS REPRESENTANDO DIFERENTES FREQUÊNCIAS ESPACIAIS F_x , MANTENDO COMO REFERÊNCIA O COMPRIMENTO DE ONDA $\lambda=780$ NM E A FASE $\theta=0^\circ$	51
FIGURA 18: ESPECTROS DE ABSORÇÃO (A) E ESPALHAMENTO (B) DO <i>PHANTOM</i> ZnPc EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA EM TODAS AS CONCENTRAÇÕES PRESENTES NO <i>PHANTOM</i>	53
FIGURA 19: ESPECTRO COMPARATIVO DE ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO DA ZnPc CONTENDO 3.84 MG/ML DE ZnPc E 2.5 MG/ML DE TiO_2 (AMOSTRA C2) À 300 K, USANDO UMA ESFERA INTEGRADORA.	54
FIGURA 20: MAPEAMENTO COMPARATIVO DA ABSORÇÃO (A) E ESPALHAMENTO (B) (APRESENTADO NAS COLUNAS) DA FTALOCIANINA DE ZINCO NOS SEGUINTE COMPRIMENTOS DE ONDA (APRESENTADO AO LADO DA FIGURA CORRESPONDENTE).	56
FIGURA 21: CURVAS DE ABSORÇÃO (A) E ESPALHAMENTO (B) DO <i>PHANTOM</i> CONTENDO DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE FTALOCIANINA DE ZINCO.	58

FIGURA 22: (A) AMOSTRA DE <i>PHANTOM</i> BIOLÓGICO UTILIZADO NESTA ETAPA DO PROJETO E EM (B) SUA REPRESENTAÇÃO.	61
FIGURA 23: (A) MAPEAMENTO DE ABSORÇÃO E (B) ESPALHAMENTO DO <i>PHANTOM</i> BIOLÓGICO COM SUAS RESPECTIVAS ESCALAS DE CORES PARA REFERÊNCIA, POR FIM, EM (C) A IMAGEM DE REFERÊNCIA CAPTURADA ATRAVÉS DA CÂMERA CCD.	62
FIGURA 24: IMAGEM COMPARATIVA DA ABSORÇÃO NO PRIMEIRO E NO SEGUNDO DIA DA HEMOGLOBINA, LIPÍDEO E ÁGUA RESPECTIVAMENTE.	63
FIGURA 25: MAPEAMENTO DE ABSORÇÃO (A) E ESPALHAMENTO (B) DA FTALOCIANINA DE ZINCO NOS COMPRIMENTOS DE ONDA EM 532 NM.	77
FIGURA 26: MAPEAMENTO DE ABSORÇÃO (A) E ESPALHAMENTO (B) DA FTALOCIANINA DE ZINCO NOS COMPRIMENTOS DE ONDA EM 650 NM.	78
FIGURA 27: MAPEAMENTO DE ABSORÇÃO (A) E ESPALHAMENTO (B) DA FTALOCIANINA DE ZINCO NOS COMPRIMENTOS DE ONDA EM 680 NM.	79
FIGURA 28: MAPEAMENTO DE ABSORÇÃO (A) E ESPALHAMENTO (B) DA FTALOCIANINA DE ZINCO NOS COMPRIMENTOS DE ONDA EM 750 NM.	80
FIGURA 29: MAPEAMENTO DE ABSORÇÃO (A) E ESPALHAMENTO (B) DA FTALOCIANINA DE ZINCO NOS COMPRIMENTOS DE ONDA EM 780 NM.	81
FIGURA 30: MAPEAMENTO DE ABSORÇÃO (A) E ESPALHAMENTO (B) DA FTALOCIANINA DE ZINCO NOS COMPRIMENTOS DE ONDA EM 780 NM.	82
FIGURA 31: (A) ABSORÇÃO E (B) ESPALHAMENTO EM 532 NM.	83
FIGURA 32: (A) ABSORÇÃO E (B) ESPALHAMENTO EM 650 NM.	84
FIGURA 33: (A) ABSORÇÃO E (B) ESPALHAMENTO EM 680 NM.	85
FIGURA 34: (A) ABSORÇÃO E (B) ESPALHAMENTO <i>PHANTOM</i> DESNATURADO EM 532 NM.	86
FIGURA 35: (A) ABSORÇÃO E (B) ESPALHAMENTO <i>PHANTOM</i> DESNATURADO EM 650 NM.	87
FIGURA 36: (A) ABSORÇÃO E (B) ESPALHAMENTO <i>PHANTOM</i> DESNATURADO EM 680 NM.	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA A FABRICAÇÃO DOS PHANTOMS DE CALIBRAÇÃO.	45
TABELA 2: CONCENTRAÇÃO UTILIZADA PARA A FABRICAÇÃO DAS CAMADAS UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DO PHANTOM COMPOSTO.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

CBC – Carcinoma Basocelular

CEC – Carcinoma Espinocelular

CPNM – Câncer de Pele Não Melanoma

CW – Espectroscopia por Migração de Fótons

ETR – Equação de Transferência Radiativa

FOD – Função de Óptica Difusa

Hb – Hemoglobina

IAD - Inverse adding-doubling

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IOD – Imagem Óptica Difusa

O₂Hb – Hemoglobina Oxigenada

PDMS – Polidimetilsiloxano

SFDI- Imagem no Domínio da Frequência Espacial

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele não-melanoma (CPNM) ocorre quando algumas células se dividem de forma desordenada. Estas células organizam-se formando camadas e, dependendo da camada afetada, têm-se assim diferentes tipos de câncer (DERGHAN, 2004). De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o CPNM é o tipo de carcinoma mais frequente no Brasil, entretanto, apresenta alto percentual de cura quando diagnosticado precocemente, sendo mais comum em pessoas com mais de 40 anos, pessoas de pele mais clara e pessoas com doenças cutâneas. Estima-se que para o ano de 2018 haja 165.580 novos casos, desse total, 85.170 de homens e 80.410 de mulheres. Os tipos mais comuns de CPNM são carcinoma o basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC).

A diferença entre o CBC e o CEC está basicamente no tipo de lesão e na evolução do tumor. O diagnóstico visual do CBC ocorre pela presença de uma lesão inicialmente em forma de pápula (pequena elevação na pele) que evolui para um nódulo (formação sólida, em geral na forma arredondada), por fim, gerando uma ulceração (feridas superficiais). Sua evolução ocorre geralmente de forma lenta, sendo menos agressivo que o CEC. Embora este tumor raramente evolua com metástase (espalhar para outros órgãos), ele é localmente invasivo e pode causar uma destruição importante dos tecidos ao seu redor, inclusive cartilagens e ossos. Por outro lado, o CEC pode surgir por meio de uma ferida e evoluir rapidamente, geralmente acompanhado de coceira e corrimento na região. Apresenta maior invasão local, comparado ao CBC, e maior potencial para metástase (TOVO et. al., 2001).

As opções de tratamento para o CPNM incluem tanto procedimentos cirúrgicos quanto não cirúrgicos. Independente da abordagem, os objetivos são: a ressecção completa do tumor, a preservação da maior quantidade possível de tecido normal em volta do tumor, o mínimo de dano cosmético e uma alta taxa de cura. A possibilidade de visualizar a extensão do tumor facilita a decisão médica durante a cirurgia e aumenta a chances de sucesso do processo. Neste sentido, a utilização de uma técnica de imagem óptica poderia auxiliar a abordagem médica tanto no diagnóstico precoce, quanto no procedimento pré-cirúrgico delimitando a região da presença do tumor.

A imagem óptica é um importante recurso para visualizar estruturas e inclusive determinar as funções moleculares nas escalas espaciais de poucos milímetros a centímetros em *phantoms* e tecidos biológicos (BERTOLOTTI et al., 2012; NADEAU et a., 2013). Neste, iremos trabalhar com a técnica de Imagem no Domínio de Frequência Espacial (*Spatial*

Frequency Domain Image - SFDI), onde objetivamos obter parâmetros de absorção e espalhamento em *phantoms* e sistemas biológicos. A técnica de imagem **SFDI** separa as propriedades de absorção e espalhamento óptico através de luz modulada espacialmente, de maneira não invasiva, através de uma imagem óptica difusa (**IOD**). Nestas frequências de modulação, múltiplos espalhamentos provocam o amortecimento da onda de densidade de fótons. O amortecimento da velocidade de fase da onda de densidade de fótons se manifesta como um deslocamento de fase entre os sinais da detecção e da fonte. Informações detalhadas da absorção e do espalhamento óptico aparecem tanto na atenuação da amplitude da função de difusão óptica (**FDO**), quanto no deslocamento de fase. Neste trabalho utilizaremos como modelo piloto um aparelho de **SFDI** desenvolvido no próprio laboratório, onde, em uma etapa inicial pretende-se extrair as propriedades ópticas de *phantoms* objetivando a calibração do instrumento e ainda simular diversos tipos de tecidos biológicos.

O intuito da técnica de **SFDI** é obter medidas quantitativas de absorção e espalhamento óptico por meio de modelos matemáticos de análise que são baseados na modulação espacial da luz. Com isso é possível estudar materiais e tecidos biológicos caracterizando-os com alta sensibilidade e resolução. Uma grande vantagem dessa técnica está principalmente no fato de ser não invasiva, ou seja, não há necessidade de biopsia facilitando assim sua aplicação em tecidos biológicos, além de permitir caracterizar qualquer amostra semitransparente inclusive em sistema biológico *in vivo* (TARONI et al., 2009). Portanto, este trabalho tem o objetivo de investigar possíveis aplicações desta técnica em *phantoms* que simulam o tecido biológico.

O desenvolvimento de técnicas de imagem de diagnóstico comumente requer o uso de *phantoms* que possam imitar o tecido humano o mais próximo possível. Esses *phantoms* são concebidos de tal maneira que as propriedades ópticas sejam similares aos tecidos biológicos e, portanto, constituem uma ferramenta preciosa para se obter um meio bem definido para estudar a propagação da luz.

Métodos de imagem óptica por luz difusa são relativamente baratos e existem a possibilidade de serem portáteis, sendo uma plataforma flexível para determinar a estrutura de tecidos e a composição molecular *in vivo*. Por meio das técnicas de medidas por luz difusa torna-se possível determinar propriedades ópticas dos meios que os *phantoms* simulam. Medidas ópticas de absorção e espalhamento são sensíveis a estruturas em escalas de tamanho do comprimento de onda da luz. Como já descrito por Jacques e colaboradores (2010), estruturas celulares e extracelulares com tamanhos de 200 a 2000 micrometros dominam as medidas ópticas em tecidos biológicos.

A organização dos elementos estruturais do tecido, basicamente células e proteínas extracelulares, influencia variações espaciais nas propriedades de espalhamento e no índice de refração no material que absorvem. O contraste molecular da **IOD** é devido agentes exógenos, tais como moléculas fluorescentes sendo administradas e proteínas luminescentes induzidas geneticamente, assim como moléculas endógenas (cromóforos) que absorvem luz vermelha/infravermelha, como hemoglobina oxigenada (O_2Hb) e reduzida (desoxigenada) (HHb), água, lipídios, porfirinas e citocromos. Um dos objetivos da **IOD** é quantificar a absorção e o contraste de espalhamento em tecidos espessos. Ao contrário dos métodos usuais de imagem (raio-X, ultrassom, etc.), a **IOD** é basicamente um método de imagem funcional de baixa penetração que é bastante sensível aos processos fisiológicos e biológicos.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho possui o objetivo de implementar a infraestrutura instrumental da técnica de caracterização óptica baseada na imagem no domínio da frequência espacial (**SFDI**), e desenvolver uma análise qualitativa do cálculo de absorção e espalhamento. Os cálculos desses parâmetros foram realizados utilizando a equação de difusão em fótons para *phantoms* preparados e processados em nosso laboratório, focando em diferentes componentes para simulação dos tecidos biológicos com hemoglobina, colágeno, lipídeos, entre outros, para futuras possíveis aplicações médicas.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Nesta secção serão descritos os fundamentos teóricos referentes a interação da luz em meios turvos, analisando os processos existentes: refração, absorção e espalhamento. Posteriormente será feita uma análise aprofundada dos fundamentos da técnica de SFDI, base para este trabalho.

2.1 INTERAÇÃO DA LUZ EM MEIOS OPACOS

Tanto tecido biológico, quanto *phantoms*, interagem com a luz de forma similar e estão sujeitos basicamente a três processos principais, refração, absorção e espalhamento. Quando um feixe de luz incide sobre um material de espessura x , parte do feixe é espalhada, parte é absorvida e uma fração atravessa o material sem interagir. Cada processo é observado de forma diferente pelo aparato experimental e nos fornece importantes parâmetros ópticos da amostra, sendo que cada processo pode ser caracterizado pelas seguintes grandezas: Índice de refração [$n(\lambda)$], coeficiente de absorção [μ_a] e de espalhamento [μ_s] (VO-DINH, 2003).

As propriedades ópticas são de particular importância na investigação de vários tipos de doenças e possibilitam o diagnóstico não-invasivo, em especial, para cânceres e tumores malignos. As propriedades ópticas comumente usadas para diagnósticos incluem propriedades de absorção e espalhamento no tecido (WANG; WU, 2012).

Por se tratar da análise de uma região em que, de forma geral, pode ser considerada isotrópica, ou seja, a direção de incidência da luz na interface não interfere na análise do sistema, pode-se simplificar o estudo das propriedades fundamentais desses processos como é mostrado a seguir.

2.1.1 REFRAÇÃO

Quando a luz passa de um meio para outro, sua velocidade aumenta ou diminui devido as diferenças das estruturas atômicas das duas substâncias ou de suas densidades ópticas. A refração é o processo de mudança na direção de propagação da luz quando ela passa em uma superfície ou interface que separa dois meios devido essa alteração na velocidade de propagação da luz. O parâmetro de análise da propagação da luz em cada meio é o chamado índice de refração, o qual é específico para cada material.

2.1.1.1 INDICE DE REFRAÇÃO [$n(\lambda)$]

O índice de refração de um meio indica a velocidade que a luz se propaga no mesmo, sendo que os coeficientes de absorção, reflexão e espalhamento estão diretamente ligados a esse parâmetro. O índice de refração é uma propriedade fundamental para analisar a propagação da luz por uma região, sendo os *phantoms* de forma geral considerados meios homogêneos e podem ser analisados pela Lei de Snell, entretanto, tecidos biológicos e alguns *phantoms* mais elaborados devem ser interpretados como meios heterogêneos e exigem outros critérios para sua análise, como será mostrado no item **2.1.1.3**.

2.1.1.2 REFRAÇÃO EM MEIOS HOMOGENEOS

Quando um feixe de luz se propaga num determinado meio material, com índice de refração n_1 , e se encontra no limite físico com um segundo material, com um índice diferente (n_2), o trajeto da luz é redirecionado. A quantidade de luz refletida e transmitida depende dos índices de refração dos dois materiais, do ângulo de incidência e da polarização da onda de entrada. A relação entre o ângulo de incidência e o ângulo de refração da luz transmitida em meios homogêneos pode ser obtido através da solução geral de uma onda plana uniforme que é dada por:

$$E = E_0 e^{i(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r})} \quad \text{EQ. 1}$$

onde ω a frequência angular da onda e \vec{k} o vetor de onda na direção de propagação da onda.

Para este caso, supondo que na superfície de interação de um meio (1), de índice de refração n_1 e vetor de onda \vec{k} , com um meio (2), com índice de refração n_2 e vetor de onda \vec{k}' , há a incidência de uma onda plana como é mostrado na **Figura 1**.

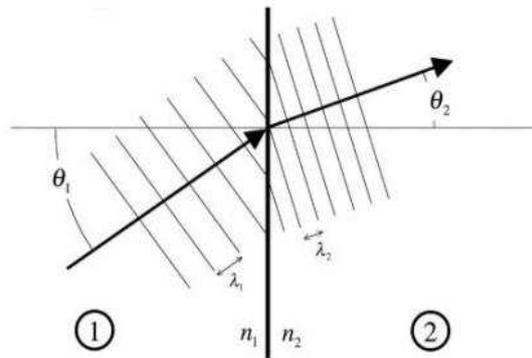


Figura 1: Representação da propagação da luz de um meio (1) para um meio (2) e a mudança na direção e velocidade de propagação da luz após a passagem na interface de interação entre os dois meios.

Por meio das condições de contorno das ondas eletromagnéticas aplicadas a **EQ. 1**, as ondas incidentes e refratadas podem ser representadas, desconsiderando suas amplitudes, através das equações **EQ.2** e **EQ.3**, respectivamente.

$$e^{i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)} \quad \text{EQ. 2}$$

e

$$e^{i(\vec{k}'\vec{r} - \omega t)} \quad \text{EQ. 3}$$

Considerando que na interface entre os dois meios num instante t e posição O , as ondas incidentes e refratadas são coincidentes, é possível escrever:

$$e^{i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)} = e^{i(\vec{k}'\vec{r} - \omega t)} \quad \text{EQ. 4}$$

Para que a expressão da **EQ. 4** seja verdadeira, a única forma possível é que os argumentos das funções exponenciais sejam iguais, dessa forma:

$$\vec{k}\vec{r} - \omega t = \vec{k}'\vec{r} - \omega t \quad \text{EQ. 5}$$

$$\vec{k}\vec{r} = \vec{k}'\vec{r} \quad \text{EQ. 6}$$

A partir da **EQ. 6**, pode-se inferir que os vetores de onda \vec{k} e \vec{k}' são coplanares e que suas projeções na superfície são iguais, logo:

$$k \sin \theta_1 = k' \sin \theta_2 \quad \text{EQ. 7}$$

onde θ_1 e θ_2 são os ângulos de incidência e refração da luz respectivamente como pode ser observado na **Figura 1**. Por fim, utilizando a dependência do vetor de onda k e k' com o índice de refração:

$$k = n_1 \frac{\omega}{c} \quad \text{EQ. 8}$$

$$k' = n_2 \frac{\omega}{c} \quad \text{EQ. 9}$$

onde c é a velocidade da luz no vácuo e possui módulo igual a $c \cong 3 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$. Substituindo **EQ. 8** e **EQ. 9** em **EQ. 7**, é possível obter a relação:

$$n_1 \frac{\omega}{c} \sin \theta_1 = n_2 \frac{\omega}{c} \sin \theta_2 \quad \text{EQ. 10}$$

simplificando

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad \text{EQ. 11}$$

A **EQ. 11** é denominada Lei de Snell, a qual, é a lei que rege os processos de refração (HECHT, 1987). O índice de refração n também pode ser escrito em função da velocidade da luz no vácuo através da seguinte relação:

$$n = \frac{c}{v} \quad \text{EQ. 12}$$

onde, v é a velocidade na qual a luz se propaga em cada meio e é dado por:

$$v = \sqrt{\frac{1}{\mu\varepsilon}} \quad \text{EQ. 13}$$

sendo ε e μ , respectivamente, a permissividade elétrica e a permeabilidade magnética do meio e são essas constantes que caracterizam e diferenciam os meios em análise. Para o caso particular da velocidade da luz no vácuo, $\varepsilon \cong 8,8542 \cdot 10^{-12} C^2 N^{-1} m^{-1}$ e $\mu = 4\pi \cdot 10^{-7} T m A^{-1}$ (ZANGWILL, 2012).

2.1.1.3 PROPRIEDADES DE REFRAÇÃO EM MEIOS OPACOS

A maioria dos tecidos biológicos (meios opacos) são heterogêneos em sua composição, assim, para compreender o comportamento da luz ao se propagar neste meio torna-se necessário conhecer os índices de refração de cada componente presente na região de análise. Entretanto, essa não é uma tarefa fácil de ser realizada. Uma aproximação razoavelmente simples para contornar este problema é utilizar um índice de refração efetivo para o tecido como um todo, que muitas vezes pode ser simplificado utilizando a média ponderada em volume dos constituintes presentes na região de análise.

Nos tecidos, um dos componentes mais importantes de análise é a água, pois está presente na maior parte de sua constituição, seu índice de refração é bem conhecido, $n = 1.33$, e por este motivo suas propriedades ópticas são de grande importância já que em muitas ocasiões é utilizada como referência para os demais compostos. Seu índice de refração também indica o valor mínimo para fluidos e constituintes de tecidos moles presentes nesse meio (TSUCHIKAWA & TSUTSUMI, 1999).

2.1.2 ABSORÇÃO

Podemos considerar que um meio material é composto de um grande sistema de moléculas (ou átomos) com cargas discretas, que, ao interagirem com uma onda eletromagnética são forçadas a oscilarem com mesma frequência. Esse efeito ocorre somente

quando os fótons são absorvidos em energias específicas, fazendo com que um elétron de ligação da molécula seja excitado para um estado eletrônico, vibracional ou rotacional, superior ao estado inicial, amplificando sua vibração. Essa energia eventualmente será dissipada devido as colisões com outras moléculas, por isso, este processo em geral é utilizado na caracterização de materiais, através do coeficiente de absorção (BOHREN & HUFFMAN, 1998).

O fenômeno de absorção, ou atenuação, é um processo que envolve a absorção de energia proveniente de uma fonte de luz por um átomo ou molécula. Esse processo envolve um importante conceito da física quântica, os níveis de energia, onde há a transição de um estado de menor energia para um de maior energia necessitando da absorção de um fóton com energia dado por:

$$\Delta E = h\nu \quad \text{EQ. 14}$$

onde ΔE é a diferença de energia entre os estados de energia, h é a constante de Planck $6,62607004 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg/s}$ e ν é a frequência de emissão do fóton.

2.1.2.1 COEFICIENTE DE ABSORÇÃO [μ_a]

O coeficiente de absorção [μ_a] é definido como a probabilidade de absorção de um fóton por um determinado meio por unidade de comprimento. Depende de vários fatores, dentre eles, o meio absorvedor, frequência do feixe e do ângulo de incidência. É diretamente associado a secção de choque [σ_a], que representa a probabilidade de que haja uma interação entre um feixe de fótons e uma região.

Considerando uma partícula com uma localização bem definida, podemos definir uma secção de choque σ_a [cm^2] em função da potência da luz absorvida P_a [W] e da intensidade incidente I_0 [W/cm^2] na amostra de uma onda plana uniforme (VO-DINH, 2003):

$$\sigma_a = \frac{P_a}{I_0} \quad \text{EQ. 15}$$

Em um meio contendo vários absorvedores, podemos expressar o coeficiente de absorção μ_a [cm^{-1}] em função da secção de choque como:

$$\mu_a = \rho_a \sigma_a \quad \text{EQ. 16}$$

onde, ρ_a é densidade de núcleos absorvedores por volume de um determinado meio (cm^{-3}).

Como consequência direta da **EQ. 16**, podemos analisar a luz atenuada por meio de muitas partículas como se ela propagasse em único meio absorvedor de coeficiente de absorção total μ_a . O inverso do coeficiente de absorção é definido como livre caminho médio l_a (cm), que representa a distância média que um fóton percorre antes de ser absorvido.

$$l_a = \frac{1}{\mu_a} \quad \text{EQ. 17}$$

Por outro lado, quando a luz se propaga em um meio, e dessa forma é atenuada, deve obedecer a seguinte equação:

$$\frac{dI(\vec{r})}{dr} = -\mu_a I(\vec{r}) \quad \text{EQ. 18}$$

de modo que, $I(\vec{r})$ é a intensidade de luz emitida por uma fonte luminosa, e dI é a variação dessa intensidade ao se propagar por uma distância dr na amostra (VO-DINH, 2003).

Observa-se a partir da **EQ.18**, que uma porcentagem da luz é absorvida num intervalo $(r, r + dr)$ e a atenuação é proporcional ao coeficiente de absorção μ_a que depende do meio que se propaga a luz. Por fim, o sinal negativo na equação indica a redução da intensidade $I(\vec{r})$ em função do aumento da espessura r .

Integrando a expressão **EQ. 18**, encontramos assim a conhecida expressão de Lambert-Beer que representa a intensidade do feixe através de uma amostra:

$$I = I_0 e^{-\mu_a L} \quad \text{EQ. 19}$$

onde I_0 é a intensidade inicial e L a direção de incidência do feixe.

A **Figura 2** representa a atenuação da luz apresentada pela lei de Lambert-Beer.

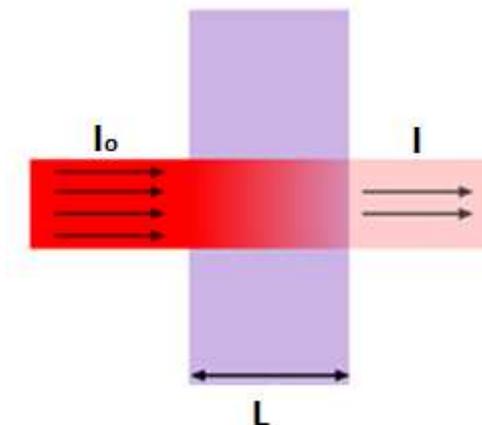


Figura 2: Representação da lei de Lambert-Beer. A propagação da luz através de um meio material, onde há atenuação pelo meio durante o processo de transmissão.

A partir da **EQ. 19**, podemos obter duas outras informações relevantes sobre a propagação da luz: a Transmitância e a Absorbância (ou Densidade Óptica). A transmitância $[T(r)]$ é definida como:

$$T(r) = \frac{I(r)}{I_0} \quad \text{EQ. 20}$$

A transmitância representa a probabilidade da luz incidente conseguir se propagar por toda a região sem ser absorvida pelo meio. Entretanto, a Absorbância (A) indica a atenuação dos fótons pelo meio, e por definição é dado por:

$$A = \log\left(\frac{I(r)}{I_0}\right) = -\log(T(r)) \quad \text{EQ. 21}$$

Uma vez que ocorra o processo de absorção, a energia dos fótons pode ser dissipada de duas formas, pela emissão de um fóton ou na forma de energia cinética, que geralmente ocorre na forma de calor (GREINER; REINHARDT, 1994).

2.1.2.2 PROPRIEDADES DE ABSORÇÃO EM MEIOS TURVOS

A absorção captada em meios turvos, como em *phantoms* compostos e tecidos biológicos, é função de sua composição molecular, onde, os principais absorvedores são água, melanina e hemoglobina, sendo este último, geralmente encontrada em duas formas, oxi-hemoglobina e desoxi-hemoglobina (VO-DINH, 2003). Podemos expressar também o coeficiente de absorção em meios turvos em função da concentração de componentes absorvedores:

$$\mu_a(\lambda) = \varepsilon(\lambda)c_i \quad \text{EQ. 22}$$

onde $\varepsilon(\lambda)$ é a absorção molar [cm^2/mol], que é a capacidade de 1 mol de alguma substância atenuar a luz em determinado comprimento de onda, e c_i é a concentração desse composto absorvedor no meio (mol/cm^3) (SKOOG, et al.; 2006).

Ao trabalhar em amostras com múltiplas fontes absorvedoras deve-se expressar o coeficiente de absorção levando em conta esses N absorvedores distintos, dessa forma μ_a é expressado como:

$$\mu_a = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i \quad \text{EQ. 23}$$

considerando que, cada absorvedor contribui linearmente com absorção total do meio.

O conjunto de moléculas que absorvem luz dentro da janela óptica, região onde se concentra os principais componentes absorvedores nos tecidos biológicos, nos comprimentos de onda da luz visível ou infravermelho próximo são chamados de cromóforos. Os diferentes tecidos biológicos possuem vários cromóforos, cada um com seu próprio espectro de absorção. A variação do coeficiente de absorção, em função do comprimento de onda, forma um espectro no qual é possível identificar esses exatos constituintes e suas respectivas concentrações (MATCHER, 1994).

A **Figura 3** apresenta o espectro de absorção dos principais cromóforos presente no tecido humano.

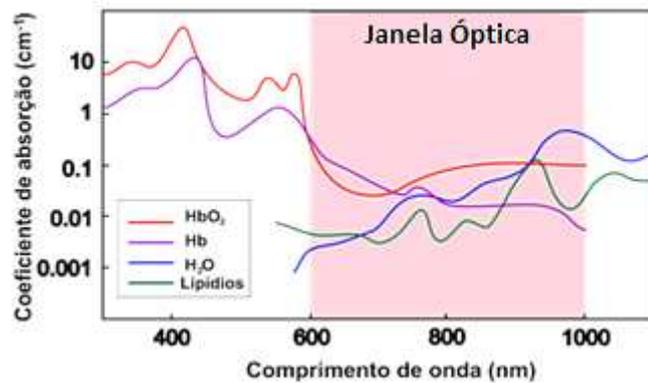


Figura 3: Espectro de absorção da janela óptica (ou janela terapêutica) dos principais cromóforos do tecido biológico animal como hemoglobina (Hb), Oxi-hemoglobina (HbO₂), água e lipídeos. (SOTO, 2016).

Adquirir informações sobre essa região é importante para conhecer parâmetros morfológicos e estruturais desses sistemas complexos, de forma a separar um componente em meio a vários outros (ISHIMARU, 1978).

2.1.3 ESPALHAMENTO DA LUZ

O espalhamento pode ser compreendido como uma distorção da frente de onda da luz devido a inhomogeneidade do índice de refração do meio incidente forçando a onda se propagar em diferentes sentidos. Macroscopicamente o espalhamento pode ser descrito pelo coeficiente de espalhamento [μ_s] que é a probabilidade de um fóton sofrer o evento de espalhamento após a interação com o meio incidente.

2.1.3.1 COEFICIENTE DE ESPALHAMENTO [μ_s]

De forma similar ao coeficiente de absorção [μ_a], a secção de choque de espalhamento pode ser definida em função da potência espalhada P_s e da onda incidente de intensidade I_0 dado por:

$$\sigma_s(\hat{\Omega}) = \frac{P_s}{I_0} \quad \text{EQ. 24}$$

onde $\hat{\Omega}$ é a direção de propagação da onda incidente relativa ao espalhador.

Em meios opacos existem muitas partículas espalhadoras de densidades $[\rho_s^i]$, dessa forma, podemos descrever o coeficiente de espalhamento em função da soma da secção de choque individual de cada componente $[\sigma_s^i]$ do meio dado de forma similar ao coeficiente de absorção:

$$\mu_s = \sum_{i=0}^m \rho_s^i \sigma_s^i \quad \text{EQ. 25}$$

Cada partícula associada ao sistema possui certa probabilidade de emitir um fóton em um angulo de espalhamento após a colisão, que é uma característica de um meio anisotrópico. Entretanto, a migração de fótons, está baseada no fato que o meio é isotrópico, do contrário o modelamento da equação de difusão falha. Deve-se então fazer uma correção em meios anisotrópicos para garantir a isotropia do sistema. Isto é possível usando o parâmetro de anisotropia g para obter uma nova propriedade óptica, chamada de coeficiente de espalhamento reduzido na forma:

$$\mu'_s = (1 - g)\mu_s \quad \text{EQ. 26}$$

De forma geral, podemos analisar a **EQ. 25** como o coeficiente de espalhamento médio de um meio espalhador sobre uma luz incidente ortogonalmente, enquanto a **EQ. 26** é a relação da aproximação para isotropia do sistema. Na **Figura 4** é apresentado a representação do evento de espalhamento.

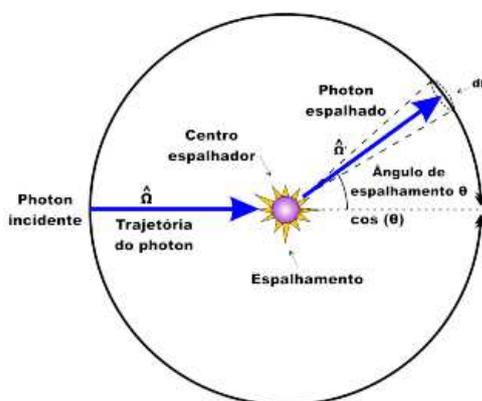


Figura 4: Representação do evento de espalhamento onde há mudança de direção do fóton incidente após a interação com o meio espalhador em um sistema sem perdas de energia (SOTO, 2016).

O parâmetro de anisotropia do sistema é uma grandeza geralmente obtida experimentalmente, mas também pode ser descrita como a média do cosseno do ângulo θ ou pela função de fase $P(\theta)$ obtida através da normalização do coeficiente de espalhamento diferencial:

$$g = \langle \cos(\theta) \rangle = \int P(\theta) \cos(\theta) d\hat{\Omega}' \quad \text{EQ. 27}$$

Em meios turvos o fator de anisotropia g tende a ter valores positivos. Para o caso onde $g = 0$ temos que $\mu'_s = \mu_s$ teremos o caso particular de um meio isotrópico (VO-DINH, 2003).

2.1.3.2 ESPALHAMENTO MIE

O espalhamento é uma interação dominante que afeta a propagação da luz em meios turvos. Geralmente é classificada em 3 categorias definidas pelo tamanho do meio espalhador em relação ao comprimento de luz da onda incidida: óptica geométrica, espalhamento Rayleigh e o regime Mie.

O espalhamento Rayleigh ocorre quando o objeto espalhador é muito menor que o comprimento de onda da luz, entretanto, para o sistema estudado neste trabalho o espalhamento Rayleigh possui pouca contribuição para o espalhamento total, que é consistido basicamente do regime Mie.

O regime Mie ocorre quando o meio espalhador é comparável ao comprimento de onda da luz incidente, com estruturas com tamanhos de centenas de nanômetros a alguns microns (500 nm à 1 μ m). A condição para aplicação desse regime de espalhamento é a aproximação dos meios espalhadores em pequenos centros esféricos, condição importante para futuras aplicações biomédicas, em especial para glóbulos vermelhos. Entretanto, caso os centros espalhadores não possam ser modelados com precisão em pequenas esferas, o modelo ainda consegue prever com alta precisão o espalhamento nestes meios (VO-DINH, 2003).

De acordo com a teoria Mie, o comportamento do espalhamento é regido por uma relação potencial em função do comprimento de onda da luz incidente na forma:

$$\mu_s = a\lambda^{-b} \quad \text{EQ. 28}$$

onde a é o pré-fator de espalhamento e b é a potência de espalhamento relacionada, grandezas diretamente ligadas a densidade, tamanho e índice de refração dos centros espalhadores (VAN STAVEREN, 1991; POGUE, 2004).

2.2 PROPAGAÇÃO DA LUZ EM MEIOS OPACOS

Foi apresentado nos itens anteriores as interações que ocorrem quando há incidência de uma luz sob um meio material, entretanto, nesta secção será abordado com mais detalhes sobre como é a propagação dos fótons nestes mesmos meios materiais. É discutido sobre as equações que regem esse sistema e seu formalismo, partindo de equações gerais como a equação de transferência radiativa, ou equação de Boltzmann, afim de obter algumas aproximações viáveis para análise de sistemas complexos como em meios turvos através da equação de difusão.

2.2.1 EQUAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA RADIATIVA (ETR)

Para compreender a propagação da luz em meios turvos devemos inicialmente analisar como é o processo de transporte dos fótons pelo mesmo. Essa descrição pode ser facilmente compreendida ao utilizar a equação de transferência radiativa (ETR), ou equação de Boltzmann, que é a base da teoria do transporte linear em meios turvos para o regime do infravermelho próximo (NIR). O princípio da ETR assume que as interações dos fótons como partículas num meio, desprezando os efeitos ondulatórios (ALERSTAM, 2011).

Considerando que haja apenas absorções e espalhamentos elásticos dos fótons no meio, é possível analisar o transporte de fótons num meio turvo a partir da conservação na energia desse sistema. Assumindo que não haja perda energética dos fótons para o meio, pode-se então escrever a ETR do transporte energético para um instante de tempo t qualquer como (DURDURAN, 1997; VENUGOPALAN, et al. 1998):

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} \frac{\partial \varphi(\vec{r}, \hat{\Omega}, t)}{\partial t} + \hat{\Omega} \cdot \nabla \varphi(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) + \mu_t(\vec{r}) \varphi(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) \\ = \mu_s(\vec{r}) \int P(\hat{\Omega} \cdot \hat{\Omega}') \varphi(\vec{r}, \hat{\Omega}', t) d\hat{\Omega}' + q(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) \end{aligned} \quad \text{EQ. 29}$$

onde $\varphi(\vec{r}, \hat{\Omega}, t)$ é o fluxo de fótons incidentes no volume do meio e chamado radiância [W/ms], μ_{tr} é o coeficiente de transporte e definido como $\mu_{tr} = \mu_a + \mu'_s$ [1/m], $P(\hat{\Omega} \cdot \hat{\Omega}')$ é a função de fase de espalhamento, que representa a probabilidade de um fóton incidente com ângulo $\hat{\Omega}$ seja espalhado em uma direção $\hat{\Omega}'$, $q(\vec{r}, \hat{\Omega}, t)$ representa o termo da fonte luminosa, e por fim, v é a velocidade da luz no meio [m/s].

Por se tratar de uma equação que utiliza uma grande quantidade de parâmetros, seu tratamento matemático a torna inviável para aplicação em meios onde existem muitas fontes absorvedoras e um número muito grande de interações, tornando-a um problema computacional complexo e, portanto, muito tempo de processamento para obter resultados funcionais.

2.2.2 APROXIMAÇÃO DE DIFUSÃO

Ao trabalhar no domínio da frequência espacial pode-se simplificar a equação de ETR (EQ.29) sendo possível encontrar duas soluções possíveis: uma com dependência temporal e outra com dependência espacial. As noções da migração de fótons temporalmente modulada em meios turvos atualmente estão bem estabelecidas (O'LEARY, 1992; FISHKIN, 1993; PATTERSON, 1989), entretanto, somente recentemente houve avanços para funções espacialmente moduladas.

Para este trabalho será considerado apenas as soluções espaciais da EQ.29, que é obtido através de aproximações utilizando transformada de Fourier. Como apresentado por Cuccia (2008), a solução independente do tempo para a ETR é dada por:

$$\nabla^2 \varphi(\vec{r}, \hat{\Omega}) - \mu_{eff}^2 \varphi(\vec{r}, \hat{\Omega}) = -3\mu_{tr} q \quad \text{EQ. 30}$$

onde $\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a \mu_{tr}}$.

Considerando uma geometria para um sistema semi-infinito, as condições iniciais para que a fonte de luz \mathbf{q} (**Figura 05**) incidente na amostra seja paralela ao eixo z , com propagação periódica ao longo dos eixos x e y , temos a seguinte relação para \mathbf{q} :

$$q = q_0(z)\cos(k_x x + \alpha)\cos(k_y y + \beta) \quad \text{EQ. 31}$$

onde f_x e f_y são as frequências espaciais em x e y , respectivamente, de modo que $f_x = k_x/2\pi$ e $f_y = k_y/2\pi$, por fim, α e β são fases de deslocamento da frente de onda.

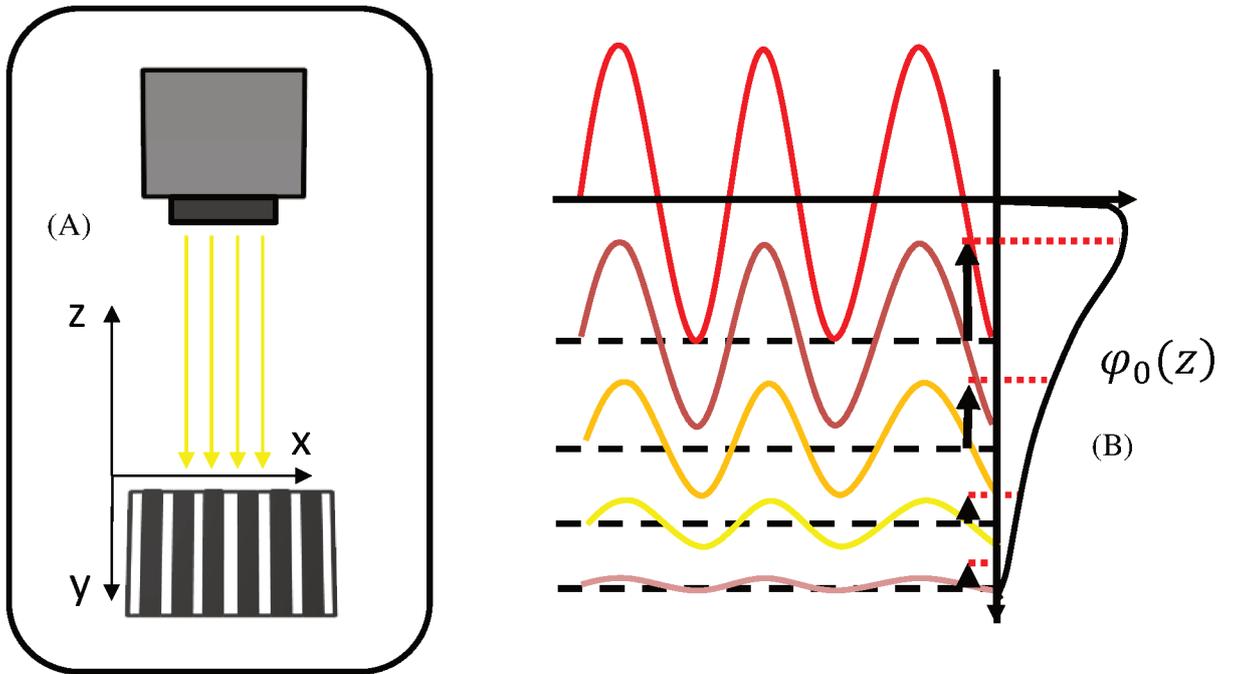


Figura 5: (A) Esquema das condições de contorno utilizados na aquisição dos parâmetros da fonte.
(B) Representação da penetração e atenuação da luz modulada em um meio material (CUCCIA, 2008).

Assumindo um meio linear de propagação, ou seja, com resposta proporcional a intensidade incidente, nota-se que esta fonte sinusoidal dará origem a uma taxa de fluência difusa φ com a mesma frequência e fase, desse modo, pode-se escrever uma solução para φ como:

$$\varphi = \varphi_0(z)\cos(k_x x + \alpha)\cos(k_y y + \beta) \quad \text{EQ. 32}$$

Substituindo a **EQ. 31** e **EQ. 32** em **EQ. 30** encontraremos uma relação para a fluência φ em função da penetração em z como uma equação de Helmholtz em 1 dimensão;

$$\frac{d^2\varphi_0(z)}{dz^2} - \mu'_{eff}{}^2\varphi_0(z) = -3\mu_{tr}q_0 \quad \text{EQ. 33}$$

e

$$\mu'_{eff} = \sqrt{\mu_{eff}^2 + k_x^2 + k_y^2} = \frac{1}{l'_{eff}} \quad \text{EQ. 34}$$

onde l'_{eff} é a penetração efetiva da luz sob a amostra em função das frequências espaciais.

Nota-se que na ausência da modulação espacial ($k_x = k_y = 0$), teremos então a relação onde $\mu'_{eff} = \mu_{eff}$, ou seja, esse sistema é equivalente a uma onda planar com uma iluminação constante. Entretanto, de forma geral, as propriedades ópticas de μ'_{eff} e l'_{eff} são dependentes da frequência espacial.

A **EQ. 33** representa uma simplificação do sistema de análise, partindo de um sistema com modulação espacial em x e y para uma propagação com coeficiente de atenuação escalar μ'_{eff} . Conceitualmente, esta equação representa uma fonte espacialmente distribuída, introduzida pelo espalhamento de um feixe colimado. Neste caso, como a **EQ. 33** é idêntica a equação de difusão para iluminação de uma onda planar pode-se utilizar a solução proposta por Svaasand et. al. (1999), substituindo apenas o coeficiente de atenuação μ_{eff} por μ'_{eff} .

$$q_0(z) = P_0\mu'_s e^{-\mu_{tr}z} \quad \text{EQ. 35}$$

P_0 é a potência luminosa incidida sobre a amostra.

Como apresentado por Cuccia (2008), utilizando todas as relações apresentadas acima, a solução para a **EQ. 33** é dada por:

$$\varphi_0 = \frac{3P_0 a'}{\frac{\mu'_{eff}}{\mu_{tr}} - 1} e^{-\mu_{tr} z} + C e^{-\mu'_{eff} z} \quad \text{EQ. 36}$$

onde C é uma constante a ser determinada e a' o albedo reduzido dado por:

$$a' = \frac{\mu'_s}{\mu_{tr}} \quad \text{EQ. 37}$$

A determinação da constante C é obtida através das condições pontuais propostas por HASKELL (1994), onde o fluxo de fótons J é definido devido sua proporcionalidade com a fluência na interface, quando $z = 0$.

$$J|_{z=0} \equiv \frac{-\nabla\varphi|_{z=0^+}}{3\mu_{tr}} = -A\varphi|_{z=0^+} \quad \text{EQ. 38}$$

Sendo

$$A = \frac{1-R_{eff}}{2(1+R_{eff})} \quad \text{e} \quad R_{eff} \approx 0.036n + 0.668 + \frac{0.710}{n} + \frac{1.440}{n^2} \quad \text{EQ. 39}$$

de modo que, A é uma constante de proporcionalidade e R_{eff} é o coeficiente de reflexão efetivo.

Substituindo **EQ.36** em **EQ.38**, pode-se determinar a relação para a constante C que é dada por:

$$C = \frac{-3P_0 a' (1 + 3A)}{\left(\frac{\mu'_{eff}}{\mu_{tr}} - 1\right) \left(\frac{\mu'_{eff}}{\mu_{tr}} + 3A\right)} \quad \text{EQ. 40}$$

Por fim, é possível determinar a reflexão difusa em função da frequência espacial $R_d(k)$,

$$R_d(k) = \frac{-j|_{z=0^+}}{P_0} = \frac{3Aa'}{\left(\frac{\mu'_{eff}}{\mu_{tr}} + 1\right) \left(\frac{\mu'_{eff}}{\mu_{tr}} + 3A\right)} \quad \text{EQ. 41}$$

2.2.3 IMAGEM NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA ESPACIAL (SFDI)

A técnica de imagem no domínio da frequência espacial (SFDI) baseia-se na espectroscopia por migração de fótons (CW) de múltiplas distâncias para estimar os coeficientes de espalhamento reduzido μ'_s e a absorção óptica μ_a (SAAGER et al., 2010; DOGNITZ et al., 1998). Assim, nesta técnica, padrões espaciais de luz CW são projetados na superfície do meio. A imagem resultante da refletância é capturada por meio de uma câmera externa sem contato para medir a função MTF.

O sinal detectado é ajustado por meio do modelo de propagação de luz em meio opaco apresentado anteriormente. A altas frequências, a aproximação da luz difusa cai e outros modelos como o método Monte Carlo deve ser usado (ZONIOS et al., 2011). Nas discussões seguintes serão considerados somente variação espacial ao longo do eixo x ($k = k_x$) e iluminação constante no eixo y ($k_y = 0$).

A amostra é iluminada por meio do padrão de luz modulado espacialmente, como pode ser observado a seguir:

$$I_{in} = \frac{I_0}{2} [1 + M_0 \cos(2\pi f_x x + \alpha)] \quad \text{EQ. 42}$$

onde I_0 , M_0 , f_x e α são a intensidade da fonte de iluminação, profundidade de modulação, frequência espacial e fase espacial, respectivamente.

Considerando que a iluminação deve ser dada pela superposição das reflectâncias espacialmente moduladas (AC) e planares (DC), a intensidade do padrão da refletância terá a forma:

$$I_{out} = I_{AC} + I_{DC} \quad \text{EQ. 43}$$

onde,

$$I_{AC} = M_{AC}(x) \cos(2\pi f_x x + \alpha) \quad \text{EQ. 44}$$

A amplitude da onda estacionária da densidade de fótons refletida será modificada por uma função envelope $M_{AC}(x)$ a dada frequência f_x . Além disso, várias curvas M_{AC} podem ser paralelamente montadas em cada linha de pixels usando uma câmera 2-D, permitindo amostragem espacial de milhões de valores de refletância simultaneamente.

Na prática, mede-se $M_{AC}(x)$ iluminando-se o meio na mesma frequência senoidal em diferentes *offsets* de fases (0° , 120° e 240°), então, a função envelope é extraída usando-se a equação em cada posição. Algebricamente a M_{AC} pode ser calculada para cada distribuição espacial x_i através da relação:

$$M_{AC}(x_i, f_x) = \frac{\sqrt{2}}{3} \sqrt{[I_1(x_i) - I_2(x_i)]^2 + [I_2(x_i) - I_3(x_i)]^2 + [I_3(x_i) - I_1(x_i)]^2} \quad \text{EQ. 45}$$

Sendo que, I_1 , I_2 e I_3 representa as I_{AC} para cada uma das diferenças de fases utilizadas. Esta operação é vantajosa pois remove quaisquer artefatos que são comuns a todas as três imagens, tais como, iluminação não uniforme, luz ambiente, ruídos.

A variação espacial não modulada (DC), $M_{DC}(x)$, pode ser facilmente calculada utilizando a condição $f_x = 0$, indicando que não há diferença de fase entre as intensidades de refletância. Desse modo $M_{DC}(x)$ pode ser escrito como:

$$M_{DC}(x_i) = \frac{1}{3} [I_1(x_i) + I_2(x_i) + I_3(x_i)] \quad \text{EQ. 46}$$

Outra forma de encontrar M_{AC} pode ser escrito como o produto da intensidade luminosa da fonte I_0 , da função de modulação do sistema MTF_{system} e pela reflexão “verdadeira” do meio do meio turvo R_d .

$$R_d(x_i, f_x) = \frac{M_{AC}(x_i, f_x)}{M_{AC,Ref}(x_i, f_x)} R_{d,Ref}(f_x) \quad \text{EQ. 47}$$

Para obter esses valores de μ_a e μ_s separadamente é gerado uma tabela de referência, a “lookup table” (**Figura 06**), no processamento da imagem.

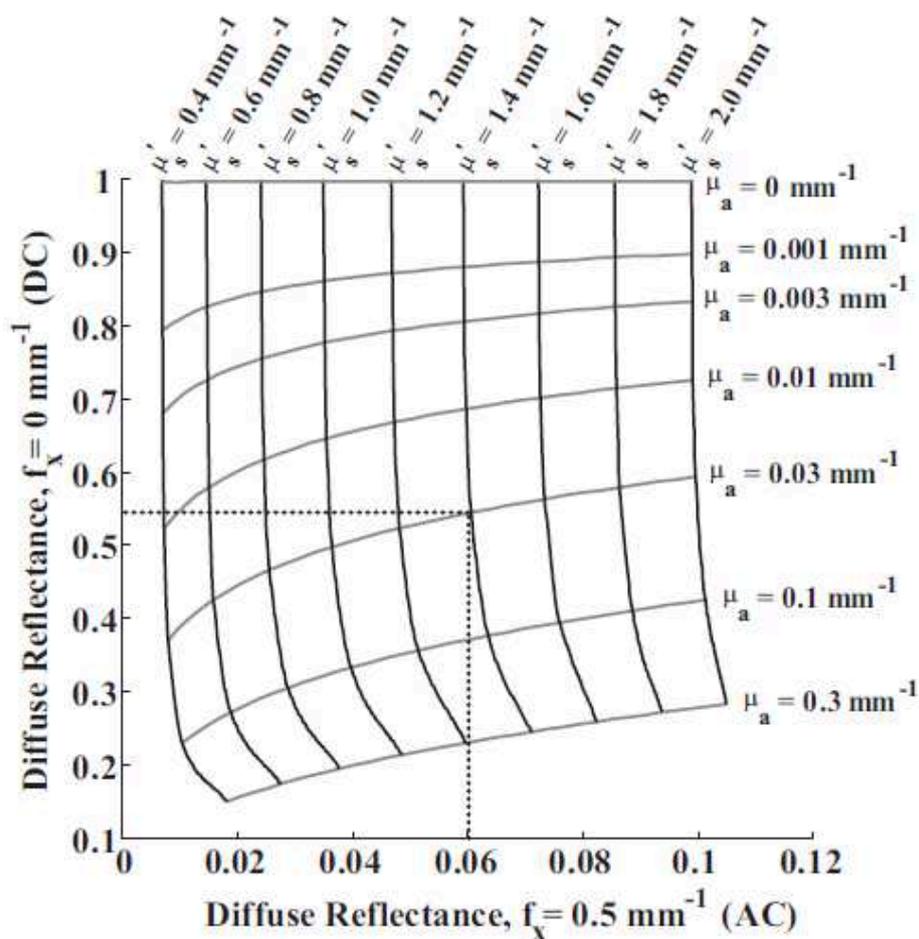


Figura 6: Tabela de referência de dois componentes da refletância (R_{AC} e R_{DC}) gerado através do modelo de difusão utilizado como exemplo (CUCCIA, 2009). Nota-se que para $R_{AC}(f_x=0.05) = 0.06$ e $R_{DC}(f_x=0.05) = 0.55$ obtemos então $\mu_a \approx 0.03$ e $\mu_s \approx 1.4$.

Para gerar a *tabela de referência* cria-se uma tabela de dados relativos da reflexão difusa modulada (R_{AC} , $f_x \neq 0$) e a não modulada (R_{DC} , $f_x = 0$) através de dados já coletados e presentes na biblioteca do programa. Além disso, utiliza-se a condição onde as escalas de cores cinza e preto correspondem a absorção constante e espalhamento reduzido, respectivamente.

Por fim, apresentamos na **Figura 07** uma simplificação esquemática da coleta dos dados através da técnica de SFDI.

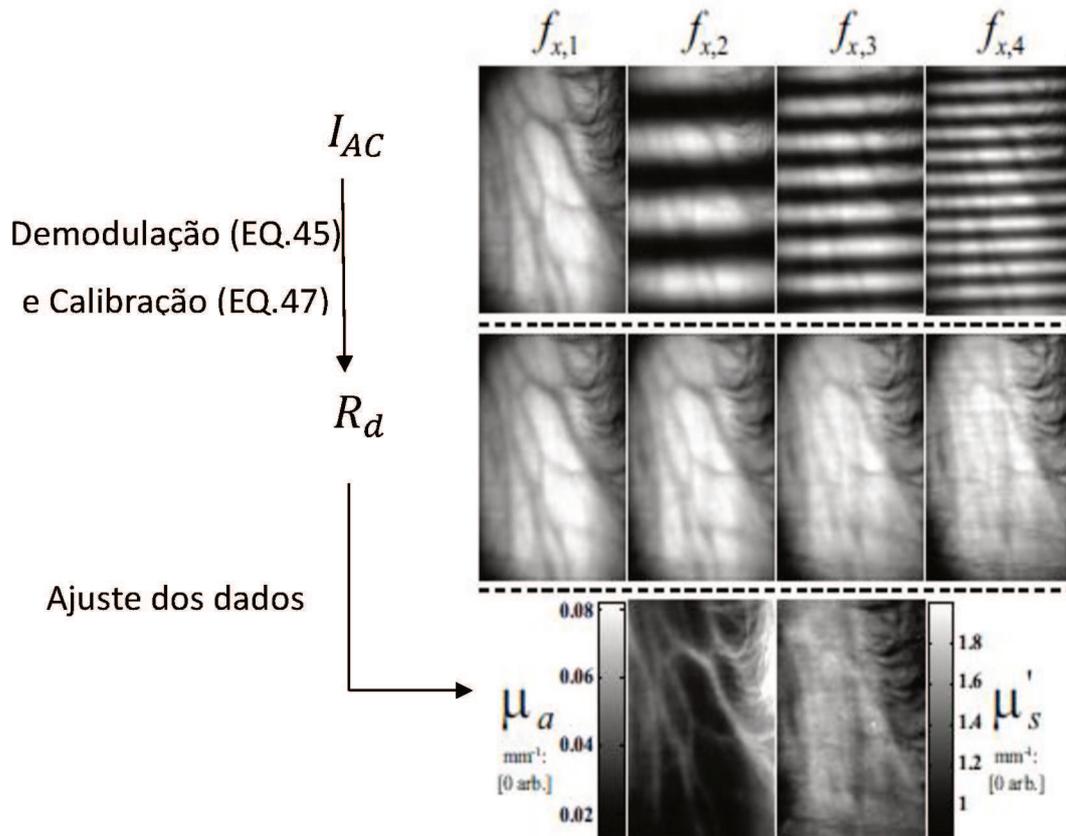


Figura 7: Representação das etapas de processamento de imagens através da técnica de SFDI *in vivo* (CUCCIA, 2009) (adaptado).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MONTAGEM EXPERIMENTAL

Nesta secção será discutido os detalhes experimentais desde a montagem experimental do equipamento de SFDI, preparação dos *phantoms* utilizados, até os detalhes de aquisição e processamento das imagens em LabView e MatLab.

3.1.1 EQUIPAMENTO DO SFDI

O equipamento da técnica de SFDI desenvolvido em nosso laboratório é composto de uma unidade de projeção por luz halógena que se acopla a uma guia de luz flexível para seleção de comprimento de onda usando um disco de filtro. O disco tem uma seleção de seis filtros de interferência passa-banda para transmissão nos picos em 500, 650, 680, 750, 780 e 810 nm.

Além do aparato de projeção da luz, o sistema SFDI possui o sistema de captura que é composto por uma câmera CCD que recebe a mesma projeção de imagem. Os dados experimentais foram adquiridos usando o projetor digital para iluminação, onde este utiliza padrões sinusoidais de várias frequências espaciais que são projetadas sobre a amostra de interesse e capturadas pela câmera CCD.

Na montagem do equipamento a primeira dificuldade encontrada foi devido a captação de uma reflexão especular na amostra restringindo a qualidade da imagem obtida. A solução encontrada para esta questão foi realizar uma pequena curvatura entre a câmera e o projetor. A seguir é mostrado uma representação da configuração do equipamento da técnica de SFDI utilizada para projeção oblíqua de padrões na frequência espacial.

O processo de reconhecimento da imagem da amostra é realizado através dos seguintes procedimentos apresentados na **Figura 8**: inicialmente o projetor (1) incide a luz na amostra (2), ao qual a luz é modulada e produz os padrões senoidais sobre a superfície da amostra (esses padrões serão trabalhados com mais detalhes nas secções a seguir). Posteriormente a luz espalhada passa pelo disco de filtros (3) que seleciona o comprimento de onda desejado, e por fim, a câmera (4) captura as imagens da amostra.

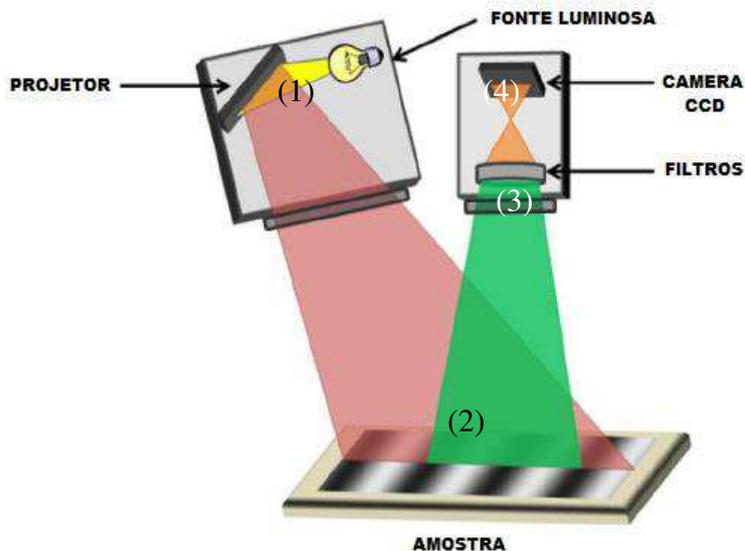


Figura 8: Representação esquemática do equipamento da técnica de SFDI (NADEAU, et al., 2003, adaptado). Em (1) está representado o projetor, (2) a amostra, (3) disco de filtros e (4) câmera de captura das imagens.

Para montar o projetor utilizado no equipamento, utilizamos toda a parte óptica e eletrônica de um aparelho da marca Vivitek características físicas são HDMI, 3D, 3.000 ANSI Lumens e Bivolt, com lâmpada de Tungstênio halogênio. Em seguida, o projetor foi anexado na base do SFDI. Posteriormente a câmera CCD e o disco de filtros também foram anexados. A montagem final pode ser observada na **Figura 9**.



Figura 9: (A) Projeto Vivitek; (B) Vista superior do projetor desmontado e acoplado a estrutura do equipamento e (C) Vista frontal com os componentes ópticos e eletrônicos fixados a placa superior e inferior do projetor do SFDI.

Pensando nas possibilidades futuras, houve a preocupação em montar o aparelho de SFDI em uma versão reduzida e compacta, de forma que num futuro próximo possamos também deslocá-lo e fazer medidas externas, como em hospitais ou clínicas. Para tanto, foi desenvolvido uma mesa apropriada contendo o suporte para fixação do aparelho, monitor, teclado, mouse e a montagem dos componentes de informática (HD, motherboard, fonte ATX, entre outros) na parte interna desta mesa (**Figura 10**)



Figura 10: (A) Vista frontal e (B) Vista lateral do projetor e da câmera do SFDI, por fim, é mostrado em (C) a capacidade de mobilidade do braço acoplado à aparelhagem, onde foi fixado a um braço mecânico dobrável, visto que pretende-se fazer imagens funcionais.

projetor (1) que projeta a luz e os padrões senoidais das frequências espaciais. Também está

presente nessa região o disco de filtros (2) que seleciona os comprimentos de onda adequados para a amostra em estudo e em (3) está localizada a câmera de captação das imagens. Por fim, na **Figura 11** temos uma visão geral do dispositivo pronto para aquisição de imagens.



Figura 11: (A) Vista frontal e (B) Vista da parte traseira (fechada) da mesa onde está fixado o aparelho de SFDI para obter imagens médicas. Em (C) temos a região traseira contendo a parte eletrônica do equipamento.

3.1.2 EQUIPAMENTO DA ESFÉRA INTEGRADORA

A técnica da esfera integradora é um método numérico que resolve a equação de transferência radiativa. Este método foi desenvolvido pelo Prof. S. Prahl para meios altamente espalhadores, em especial para tecidos biológicos (PRAHL, VANGEMERT, WELCH; 1993), onde é possível obter os valores de transmitância e absorvância através de parâmetros experimentais.

Neste trabalho, utilizaremos o método IAD (*Inverse adding-doubling*), para calcular os valores μ_a e μ_s a partir de valores de refletância e transmitância medidos pelo sistema (TARTARI, 2018). Especificamente, além dos valores de refletância e transmitância, outros valores devem ser fornecidos ao programa como espessura da amostra (d), o índice de refração da amostra (n) e demais características do aparato experimental: o diâmetro do laser, a refletividade da parede da esfera, os diâmetros das esferas (R e T) bem como o diâmetro das portas de entrada do laser, do detector e da amostra. Esses valores são salvos em um arquivo junto com as medidas de refletância (M_r), transmitância (M_t) e transmitância colimada (M_{tc}).

Em nosso laboratório, usamos um programa em Matlab, que foi baseado na equação geral para transferência radiativa de um estado estacionário em camadas paralelas ao plano.

A estrutura da esfera integradora é composta de uma câmara esférica oca com uma superfície interna altamente refletiva, na qual a superfície refletiva ajuda a distribuir a luz de forma homogênea dentro da esfera (LEMAILLET, BOUCHARD, ALLEN, 2015). Usamos uma esfera de integradora de 20 portas e quatro portas da Thorlabs, Inc.

Na **Figura 12 (A)** é apresentado a imagem do equipamento da esfera integradora utilizada neste trabalho. Uma visão esquemática do equipamento para determinar as propriedades ópticas dos *phantoms* é apresentado na **Figura 12 (B)** para os modos de transmitância e refletância.

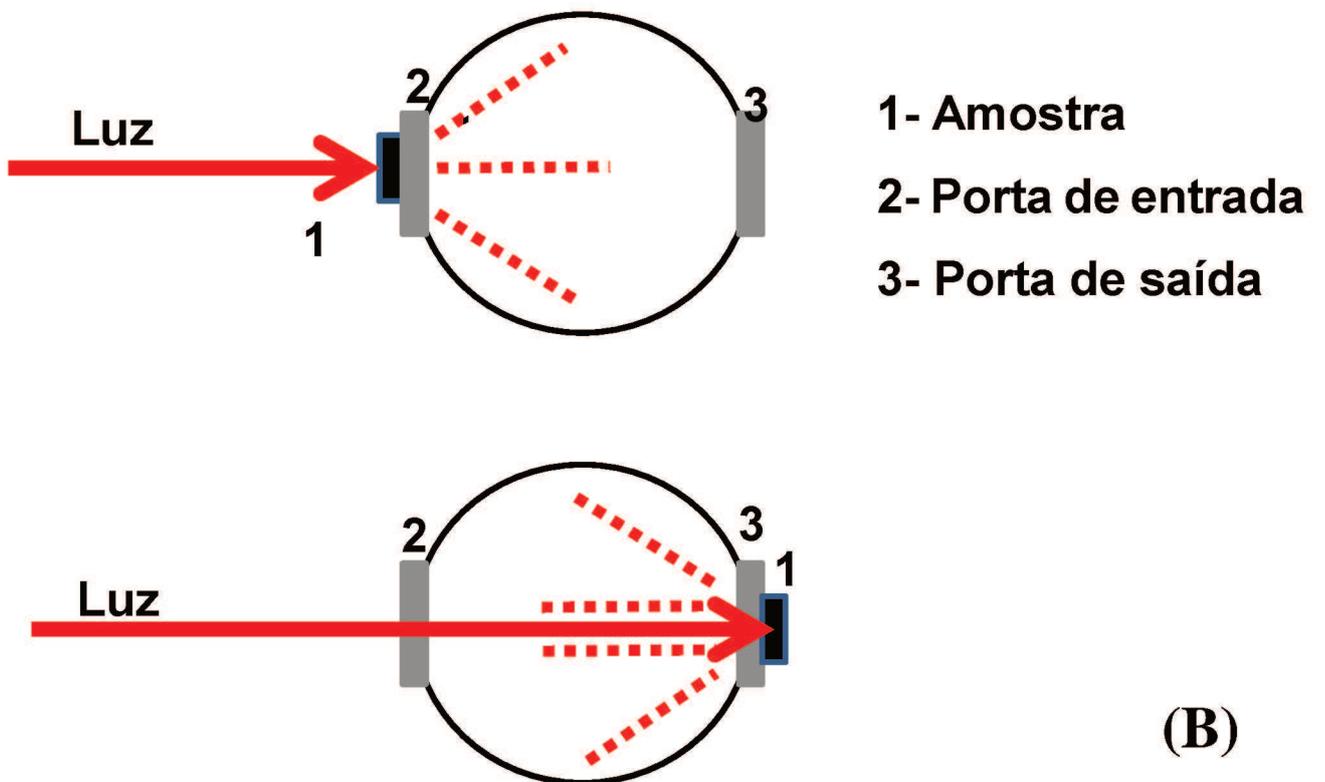
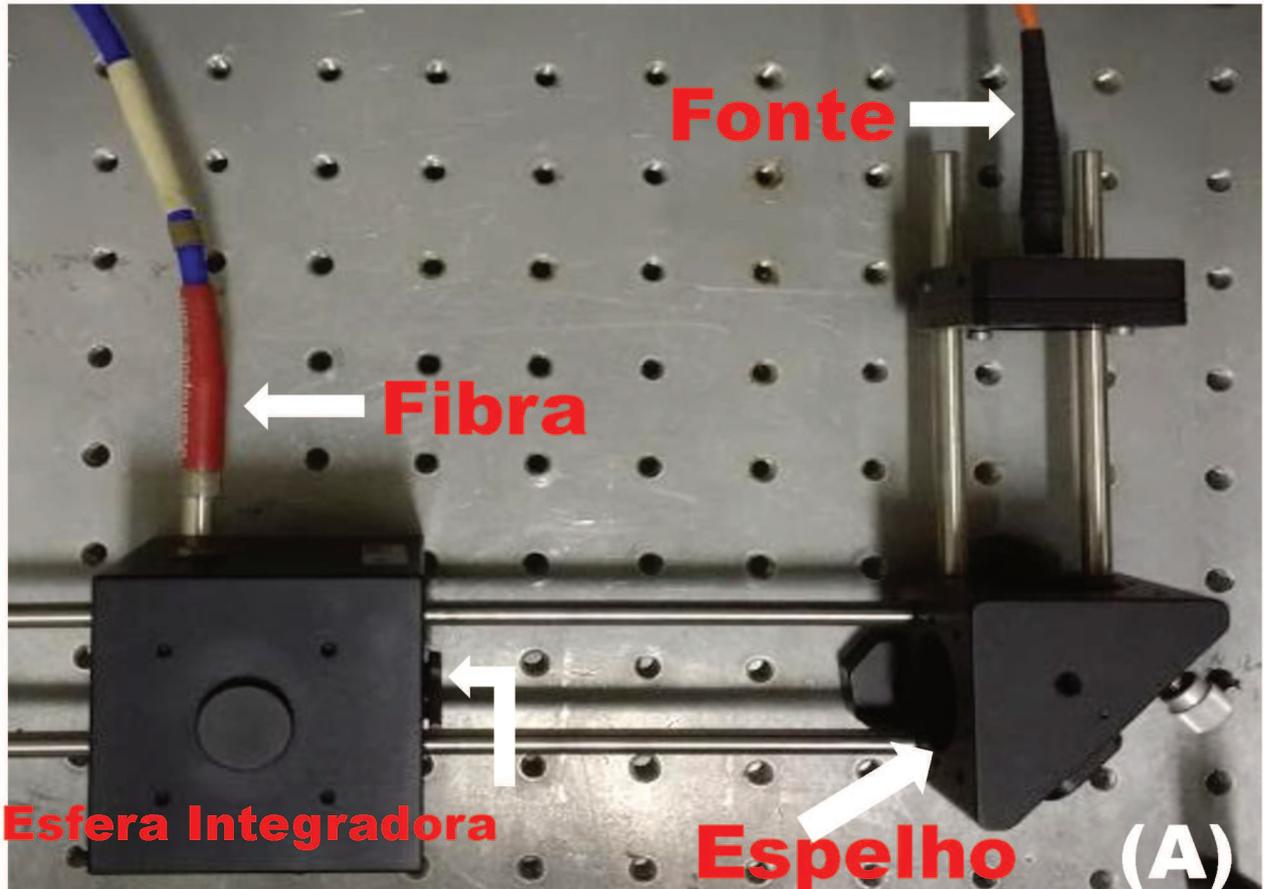


Figura 12: (A) imagem do equipamento de esfera integradora utilizada neste trabalho (B) representação esquemática do equipamento

3.1.3 PREPARAÇÃO DOS *PHANTOMS*

Como é citado por Pogue & Patterson (2006), todo o desenvolvimento de um sistema de diagnóstico por imagem ou até mesmo algumas intervenções terapêuticas requer o uso de certos materiais que simulam o tecido biológico. Esses materiais são empregados para garantir a segurança, desenvolvimento ou melhora de técnicas para tratamentos, principalmente de tumores, e são chamados *phantoms* (ou fantasmas). Suas funções estão associadas desde o desenvolvimento de um sistema de testes, otimização da relação sinal e ruído em sistemas já existentes, realização de uma rotina de controle em aparelhos de uso diário e comparação de performance entre dois sistemas (COHEN, 1979; OLSEN & SAGER, 1995), o que garante validade aos resultados obtidos e reduz as chances de danos a sistemas biológicos de teste.

As composições mais comuns desses materiais são hidrogel, água, gelatina, ágar, poliéster ou epóxi com resina de poliuretano, silicone ou álcool gel de polivinil. A escolha da matriz para o preparo dos *phantoms* varia de acordo com sua necessidade ou função, visto que, algumas matrizes são de uso permanente, possuem maior biocompatibilidade ou conseguem mimetizar de forma mais fidedigna determinado órgão ou tecido de interesse.

Neste trabalho, busca-se analisar os dados de espalhamento e absorção dos *phantoms* de simulação, por isso, sua matriz é a base de silicone, por ser um material permanente. A matriz de silicone possibilita uma rotina para calibração, e com suas propriedades muito bem definidas, garantindo uma maior credibilidade nos dados coletados através do aparelho de Imagem *SFDI*.

Os *phantoms* utilizados neste trabalho tentam simular de forma fidedigna as propriedades de absorção e espalhamentos de tecidos biológicos. Alguns deles podem ser comparados à um tecido biológico, caracterizado por ser um meio turvo, heterogêneo e complexo. Um *phantom* composto, mais de um composto na amostra, possibilita simular as propriedades ópticas dos tecidos biológicos, mimetizando suas propriedades de absorção e espalhamento.

Foram preparados em nosso laboratório *phantoms* para diversas finalidades, dentre elas, podemos citar duas principais funções neste trabalho: calibração do equipamento de *SFDI* e simulação de tecido biológico. Os *phantoms* de calibração são sintetizados a partir de compostos com propriedades ópticas bem definidas a partir de Polidimetilssiloxano, PDMS, como matriz e TiO_2 e corantes como meios espalhadores.

Será descrito a seguir o processo de produção dos *phantoms* utilizados neste trabalho. As substâncias utilizadas na composição dos *phantoms* são nanquim (PRO-4100, 183 Pro Art),

TiO₂ e PDMS, ambos da Sigma-Aldrich Inc. Detalhes da síntese e composição utilizada são descritos nas tabelas posteriores.

A produção dos *phantoms* de calibração se inicia misturando adequadamente as proporções dos reagentes, como é mostrado na **Tabela 1**:

Tabela 1: Concentração dos reagentes utilizados para a fabricação dos *phantoms* de calibração.

<i>Phantom</i>	01
TiO ₂	5 mg
PDMS	150 mL
Nankim	70 mL

Após a homogeneização das misturas, é adicionado o volume de 15 ml de ativador. Este componente é o que dá caráter enrijecido e forma fixa ao nosso *phantom*. A última etapa consiste na retirada de gases, principalmente O₂, da estrutura dos *phantoms* através de uma bomba de vácuo. O resultado final pode ser observado na **Figura 13**.



Figura 13: *Phantoms* de calibração do equipamento de *SFDI* contendo 5 mg de TiO₂, 150 ml de PDMS e 70 mg de nankim.

Por outro lado, a fabricação dos *phantoms* que simulam propriedades específicas é um pouco mais elaborada. Inicialmente preparou-se pequenos cubos com os compostos desejados e posteriormente foram anexados a uma nova massa de PDMS. O PDMS foi usado como matriz para produção dos pequenos cubos, inseriu-se posteriormente diferentes concentrações do meio absorvedor ZnPC (Sigma-Aldrich Inc).

Na preparação dos *phantoms* utilizou-se as concentrações apresentadas na **Tabela 2**. Para todos os *phantoms* fabricados nesta etapa, utilizou-se a quantidade fixa de 2,5 mg/mL de TiO₂ como meio espalhador e as concentrações de ZnPc apresentados na **tabela 2**. As amostras foram preparadas no formato de pequenas camadas de 1.00 mm de espessura.

Tabela 2: Concentração utilizada na fabricação das camadas utilizadas na fabricação do *phantom* composto.

<i>Phantom</i>	ZnPc (mg)	TiO ₂ (mg)
C1	55.00	2.50
C2	50.00	2.50
C3	45.00	2.50
C4	40.00	2.50
C5	35.00	2.50
C6	30.00	2.50
C7	25.00	2.50
C8	20.00	2.50
C9	15.00	2.50
C10	5.00	2.50

Após a produção das camadas de ZnPc nos *phantoms* foram acopladas ao substrato de PDMS de diferentes concentrações de meios absorvedores. O *phantom* elaborado pode ser observado na **Figura 14**.

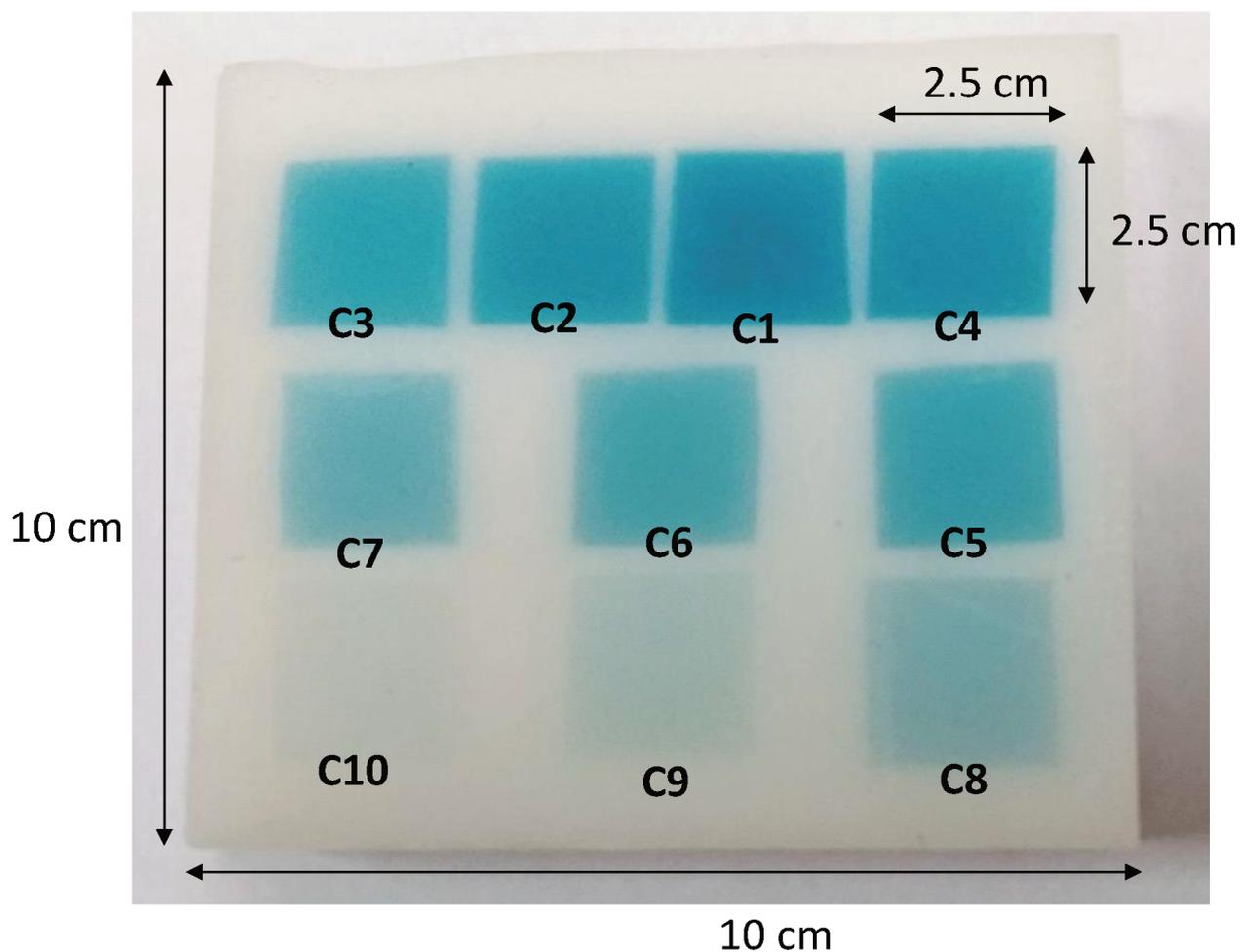


Figura 14: *Phantoms* de simulação preparados em nosso laboratório, utilizando ftalocianina de zinco como meio absorvedor.

Para manter a regularidade nas medidas, foi proposto um formato cúbico utilizando um molde acrílico de 10.00 cm em cada lado como padrão para todos os *phantoms* e para as camadas de ZnPc o formato retangular com 2.5 cm de lado, e preparados a temperatura ambiente.

A escolha da ZnPc como meio absorvedor é devido as bandas de absorção estarem dentro da janela óptica, região onde se encontram os principais cromóforos de aplicação médica, sendo de grande interesse para simulações ópticas de tecido biológico (MONTE, REIS, CRUZ JUNIOR, ANTUNES; 2018).

3.2 AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DAS IMAGENS PELO *SFDI*

A interação da parte eletrônica com o computador foi desenvolvida em linguagem LabView, que é um software de instrumentação virtual desenvolvido pela National Instruments (NI). A instrumentação virtual é um recurso com objetivo de simular instrumentos físicos como amperímetros, voltmímetros, osciloscópios entre outros. Cada uma das funções dos instrumentos virtuais manipula os dados que recebe à entrada, em função da sua aplicação/programação, apresentando o resultado da operação na sua saída. Cada instrumento virtual possui três componentes básicos, o painel principal, o diagrama de blocos e um ícone (ou conector).

No painel frontal, cujo objetivo é a interação entre o usuário e o equipamento, possui a tela da câmera CCD, botões de aumento e redução da intensidade da luz na amostra (Master gain e Blacklevel Offset), botão para correção automático da luminosidade (Auto Shutter), botões de frequências e comprimentos de onda. O *script* de informações pré-programados interage com a câmera e grava a projeção *SFDI* apropriada. É importante ressaltar que foram utilizados cinco comprimentos de onda e cinco frequências espaciais diferentes, sendo que a técnica de imagem necessita de pelo menos dois comprimentos de onda para obter uma imagem.

Na **Figura 15** é apresentado uma imagem da interface do painel de controle em LabView que faz a interação do equipamento de *SFDI* para a aquisição das imagens.

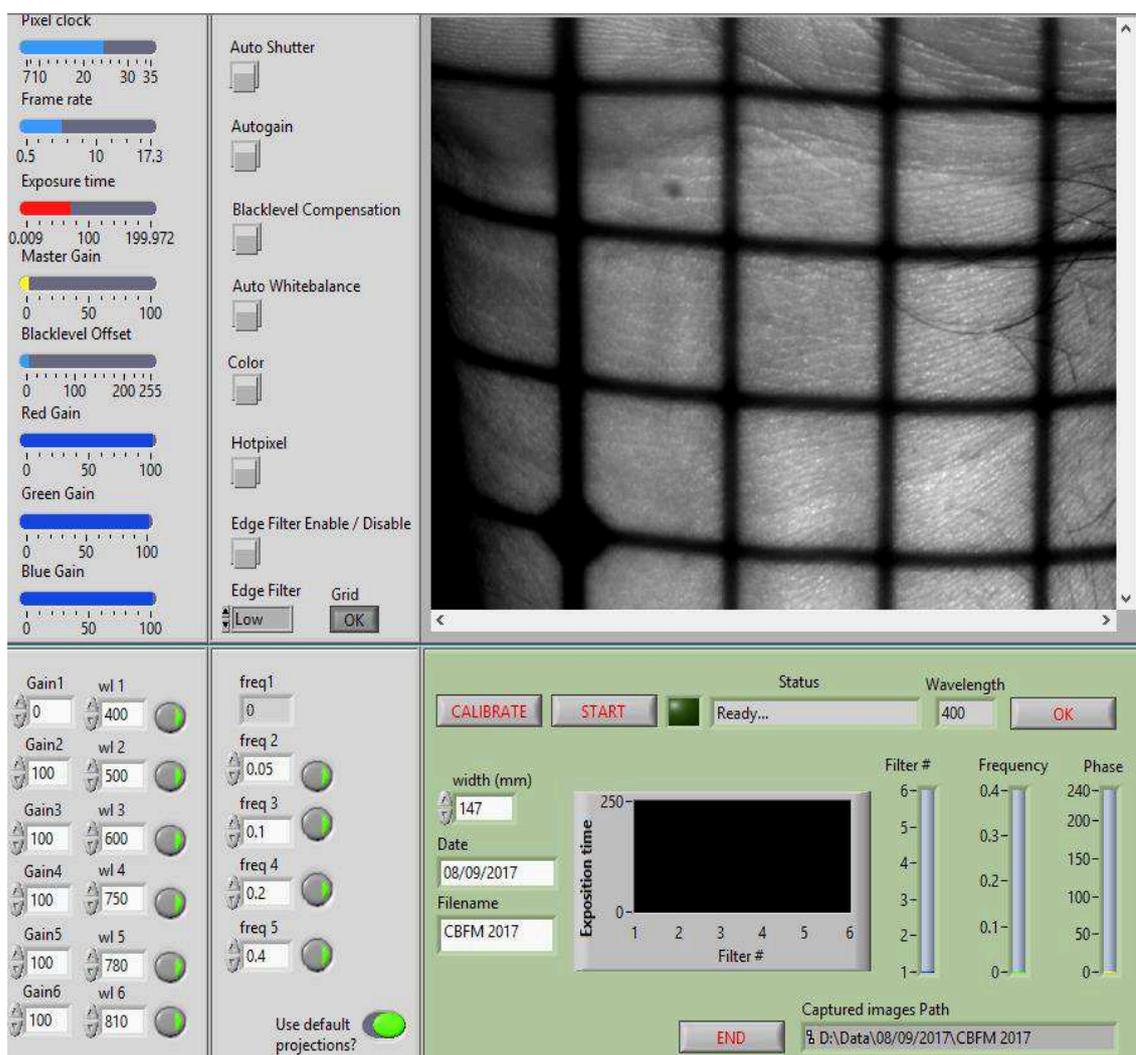


Figura 15: Painel frontal da interface em LabView do programa que colhe as imagens a serem trabalhadas

Devido a modulação sinusoidal em frequências espaciais de $0 \text{ mm}^{-1} \leq f \leq 0,4 \text{ mm}^{-1}$, são criadas cinco pastas de dados, sendo que, cada uma corresponde as frequências espaciais 0, 50, 100, 200 e 400 m^{-1} . Cada pasta contém 18 imagens que são divididas em seis comprimentos de onda (devido o disco de filtros) e 3 fases (0,120 e 240). Assim no total o programa consegue obter para uma única amostra o total de 90 imagens, como pode ser observado nas **Figuras 16** e **17**.

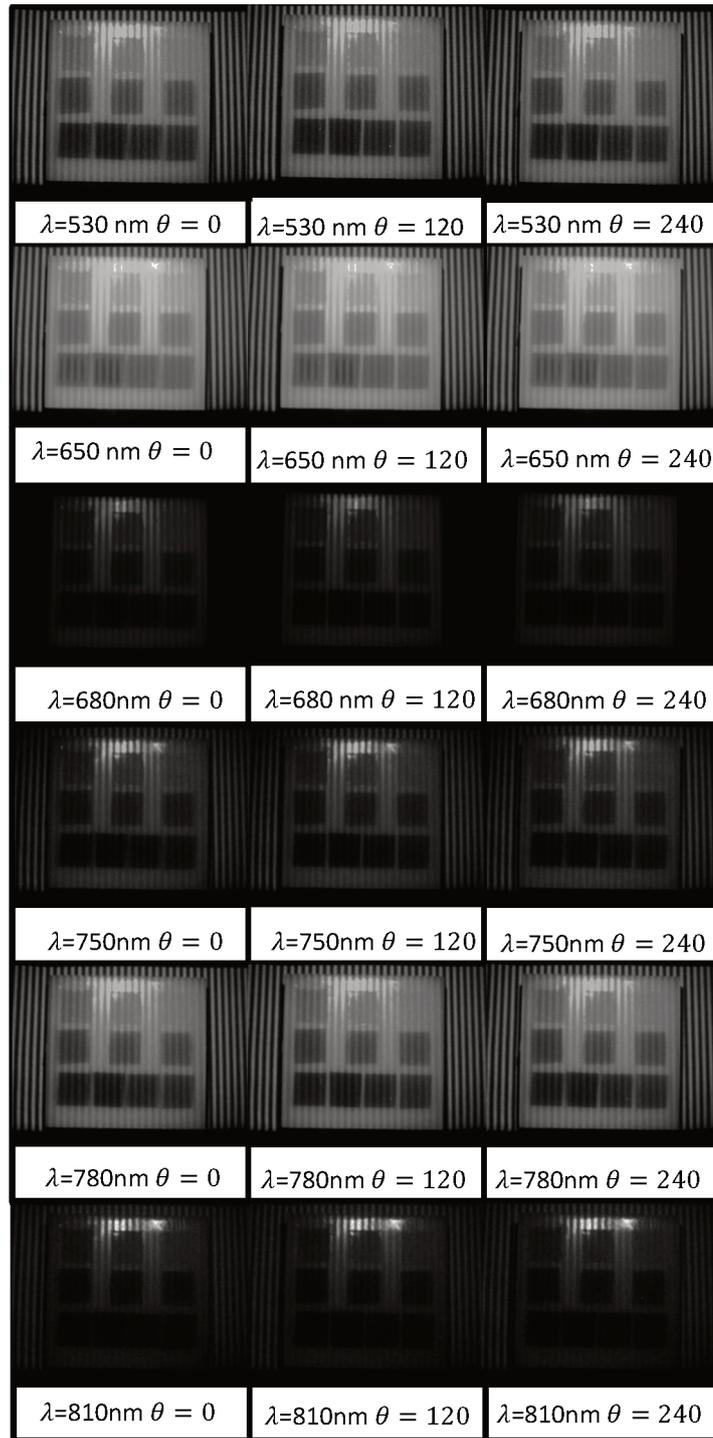
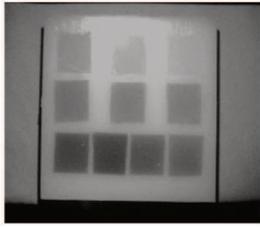
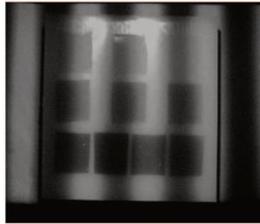


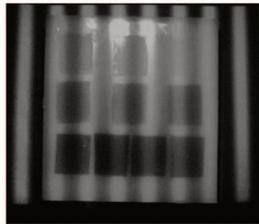
Figura 16: Imagens obtidas a partir do programa em LabView do *SFDI*, representando as fases $\theta = 0, 120, 240$ graus e na frequência espacial fixa em 400 m^{-1} em *phantom* de Ftalocianina.



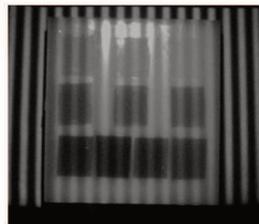
$$\lambda = 780nm; \theta = 0; f_x = 0$$



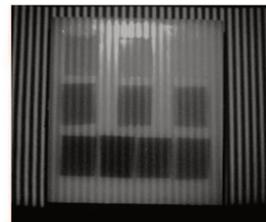
$$\lambda = 780nm; \theta = 0; f_x = 50 m^{-1}$$



$$\lambda = 780nm; \theta = 0; f_x = 100 m^{-1}$$



$$\lambda = 780nm; \theta = 0; f_x = 200 m^{-1}$$



$$\lambda = 780nm; \theta = 0; f_x = 400 m^{-1}$$

Figura 17: Imagens representando diferentes frequências espaciais f_x , mantendo como referência o comprimento de onda $\lambda=780$ nm e a fase $\theta=0^\circ$.

Para a conversão das imagens e processamento dos resultados, utiliza-se o software MATLAB que compacta as imagens de reflexão como se fosse um bloco único, onde é possível analisar aspectos referentes as características físicas da amostra. A análise da luz espalhada no objeto de estudo pode revelar informações sobre a estrutura do material sem a necessidade de ser um método invasivo. As informações processadas a partir das imagens obtidas em LabView fornecem das amostras investigadas: o coeficiente de absorção (μ_a) e espalhamento (μ_s).

O processamento das imagens utiliza o código apresentado no **Anexo I** deste trabalho. A primeira etapa consiste em converter o formato de imagem obtido pelo equipamento de *SFDI* em dados através do código mostrado em **a) convert_HC1_data.m**, como resultado desta etapa é criado um arquivo contendo as informações das imagens em forma de dados. A segunda etapa consiste em converter essas informações um mapa de cores utilizando o item **b) test_script_for_HC1.m**, onde é possível selecionar áreas específicas para análise e por fim obter os parâmetros de absorção e espalhamento da amostra.

De forma simplificada, o MatLab compacta todas as imagens obtidas pelo programa em LabView para um único bloco de dados, o qual, posteriormente é remodelado em um único mapa de cores onde é possível obter separadamente os dados de absorção e espalhamento da amostra. Na última etapa do processamento é possível escolher regiões de interesse, onde é selecionado áreas de análise específicas a qual determina a informação de absorção e espalhamento médio daquela região.

3.3 REFERÊNCIA: ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO ZnPc

A primeira medida realizada foi utilizando a esfera integradora. Como citado, este equipamento possui alta precisão na aquisição dos parâmetros de absorção e espalhamento de uma amostra, entretanto, possui certas limitações, tais como: o tamanho da amostra, opacidade, informações pontuais, entre outros.

A técnica da Esfera integradora foi utilizada por razões de comparação com os resultados obtidos pela técnica de *SFDI*, visto que, ZnPc em um meio contendo PDMS altera o espectro de absorção e espalhamento presente na amostra. Os espectros de absorção e espalhamento são apresentados separadamente na **Figura 18**.

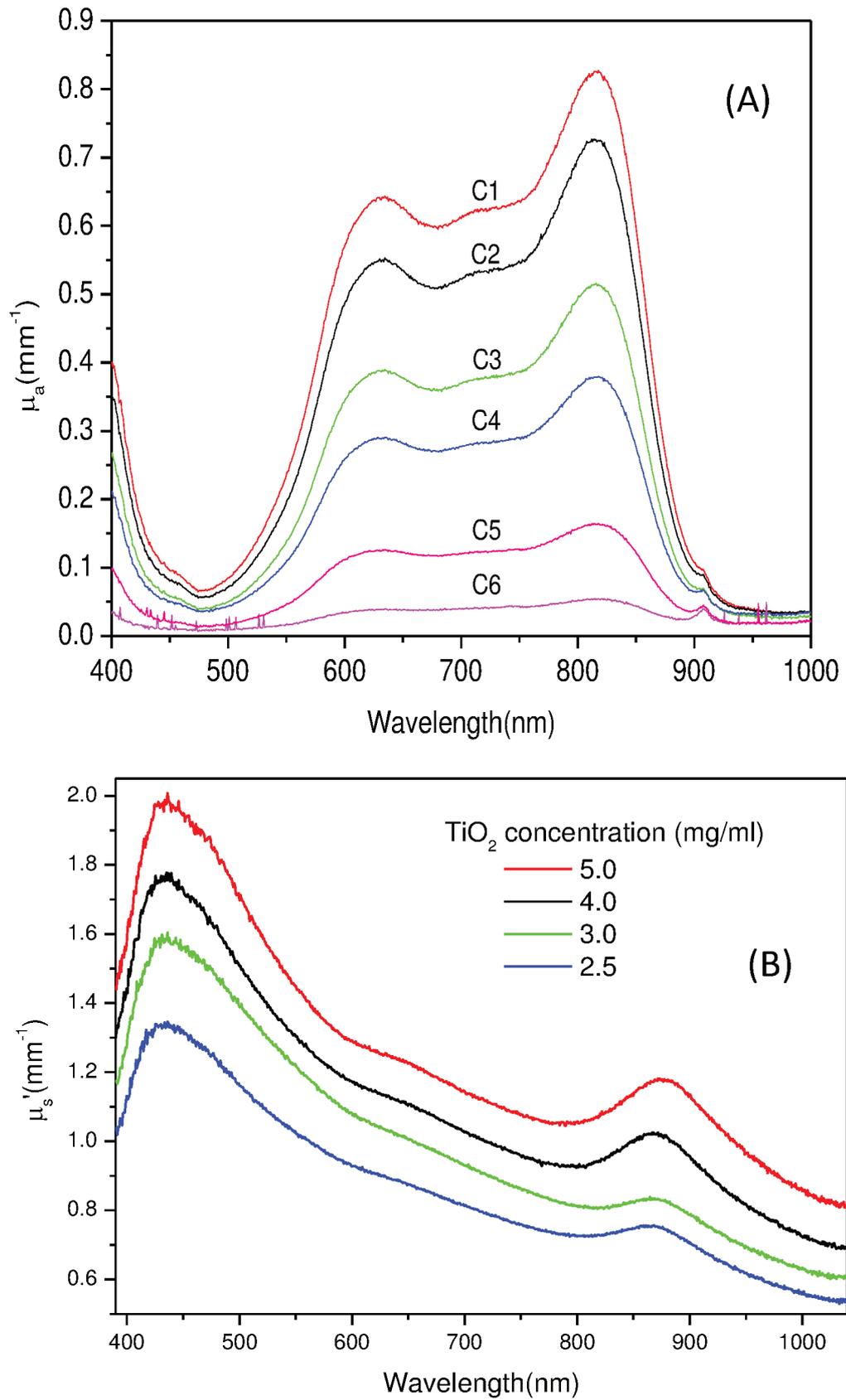


Figura 18: Espectros de absorção (A) e espalhamento (B) do *phantom* ZnPc em função do comprimento de onda em todas as concentrações presentes no *phantom*.

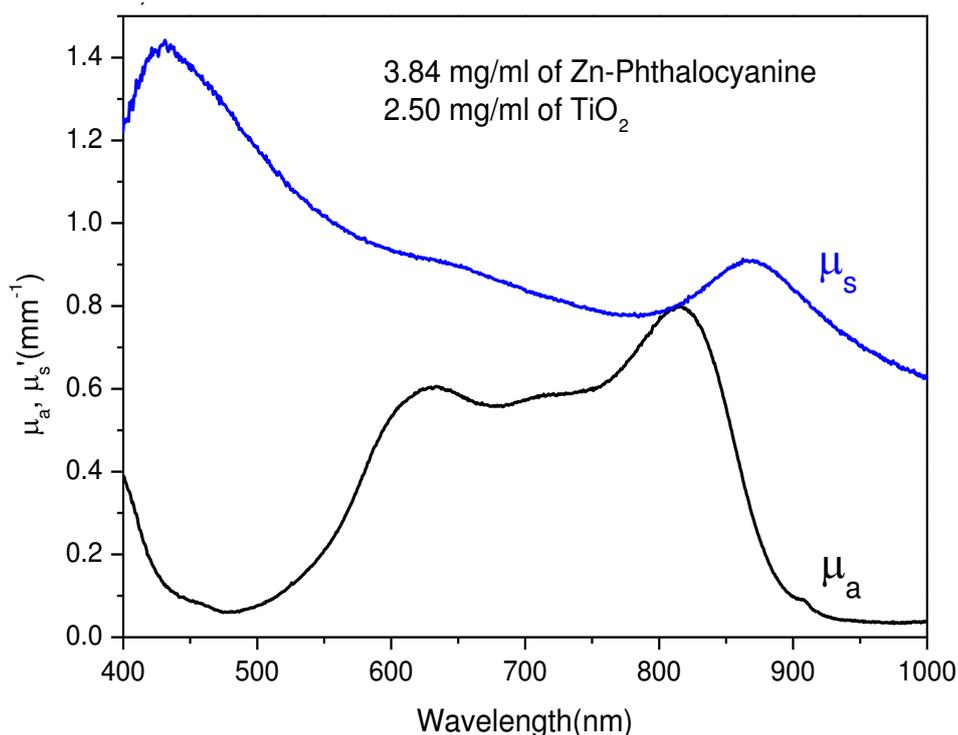


Figura 19: Espectro comparativo de absorção e espalhamento da ZnPc contendo 3.84 mg/mL de ZnPc e 2.5 mg/mL de TiO₂ (amostra C2) à 300 K, usando uma esfera integradora.

Os espectros de absorção ($\mu_a \times \lambda$) e espalhamento ($\mu'_s \times \lambda$) do *phantom* contendo diversas concentrações de ZnPc foram medidas no range espectral de 400 à 1000 nm. Os espectros de absorção mostrados apresentam duas bandas de absorção no intervalo de 550 e 830 nm, e outro de menor absorção em 460 nm. Estes picos são correlacionados a presença da ftalocianina de zinco (NYK et al., 2010). Ao observar a absorção na **Figura 19**, nota-se que em 910 nm ocorre um pequeno pico, facilmente observado em menores concentrações, que é consistente com a absorção do substrato do PDMS (AYERS, 2008).

Nota-se que o coeficiente de absorção se intensifica com o aumento da concentração da ZnPc, apresentando uma mudança relativamente pequena no espectro confirmando uma boa dispersão das partículas de ZnPc no substrato. Por outro lado, a visualização de alguma variação nos gráficos nos permite uma predição razoável das características do *phantom* em função de sua concentração.

3.4 IMAGEM DE MAPEAMENTO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *SFDI*

Nesta secção será discutido os resultados obtidos através da técnica de *SFDI*, onde será abordado nos tópicos adjacentes: imagens de mapeamento da reflexão difusa em *phantom*, a curva de ajuste para absorção, espalhamento e reflexão difusa em função da frequência espacial e posteriormente possíveis aplicações médicas.

Através do processamento das imagens utilizado o software MatLab é possível visualizar um mapa de cores criado a partir da aquisição das propriedades de reflexão difusa da amostra. Esse mapeamento é distribuído de acordo com o comprimento de onda dos filtros utilizados na aquisição das imagens, que são 532, 650, 680, 750, 780, 810 nm. A escolha dos filtros foi realizada de acordo com os picos de absorção dos cromóforos de interesse.

Foram realizadas diversas imagens, inicialmente utilizando *phantom* de ftalocianina de zinco para garantir a eficiência e acurácia dos dados encontrados e posteriormente utilizado em tecido biológico.

3.4.1 ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO: FTALOCIANINA DE ZINCO

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos através da técnica de *SFDI*. A grande vantagem da técnica é a possibilidade de obter essas características ópticas sem a necessidade de retirar uma pequena amostra do objeto de estudo, conseqüentemente, danificando a mesma. Com esta técnica foi possível quantificar as propriedades ópticas de uma amostra desconhecida, baseando-se em um *phantom* de referência com as propriedades previamente calibradas.

Através do *SFDI* também foi possível variar a frequência espacial f_x , o que é uma ferramenta potencialmente útil para comparar *phantoms* ou tecidos não-homogêneos, como a pele por exemplo.

Para a aquisição do valor de absorção ou espalhamento foi utilizado a equação de difusão para adquirir os dados experimentais da região de análise. Os parâmetros de aquisição da iluminação I_{IN} e I_{OUT} foram fornecidos à biblioteca do MATLAB através dos dados do equipamento.

A partir dos comprimentos de onda selecionados pelos filtros utilizados obtivemos o mapeamento dos cromóforos do *phantom* de ftalocianina de zinco. A **Figura 20** apresenta a expressão desse mapeamento em função dos comprimentos de onda.

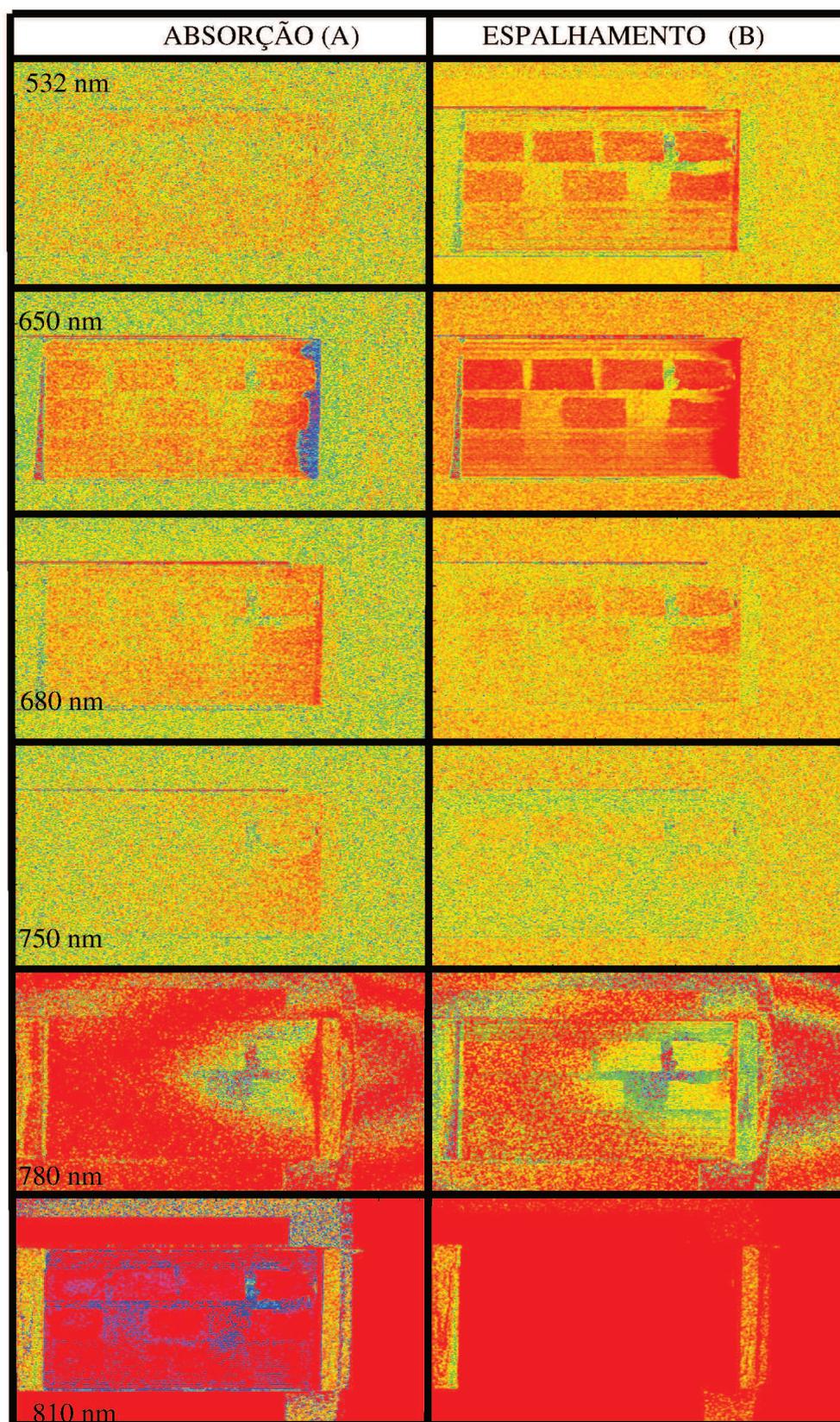


Figura 20: Mapeamento comparativo da absorção (A) e espalhamento (B) (apresentado nas colunas) da ftalocianina de zinco nos seguintes comprimentos de onda (apresentado ao lado da figura correspondente).

O mapeamento apresentado na **Figura 19** pode ser diretamente comparado aos resultados adquiridos pela técnica de esfera integradora. Para a absorção (A), notamos que a absorção em 532 é relativamente baixa comparada aos outros comprimentos de onda, neste quesito, o mapeamento apresenta um baixo nível de contraste entre as regiões que apresentam PDMS ou ZnPc. Este resultado está de acordo com o apresentado pelo gráfico de absorção da esfera integradora (**Figura 18**), visto que, se há pouca absorção nessa região, haverá então pouco contraste entre os componentes absorvedores.

Para comprimentos de onda onde a absorção é relativamente alta, como em 650 e 680 nm, nota-se claramente a presença da ZnPC, em específico, o comprimento de onda em 680 nm, apresenta a melhor imagem de absorção.

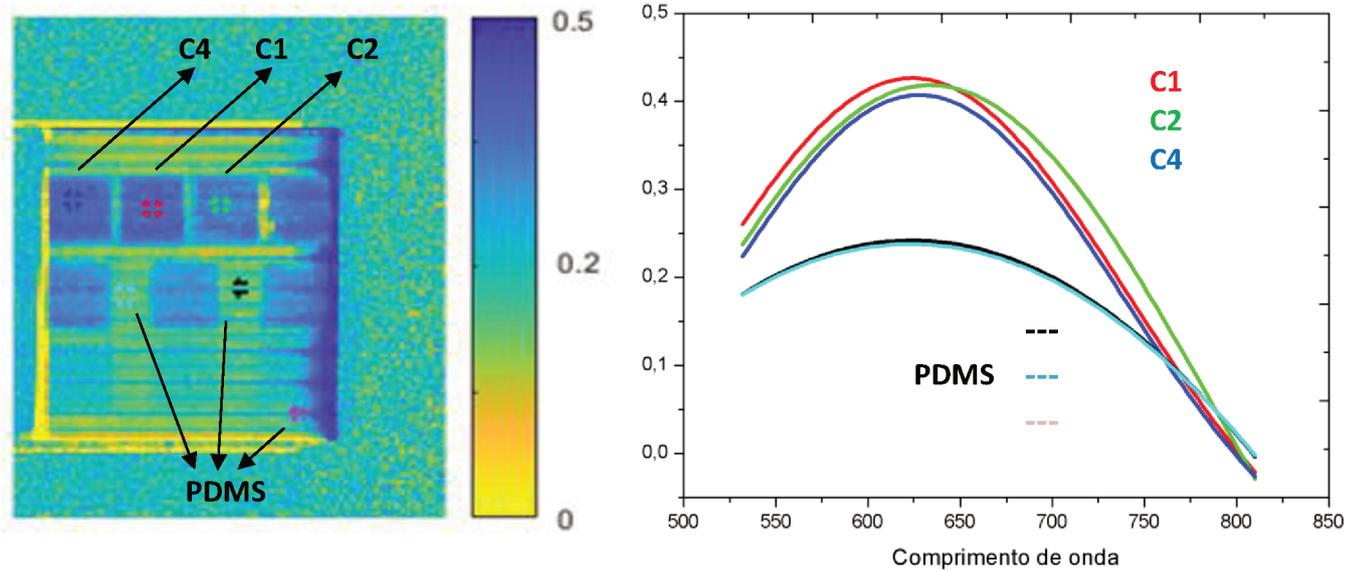
Entretanto, a partir de 750 nm as imagens obtidas reduziram drasticamente sua qualidade. Este fato ocorre devido o comprimento de onda limitante do projetor utilizado, visto que, por ser um projetor RGB (Red, Green, Blue) ele possui um espectro de emissão limitante ao vermelho (700 nm aproximadamente), ou seja, imagens adquiridas em comprimentos de onda superiores terão um mapeamento ineficiente, como pode ser visto pelas imagens apresentadas.

Os espalhamentos apresentados na **Figura 20 (B)** para o mapeamento do *phantom* demonstram relações semelhantes aos de absorção. Em 532, 650 e 680 nm obtemos um forte contraste entre a ZnPc e a matriz de PDMS do *phantom*, tornando possível uma clara visualização das regiões onde está presente o meio espalhador, havendo o melhor contraste em 650 nm. Para os comprimentos de onda a partir de 750 nm infelizmente apresentam um mapeamento duvidoso devido os mesmos fatores explicados para a absorção.

No **ANEXO II** as imagens presentes na **Figura 20** podem ser observadas separadamente e com maior riqueza de detalhes.

Posteriormente a aquisição das imagens de mapeamento, foi gerado o ajuste experimental de absorção e espalhamento apresentado na **Figura 21**. Desse modo, na **Figura 21** são apresentados as medidas quantitativas do coeficiente de absorção e espalhamento das imagens apresentadas na **Figura 20**.

Absorção (A)



Espalhamento (B)

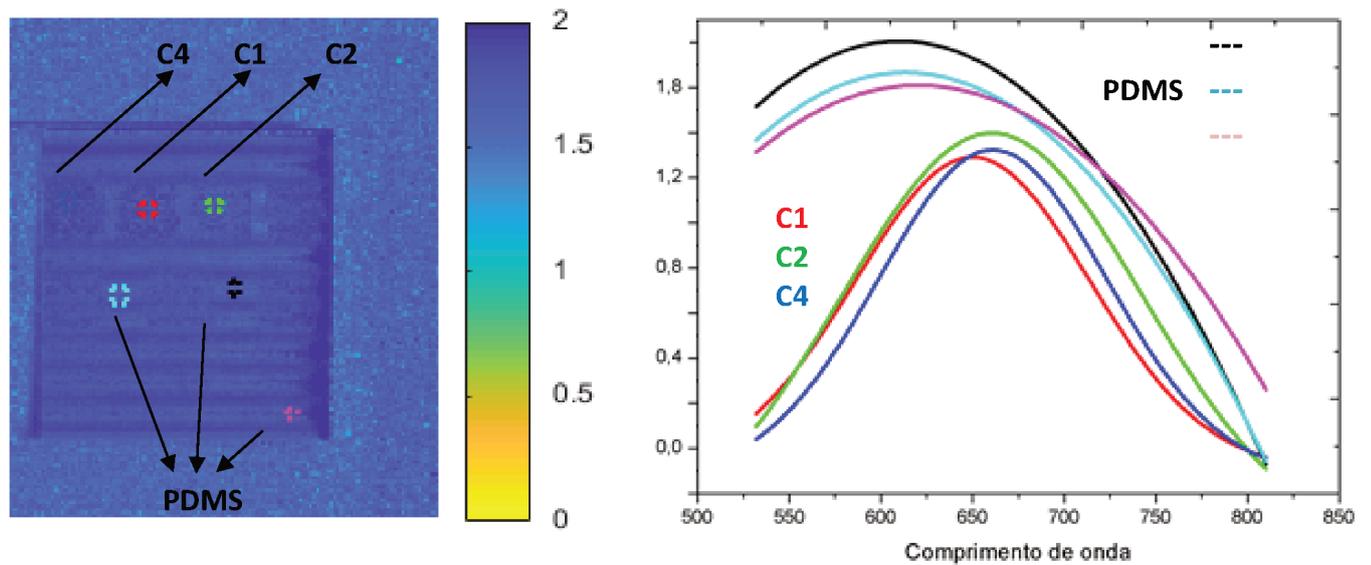


Figura 21: Curvas de Absorção (A) e Espalhamento (B) do *phantom* contendo diversas concentrações de ftalocianina de zinco.

As curvas representam regiões de interesse selecionados no processamento das imagens a serem analisadas quantitativamente. Seus valores apresentados no gráfico da **Figura 21** são a representação dos valores médios da absorção ou espalhamento da região de interesse selecionada. Nesta imagem foram selecionadas 6 regiões de interesse, dentre elas, 3 na presença de ftalocianina de zinco, representadas pelas cores azul escuro (**C4**), vermelho (**C1**) e verde (**C2**), e 3 regiões contendo apenas a matriz PDMS do *phantom* (preto, azul claro e rosa), gerando

assim, o ajuste de absorção (**A**) e espalhamento (**B**). Dentre as regiões analisadas, nota-se uma clara diferença de absorção e espalhamento entre a seção na presença de ZnPc e PDMS. Deve-se atentar que, assim como nas medidas do mapeamento apresentadas anteriormente, o ajuste também apresenta limitações para comprimentos de onda acima de 650 nm visto a limitação do equipamento utilizado, deste modo, as discussões a seguir serão limitadas aos 3 comprimentos de onda iniciais selecionados pelos filtros; 532 nm, 650 nm e 680 nm.

Utilizando os valores processados através do *SFDI* e comparando com nossos valores de referência podemos observar alguns dados relevantes. Inicialmente, analisando as curvas de absorção obtido na pela técnica de SFDI (**Figura 21**) em contrapartida com o espectro de referências adquirido pela esfera integradora (**Figura 18**), nota-se que há similaridade entre elas e os valores estão próximos, mas dentro de uma pequena margem de erro experimental como pode ser observado na **Tabela 3**, havendo a necessidade de uma melhor calibração do equipamento de SFDI para que os valores se aproximem ainda mais da referência.

Tabela 3: tabelas comparativas dos valores de absorção (cm^{-1}) e espalhamento (cm^{-1}) obtidos pela técnica de SFDI e pela esfera integradora para as amostras de ZnPC C1, C2 e C4.

Amostra	Absorção	Absorção	Espalhamento	Espalhamento
C1	SFDI	Esfera	SFDI	Esfera
532 nm	0.24	0.17	0.06	1.55
650 nm	0.45	0.63	1.48	1.23
680 nm	0.37	0.60	1.25	1.14

Amostra	Absorção	Absorção	Espalhamento	Espalhamento
C2	SFDI	Esfera	SFDI	Esfera
532 nm	0.22	0.09	0.07	1.20
650 nm	0.40	0.39	1.49	1.00
680 nm	0.38	0.37	1.20	0.96

Amostra	Absorção	Absorção	Espalhamento	Espalhamento
C4	SFDI	Esfera	SFDI	Esfera
532 nm	0.21	0.07	0.05	1.01
650 nm	0.33	0.29	1.30	0.83
680 nm	0.37	0.27	1.25	0.81

Por outro lado, analisando os valores de absorção e comparando com o *phantom* de ZnPc e suas concentrações é possível confirmar que a técnica exhibe acurácia ao distinguir as regiões com maiores concentrações. Na **Figura 21 (A)** as três regiões na presença de ZnPc as cores vermelho, verde e azul escuro representam as concentrações C1, C2 e C4 respectivamente, ou seja, como esperado as maiores concentrações de ZnPc apresentam maior coeficiente de absorção e a técnica de *SFDI* detecta essas variações.

A grande relevância de encontrar essas variações já esperadas ocorre devido a técnica de *SFDI* se dispor de um campo largo para formar suas imagens, desse modo parte das informações da amostra pode se perder devido à grande quantidade de informações captadas pelo equipamento. Desse modo, a técnica se apresenta como uma potencial ferramenta de imagens médicas, podendo observar a variação de um cromóforo específico mesmo em meios extremamente turvos e na presença de diversos componentes, como o tecido humano.

O espalhamento apresentado na **Figura 21 (B)** apresentam valores muito maiores que os de absorção, estes dados são condições obrigatórias para a validade dos dados obtidos visto que, a equação de difusão somente é válida quando o espalhamento é maior que a absorção. Os valores de espalhamento devem ser próximos para as regiões analisadas por utilizarem das mesmas concentrações de agente espalhador no meio (2,5 mg/mL de TiO_2).

3.5 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DO *SFDI*

Por ser uma técnica de campo largo, ou seja, que abrange uma grande região de análise, sua utilização para detecção de tumores a torna uma interessante ferramenta para complementar exames e garantir uma maior comodidade aos médicos e profissionais da área. Utilizamos neste trabalho pioneiro dois lotes de amostras biológicas: carne de ave *in natura* e desnaturado.

Inicialmente foi proposto um *phantom* biológico utilizando carne de ave e inserindo gordura bovina no formato retangular dentro de sua estrutura. O processo de aquisição das imagens nesta etapa foi realizado em duas partes, a primeira consiste em imagens utilizando carne de ave com pouco tempo de abate mantendo ainda muitas de suas propriedades originais (*in natura*), principalmente água e proteínas. Na segunda etapa manteve-se a mesma amostra, entretanto, deixou em temperatura ambiente (25 °C) por um período de 24 horas (*desnaturada*). A incisão da gordura bovina na amostra teve de 2 a 3 mm de profundidade. A **Figura 22** apresenta a amostra utilizada nesta etapa do trabalho.

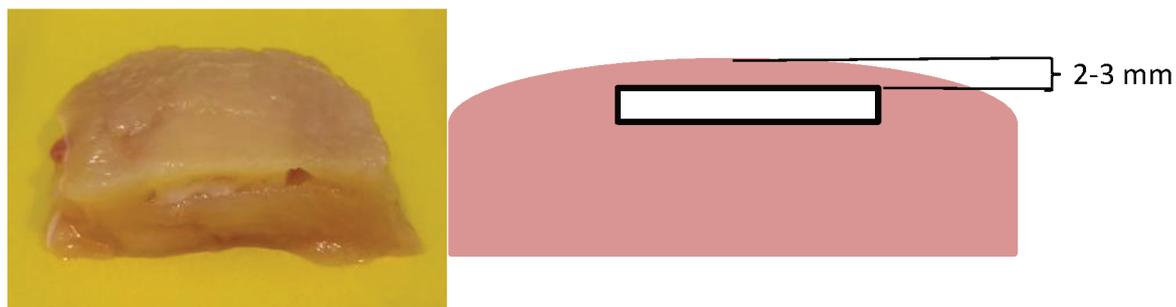


Figura 22: Amostra de *phantom* biológico utilizado nesta etapa do projeto e sua representação.

Como é observado na janela óptica (**Figura 3**), a absorção da hemoglobina é predominante desde o ultravioleta até o infravermelho, entretanto, quando em baixas concentrações no meio pode haver sobreposição de outros cromóforos presentes na região. Deste modo, a escolha da carne de ave para esta análise inicial se deve principalmente a este fator, visto que, próximo de 600 nm dá-se início a absorção de moléculas de lipídeos e água, possibilitando uma análise visual facilitada. Foram analisados 3 comprimentos de onda principais: 532, 650 e 680 nm. Cada um dos comprimentos de onda específicos citados representa um cromóforo biológico dentro da janela terapêutica. Em 532 nm há absorção predominante de hemoglobina, 650 está presente lipídeos e, por fim, em 680 nm a absorção da água tem um leve acréscimo sobrepondo a presença de lipídeos na região. Nas **Figuras 23 e 24** serão apresentadas as imagens utilizando a técnica de *SFDI* para a amostra *in natura* e desnaturada do *phantom* biológico.

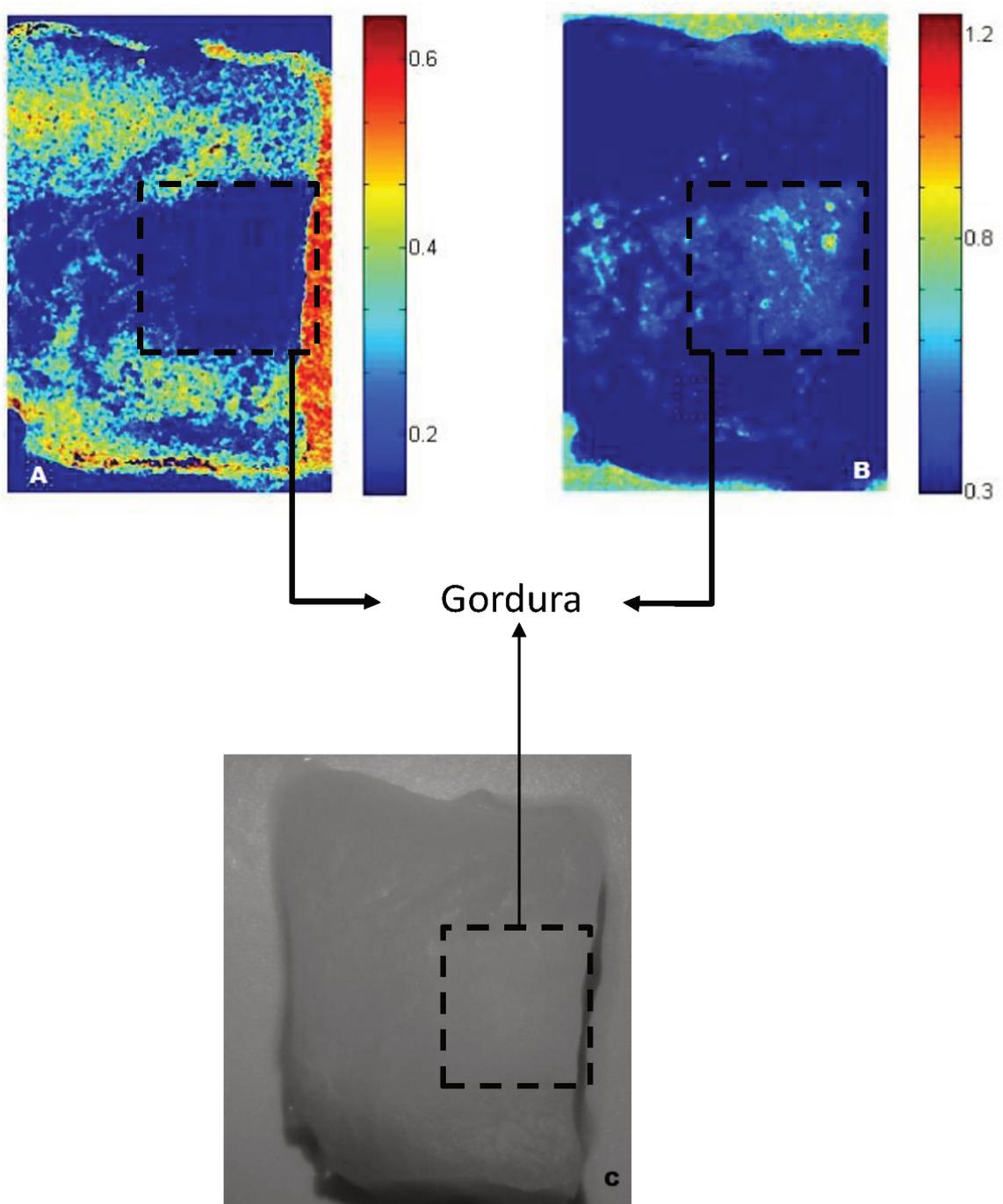


Figura 23: (A) Mapeamento de absorção e (B) espalhamento do *phantom* biológico com suas respectivas escalas de cores para referência, por fim, em (C) a imagem de referência capturada através da câmera CCD.

(A) 1º dia – *in natura*

(B) 2º dia - *desidratado*

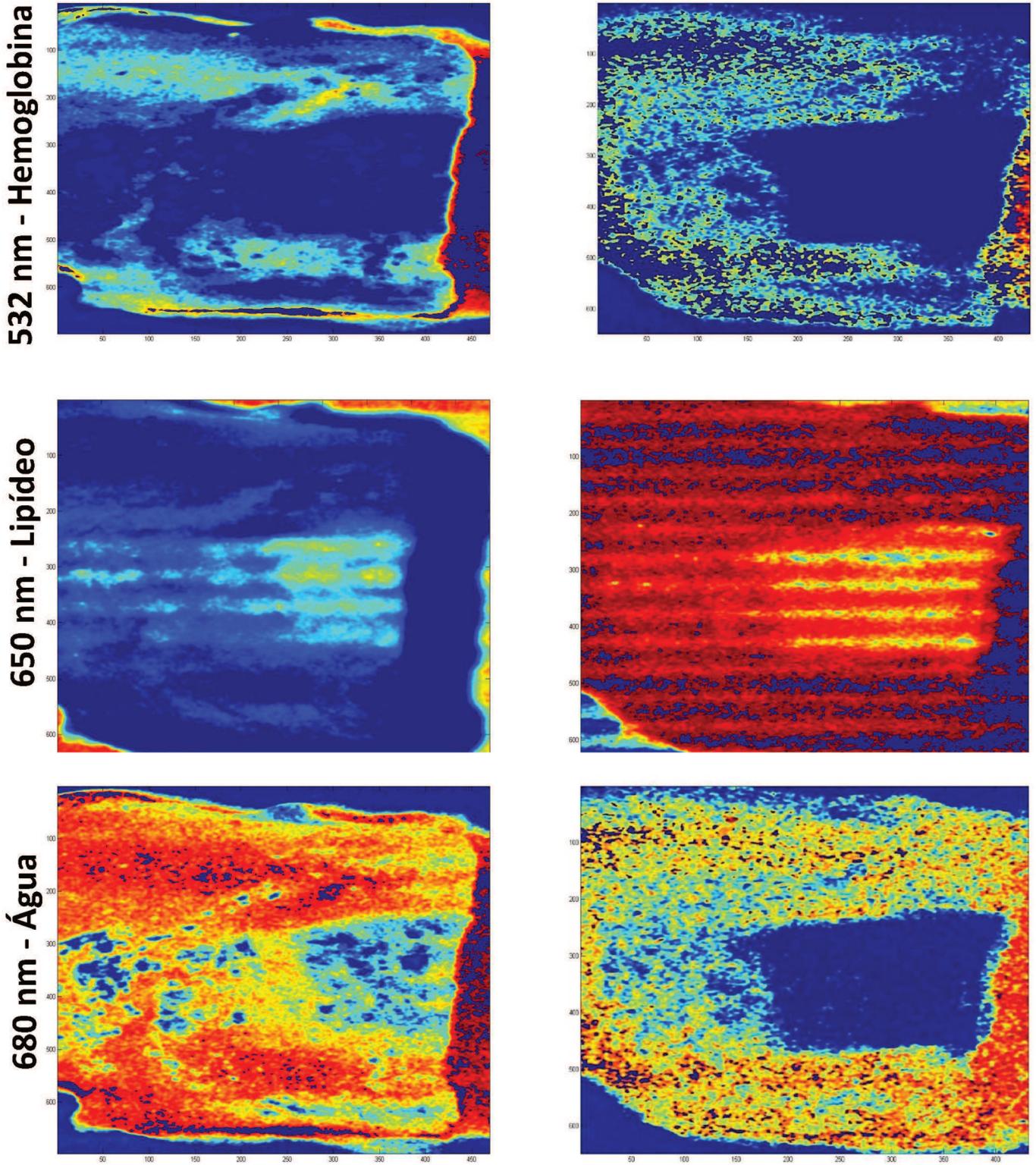


Figura 24: Imagem comparativa da absorção no primeiro e no segundo dia da Hemoglobina, lipídeo e água respectivamente.

As imagens apresentadas na **Figura 24 (A)** exibem o mapeamento da absorção do *phantom in natura*. É possível observar nitidamente a região onde está presente a gordura bovina utilizando os cromóforos selecionados (**Figura 22**).

Como citado anteriormente, em 532 nm a absorção da hemoglobina é predominante. Por ser uma carne de ave as quantidades de hemoglobina presentes são pequenas comparada a carne vermelha. Nesse sentido, esperava-se que o contraste presente na **Figura 24** não fosse altamente evidente.

Por outro lado, ao observar as imagens de absorção e espalhamento da gordura e da água notamos um forte contraste em suas regiões específicas. O mapeamento em 650 nm, com absorção referente aos lipídeos, há forte absorção na região quadrangular referente a inserção da gordura bovina.

O último mapa de absorção, em 680 nm, nos mostra algo relevante, a forte absorção da água presente na carne *in natura*. Dentre os cromóforos analisados, a água é o que está presente em maior quantidade. Seideman (1984), em seu trabalho descreve a importância da água como parâmetro de qualidade da mesma devido sua grande concentração e sua alta volatilidade.

Após a primeira etapa de amostras, o *phantom in natura* foi deixado por 24 horas a temperatura ambiente e refeito as imagens através da técnica de *SFDI*.

Ao comparar as imagens do *phantom in natura*, **Figura 24 (A)**, e após sua desnaturação, **Figura 24 (B)**, há uma perceptível variação na concentração dos cromóforos analisados. Inicialmente em 532 nm, referente a absorção de hemoglobina, notava-se no primeiro dia uma absorção com intensidades um pouco mais forte quando comparados ao segundo dia. Este fator de redução na concentração está associado a redução da concentração de mioglobina devido a oxidação (SEIDEMAN, 1984).

Em 680 nm temos a maior variação de concentração que é referente a perda de água para o meio devido ao armazenamento a temperatura ambiente, perdendo relativas quantidades de água para o meio. Devido à redução na concentração da água presente na carne foi possível então obter uma absorção ainda mais intensa referente a gordura bovina em 650 nm, visto que, a técnica de *SFDI* por utilizar a média dos valores de reflexão para gerar suas imagens.

Nos anexos **III** e **IV**, são apresentadas com maior riqueza de detalhes as imagens de absorção e espalhamento do *phantom in natura* e desnaturado, respectivamente.

Estes resultados nos revelam a sensibilidade a pequenas variações nas concentrações presentes em uma determinada região. Tumores carcinomas são aglomerações excessivas de

alguma célula biológica, nesse sentido, um equipamento que possa analisar variações de concentração dessas células em excesso pode conseguir detectar a presença de um tumor sem a necessidade imediata de uma biópsia ou direcionar a região para biópsia com maior precisão.

Os principais cromóforos para análise do tecido humano são a hemoglobina e água, pois estão presentes de forma abundante em toda extensão do corpo. O CBC apresenta uma alta vascularização na região onde está presente, nesse sentido, ao utilizarmos futuramente a técnica de SFDI nesse tipo de tumor espera-se que haja um resultado semelhante ao obtido no *phantom in natura*. Dessa forma, possibilitando a visualização da extensão do tumor devido à alta concentração de hemoglobina na região de interesse, facilitando o trabalho médico tanto no diagnóstico quanto na excisão da lesão.

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi desenvolvido o equipamento para aquisição de imagens no domínio da frequência espacial (*SFDI*). O equipamento utilizou peças de eletrônica simples de um projetor Vivitek e um computador de mesa, reorganizado toda estrutura de maneira funcional pensando em futuras aplicações médicas. As imagens obtidas através da técnica mostraram-se sensíveis a variações de concentrações na faixa espectral de 532 nm à 680 nm, tanto no *phantom* de ftalocianina de zinco quanto no *phantom* biológico. Ainda há necessidade de uma melhor calibração do equipamento para reduzir a diferença nos valores absolutos de absorção e na estrutura física, principalmente, a substituição da lâmpada presente no projeto para que possa compreender um maior intervalo de comprimento de onda.

Por ser um projeto piloto existem algumas melhorias a serem implementadas, dentre elas a necessidade de melhorar o equipamento físico utilizado, substituir a lâmpada por uma com espectro largo em comprimentos de onda superiores a 700 nm principalmente. Outra importante melhoria é a eficiência no processamento e redução de “ruído de fundo” existente nas imagens processadas e ainda aquisição de outros parâmetros de análise como reflexão difusa x frequência espacial ($R_d \times f_x$) e penetração efetiva (δ_{eff}) que nos fornece informações sobre a profundidade de um tumor.

Por fim, a técnica é um possível recurso de aplicação médica, sendo sensível a variações nos cromóforos, hemoglobina, lipídeos e água, dentro da janela terapêutica. Tais cromóforos podem ser utilizados na detecção de tumores como CBC e CEC, visto que, a alteração na concentração pontual dessas células (água, lipídeo, melanina ou hemoglobina) dá indícios a presença de um fator maligno ao paciente.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Por ser um trabalho piloto há muito a ser implementado afim de otimizar a técnica de SFDI para a finalidade clínica. Inicialmente, deve-se melhorar a estrutura física do equipamento utilizando componentes eletrônicos mais sofisticados para melhorar o tempo de aquisição das imagens, assim como, a substituição da lâmpada de mercúrio por uma com maior espectro de emissão, permitindo assim, obter informações de outros cromóforos importantes, principalmente a melanina, com picos de absorção em 810 nm.

Quanto a performance de processamento de imagens, é importante aprimorar a linguagem procedimental utilizada objetivando maior velocidade de aquisição das imagens finais. Utilizar ferramentas presentes no software MatLab para reduzir a quantidade de ruídos de fundo presentes nas imagens, consequentemente, aumentando o contraste e facilitando a análise visual.

Como consequência natural, espera-se um impacto na qualidade dos trabalhos com a abertura e o desenvolvimento de estudos ligados ao diagnóstico precoce de tecidos. Estes resultados serão bastante úteis como base fundamental para o mapeamento de tumores cutâneos *in-vivo*.

Por fim, faz-se necessário uma melhora cosmética da interface gráfica de interação do equipamento com o computador, visto que, objetivamos futuras aplicações em hospitais e clínicas. Nesse sentido, uma interface apropriada aos médicos seria um facilitador da introdução do equipamento.

6 REFERÊNCIAS

- ALERSTAM, E.; Optical spectroscopy of turbid media: time-domain measurements and accelerated Monte Carlo modelling. Lund University, 2011.
- AYERS, F.; GRANT, A.; KUO, D.; CUCCIA, D.J.; DURKIN, A.J.; Fabrication and characterization of silicone-based tissue phantoms with tunable optical properties in the visible and near infrared domain, Proc. SPIE. 6870, 2008. <https://doi.org/10.1117/12.764969>
- BOHREN, C. F.; HUFFMAN, D. R.; Absorption and Scattering by an Arbitrary Particle, Absorption and Scattering of Light by Small Particles, p. 57-81, Wiley-VCH, Verlag GmbH, 1998.
- COHEN, G.; Contrast detail dose analysis of six different computed tomographic scanners. Journal of Comput. Assist. Tomogr. v. 3(2), p.197 - 203, 1979. <https://doi.org/10.1097/00004728-197904000-00010>
- DURDURAN, T.; YODH, A. G.; CHANCE, B.; BOAS, D. A.; Does the photon-diffusion coefficient depend on absorption? *J. Optical Soc. Am. A* 14, 3358, 1997. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.14.003358>
- DERGHAM, A.P.; MURARO, C.C.; RAMOS, E.A.; MESQUITA, L.A.F.; COLLAÇO, L.M.; Distribuição dos diagnósticos de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de pele no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. *An. Bras. Dermatol.* 79,555-559, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000500005>
- EISBERG, R.; RESNICK, R. Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas. 9. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1994.
- FISHKIN, J. B.; GRATTON, E.; Propagation of photon-density waves in strongly scattering media containing an absorbing semi-infinite plane bounded by a straight edge. *J. Opt. Soc. Am. A* 10 (1), 127–140, 1993. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.10.000127>
- GREINER, W.; REINHARDT, J.; Quantum Electrodynamics. Springer, 4^o ed. 2009.
- HASKELL, R. C.; SVAASAND, L. O.; TSAY, T. T.; FENG, T. C.; MCADAMS M. S.; TROMBERG, B. J.; Boundary conditions for the diffusion equation in radiative transfer,” *J. Opt. Soc. Am. A* 11(10), 2727–2741, 1994. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.11.002727>
- HECHT, E.; *Optics*, Addison-Wesley, Reading, MA, 1987.

HENYEY, L. G.; GREENSTEIN, J. L.; Diffuse radiation in the galaxy. *The Astrophysical Journal* **93**, 70–83, 1941. <https://doi.org/10.1086/144246>

ISHIMARU, A.; *Wave Propagation and Scattering in Random Media*, Vol. 1 and 2, Academic Press, New York, 1978.

LEMAILLET, P., BOUCHARD, J.P., ALLEN, D.W.; Development of traceable measurement of the diffuse optical properties of solid reference standards for biomedical optics at National Institute of Standards and Technology. *Appl. Opt.*, **54**(19), 6118-6127, 2015. <https://doi.org/10.1364/AO.54.006118>

MATCHER, S. J.; COPE, M.; DELPY, D. T.; Use of the water absorption spectrum to quantify tissue chromophore concentration changes in near-infrared spectroscopy," *Physics in Medicine and Biology*, 39(1), 177, 1994. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/39/1/011>

MONTE, A. F. G.; REIS, A. F.; CRUZ JUNIOR, L. B.; ANTUNES, A.; Preparation and quantitative characterization of polydimethylsiloxane optical phantoms with zinc-phthalocyanine dye absorbers. *Apl. Opt.* **57**, 20, 5865-5871, 2018. <https://doi.org/10.1364/AO.57.005865>

NADEAU, P.; et al.; Quantitative assessment of renal arterial occlusion in a porcine model using spatial frequency domain imaging. *Opt. letters*. 38, 2003.

NYK, M.; PALAWSKA, K.; KEPINSKI, L.; WILK, K. A.; STREK, W.; SAMOC, M.; Fluorescence resonance energy transfer in a non-conjugated system of CdSe quantum dots/zinc-phthalocyanine, *J. Lumin.* **130**, 2487–2490, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2010.08.017>

O'LEARY, M. A.; BOAS, D. A.; CHANCE, B.; YODH, A. G.; Refraction of diffuse photon density waves," *Phys. Rev. Lett.* **69**(18), 2658–266, 1992. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.69.2658>

OLSEN, J.B.; SAGER, E.M.; Subjective evaluation of image quality based on images obtained with a breast tissue pattern: comparison with a conventional image quality phantom. *Br. J. Cancer* **68** (806), p. 160 - 164, 1995.

PATTERSON, M.; CHANCE, B.; WILSON, B.; Time-resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties. *Appl. Opt.* **28**, 2331–2336, 1989. <https://doi.org/10.1364/AO.28.002331>

POGUE, B. W.; JIANG, S.; DEHGHANI, H.; et. al.; Characterization of hemoglobin, water, and NIR scattering in breast tissue: analysis of intersubjective variability and

menstrual cycle changes. *Journal of Biomedical Optics*, **9**(3), 541-552, 2004. <https://doi.org/10.1117/1.1691028>

POGUE, B.W.; PATTERSON, M.S.; Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *Journal of Biomedical Optics*. **11**, 4, 041102, 2006. <https://doi.org/10.1364/AO.32.000559>

PRAHL, S.A., Vangemert, M.J.C., A.J. Welch, Determining the optical-properties of turbid media by using the adding-doubling method. *Appl. Opt.* **32**(4), 559-568, 1993. <https://doi.org/10.1364/AO.32.000559>

RAGAIN, J.C.; JOHNSTON, W.M.; Accuracy of Kubelka–Munk reflectance theory applied to human dentin and enamel, *J. Dent. Res.*, **80**, 449, 2001. <https://doi.org/10.1177/00220345010800020901>

VAN STAVEREN, H. J.; MOES, C. J. M.; VAN MARLE, J.; PRAHL, S. A.; VAN GEMERT, M. J. C.; Light scattering in Intralipil-10% in the wavelength range of 400–1100 nm, *Appl. Opt.* **30**(31), 4507–4514, 1991. <https://doi.org/10.1364/AO.30.004507>

TARTARI, T., et al.; Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. *International Endodontic Journal*, **51**, E42-E54, 2018. <https://doi.org/10.1111/iej.12764>

TOVO, F.R.; FESTA NETO, C.; CASTRO, C.V.B.; SAMPAIO, S.A.P.; Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina - Carcinoma Basocelular. São Paulo: *AMB*. 1-16, 2001.

TSUCHIKAWA, S.; TSUTSUMI, S.; Analytical characterization of reflected and transmitted light from cellular structural material for the parallel beam of NIR incident light, *Appl. Spectrosc.*, **53**, 1033, 1999. <https://doi.org/10.1366/0003702991948026>

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SOTO, Q. ANDRES; (2016). Multispectral diffuse optical spectroscopy for biomedical applications. Research Gate, 2016.

VO-DINH, T.; Biomedical photonics for biomedical Science. Boca Raton, FL: CRC Press. 2003. <https://doi.org/10.1201/9780203008997>

SEIDEMAN, S.C., et al. Factors associated with fresh meat color: a review. *J. Food Quality*, **6**(3), 211-237, 1984. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1984.tb00826.x>

SVAASAND, L. O.; SPOTT, T.; FISHKIN J. B.; PHAM, T.; TROMBERG, B. J.; BERNIS, M. W.; Reflectance measurements of layered media with diffuse photon-density waves: a potential tool for evaluating deep burns and subcutaneous lesions. *Phys. Med. Biol.* **44**(3), 801–813, 1999. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/44/3/020>

VENUGOPALAN, V.; YOU J. S.; TROMBERG, B. J.; Radiative transport in the diffusion approximation: An extension for highly absorbing media and small source-detector separations. *Physical Review E*, **58**, 2395 - 2407, 1998. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.58.2395>

WANG, L.V.; WU, H.I. *Biomedical optics: principles and imaging*. Wiley, 2012.

ZANGWILL, A.; *Modern Electrodynamics*. Cambridge University Press, 2012.

7 ANEXO I

a) Conversão das imagens em dados:

convert_HC1_data.m

```

% This is for converting the image data obtained by the HC1 system into
% ones for SFDI source code
% AFGM 2017

clear all;
cd(strrep(mfilename('fullpath'),mfilename,''));

color = {'810','780','750','680','650','530'};
s_freq = {'0','50','100','200','400'}; % x0.001/mm
    % Melhorar o programa para fazer a leitura das frequencias
nas
    % pastas de modo automatico, ou seja, sem necessidade de
especificar
    % quais as frequencias para converter

phase = {'0','120','240'}; % Degree

dir_HC1_data= uigetdir(strrep(mfilename('fullpath'),mfilename,''),...
    'Select the HC1 data
folder');

temp = imread([dir_HC1_data '/0/' char(color(1)) '_0.tif']);
img_size = size(temp);
HC1_image = zeros(img_size(1), img_size(2), 6*5*3);

[pathstr,name,ext]=fileparts(dir_HC1_data);

```

```

int_time = importdata([dir_HCl_data '\' name '_ExpTime.txt']);

for i = 1:6 % wavelengths {810, 780, 750, 680, 650, 532}
    for j = 1:5 % spatial frequencies{0, 50, 100, 200, 400}
        for k = 1:3 % phases {0, 120, 240}
            temp = imread([dir_HCl_data '/' char(s_freq(j)) '/' ...
                           char(color(i))                               '_']
                           char(phase(k)) '.tif']);
            if(img_size ~= size(temp))
                temp = imresize(temp,img_size,'bilinear');
            end
            HCl_image(:,:,k+3*(j-1)+15*(i-1)) = temp;

        end
    end
end

fid=fopen([dir_HCl_data '_raw'],'w');
fwrite(fid, HCl_image, 'single');
dir_HCl_data = [dir_HCl_data '_parameters.txt'];
save(dir_HCl_data, 'img_size', 'int_time', '-ascii', '-tabs');
fclose(fid);

```

b) Script para obter informações de absorção e espalhamento da amostra

test_script_for_HC1.m

```

clear all
close all

%% OPTIONS-----
% Sample options
n_sample=1.4; %index of refraction of sample (e.g. Tissue=1.4,
Silicone=1.43, Intralipid=1.33)
chromused=[1 2 3 4 5]; % 1=HbO2 2=Hb 3=H2o 4=lipid 5=Melanin

% data processing parameters
process.method='diff'; % processing method --> 'lut', 'diff', 'mc'
                        % if 'diff' is selected, specify which 2 spatial
frequencies are to be used
LUTfreqsidx=[1 5]; % specify by index of frequency e.g. 1st and 5th
freq...
if strcmp(process.method,'lut')
    binsize=1;
else
    binsize=4; % bin pixels to speed up fitting for optical properties
(e.g. "4" bins 4x4 pixels)
end

freq.used=[]; % leave empty if you want to use ALL spatial frequencies.
% If either 'mc' or 'diff' is selected, this variable allows you to use
% only a subset of spatial frequencies collected to fit for optical
properties.

system_type = 'HC1'; % system type: HC1

file_filter='D:\Data\*.*'; % default directory location for image data

```

```

%file_filter=strrep(mfilename('fullpath'),mfilename,'RawSFDIData/*.');

% Save Name
savefile='Canal01lut';
cd(strrep(mfilename('fullpath'),mfilename,''));
%-----

% PROCESSING FLOW
%%
% Load Tissue Data: other options: predefine Tissue file of interest instead
% of using a pop-up menu

[AC,wv,freqs]=rawdataload_HCl(file_filter,...'Select the sample image data
file(s)', system_type);
% Smooth Tissue Data
AC=SmoothData(AC,3);

if isempty(freq.used); %use all available frequencies if unspecified
freq.used=(1:length(freqs));
end

%%
% Load Phantom Data: other options: predefine phantom measurement instead of
% using a pop-up menu

[ACph]=rawdataload_HCl(file_filter,'Select the reference image data
file(s)', system_type);
ACph=SmoothData(ACph,3);

%%
% Calibrate reflectance: specify reference phantom in advance?
file_filter=strrep(mfilename('fullpath'),mfilename,'phantoms/*.txt');
cal_reflectance=calibrate(wv,freqs,AC,ACph,process,file_filter);

%%
% Clear up memory
clear AC ACph

```

```

Mistackplot(cal_reflectance); %visualize calibrated reflectance data - Figure
1 is here

[cal_roi, ~]=selectroi(cal_reflectance,'Fig.2 - Select one rectangular ROI');

%%
% Fit for optical properties
if strcmp(process.method,'lut') % selects 'lut' instead of 'mc' or 'diff'

[op_fit_maps]=LUTfitops(cal_roi(:,:, :, LUTfreqsidx),wv,freqs(LUTfreqsidx),n_
sample);
    else
    %
[ave_op]=ave_fit_ops(cal_roi(:,:, :, freq.used),wv,freqs(freq.used),n_sample,
process.method,binsize);
        [op_fit_maps,
ave_op]=fit_ops(cal_roi(:,:, :, freq.used),wv,freqs(freq.used),n_sample,proce
ss.method,binsize);
    end

    %% Chromophore maps
    % average properties:
    % ave_chrom=chromfits(ave_op,wv);
    % or full map:

file_filter=strrep(mfilename('fullpath'),mfilename,'spectra/*.txt');
chrom_map=chromfits(op_fit_maps,wv,chromused,file_filter);

% average spectra for multiple ROIs... (a.k.a. "figure 3")
[spec_roi,spec_roi_std,av_chrom,rect]=opticalspectra(op_fit_maps,
chrom_map, cal_roi, wv, binsize);

% save all data
eval(['save ' savefile]);

```

8 ANEXO II

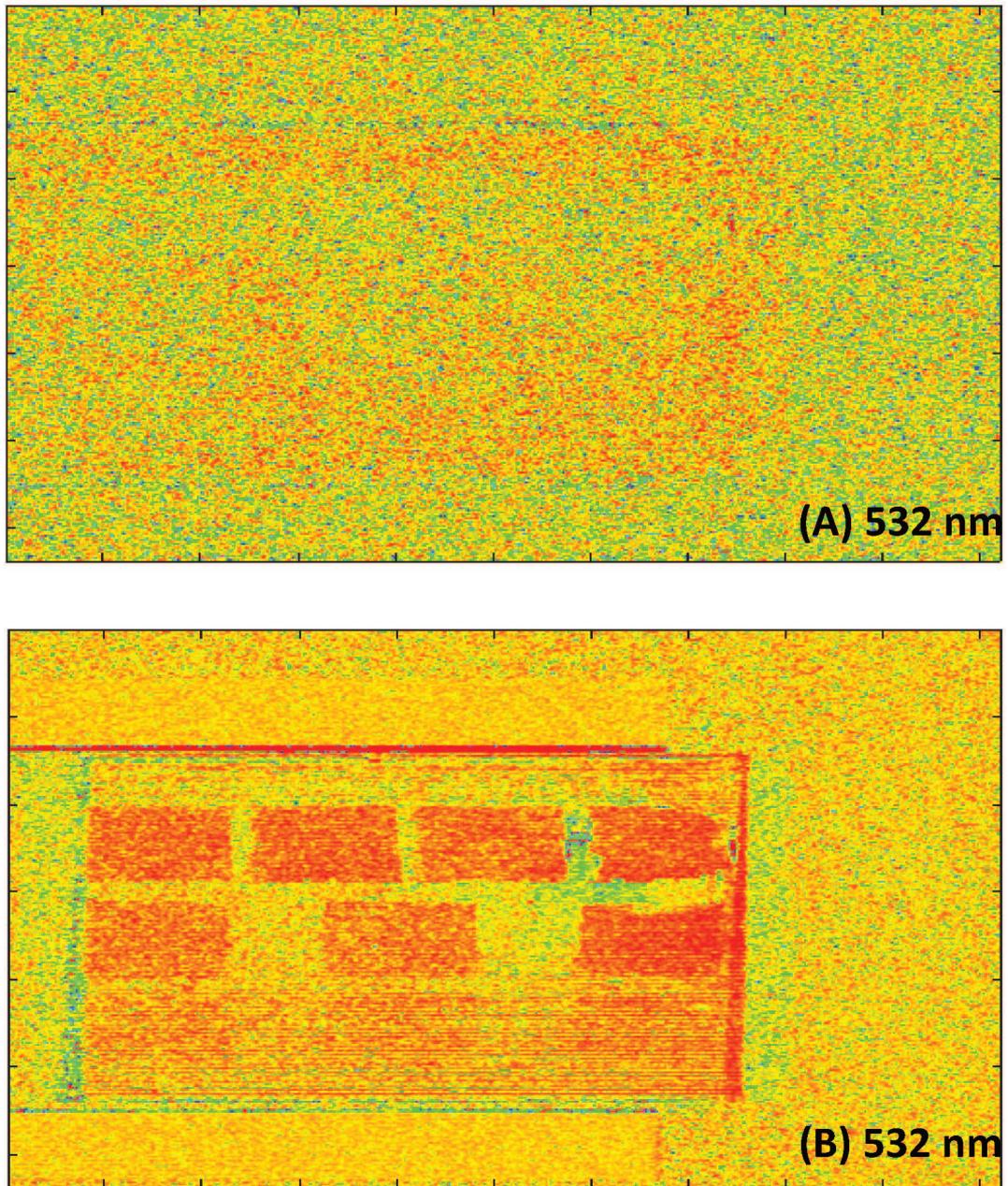


Figura 25: Mapeamento de absorção (A) e espalhamento (B) da ftalocianina de zinco nos comprimentos de onda em 532 nm.

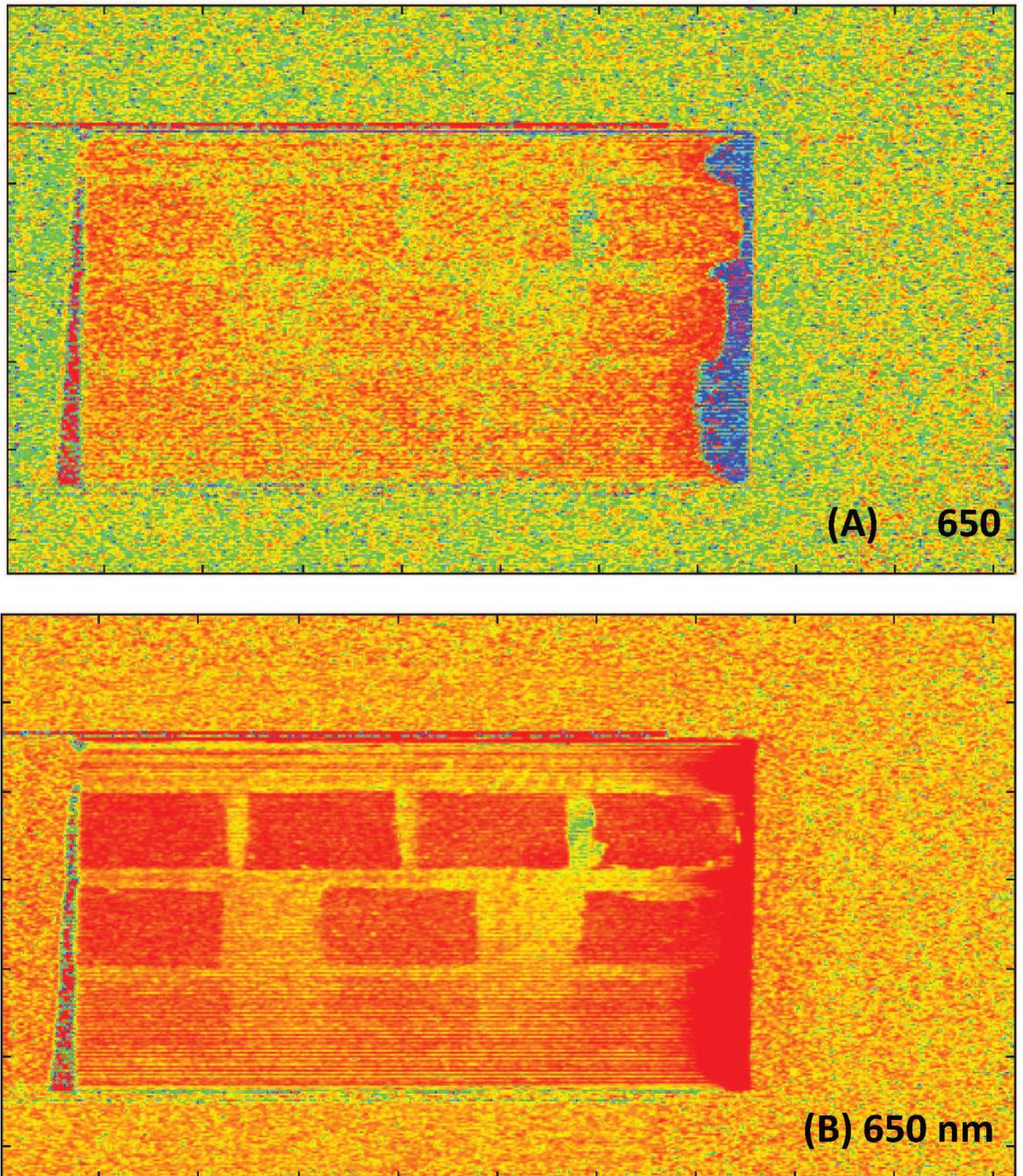


Figura 26: Mapeamento de absorção (A) e espalhamento (B) da ftalocianina de zinco nos comprimentos de onda em 650 nm.

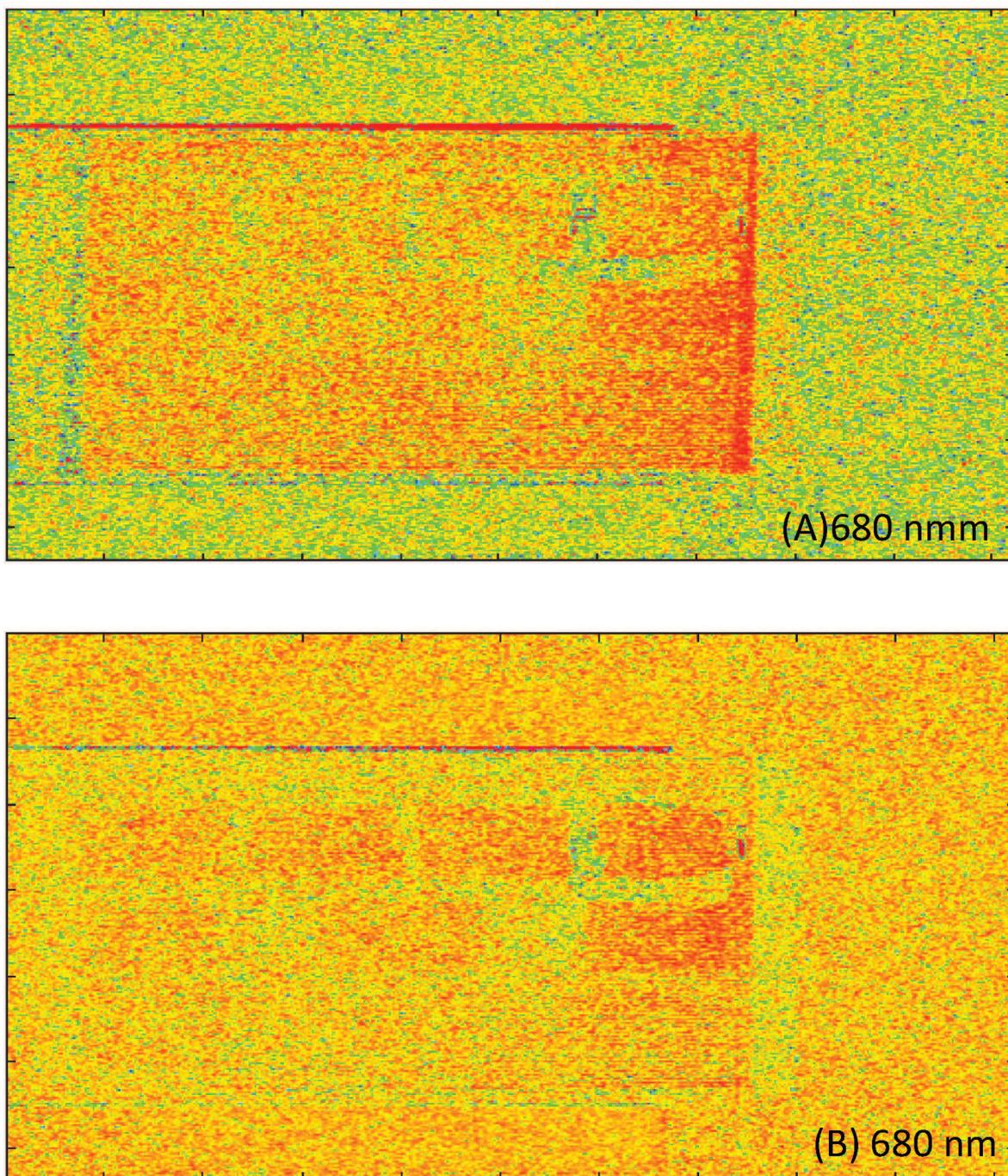


Figura 27: Mapeamento de absorção (A) e espalhamento (B) da ftalocianina de zinco nos comprimentos de onda em 680 nm.

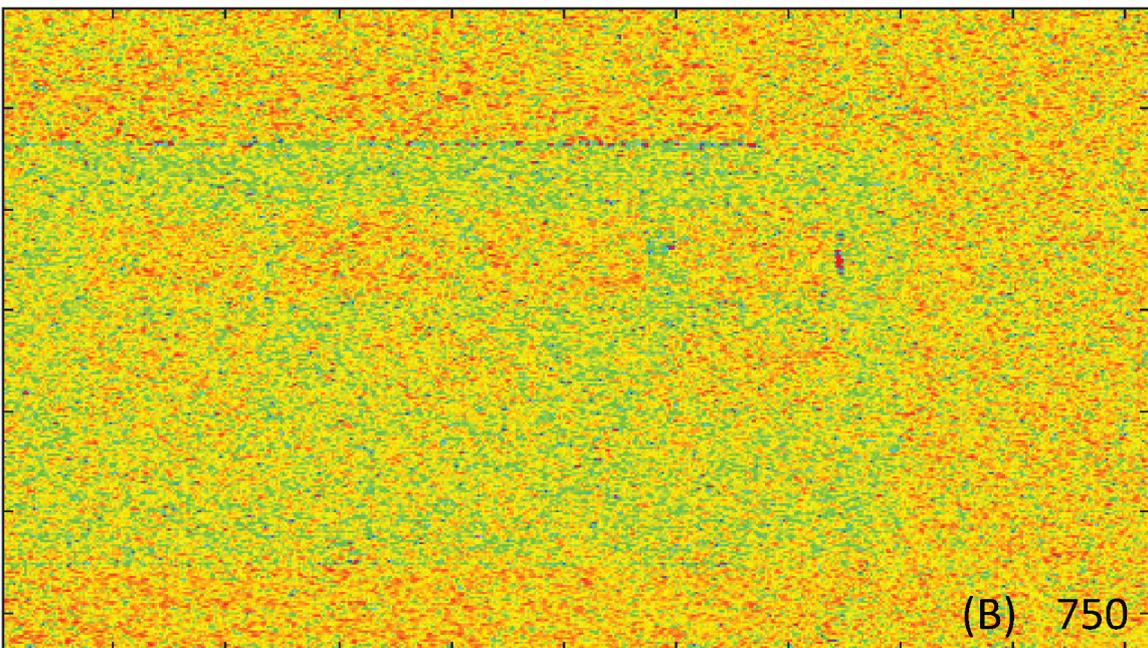
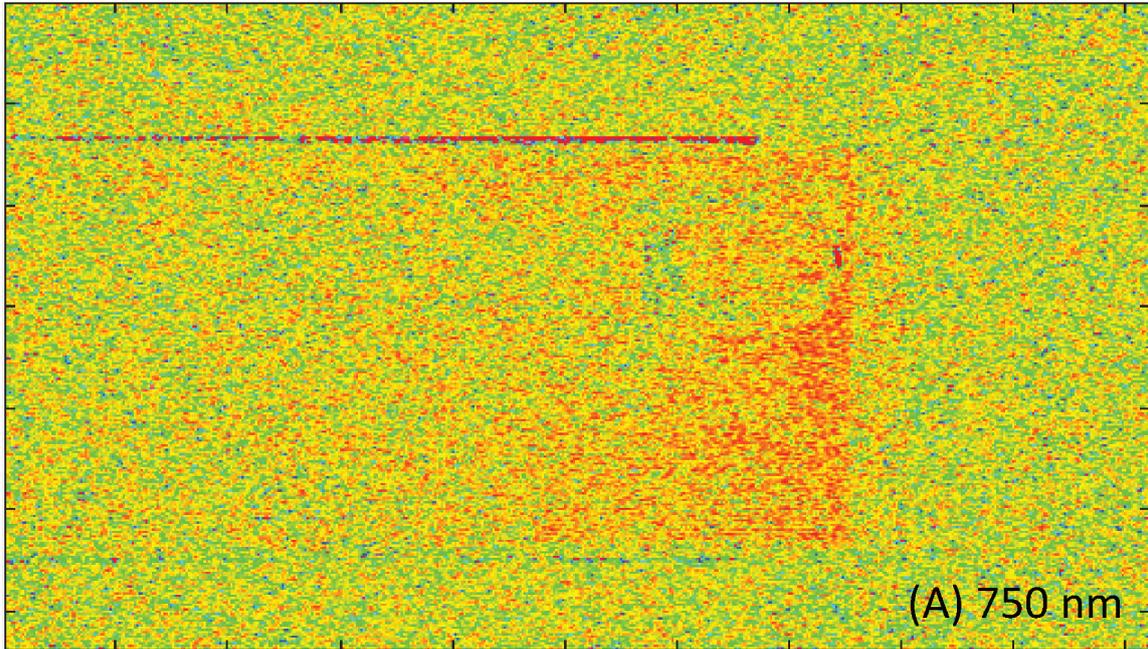


Figura 28: Mapeamento de absorção (A) e espalhamento (B) da ftalocianina de zinco nos comprimentos de onda em 750 nm.

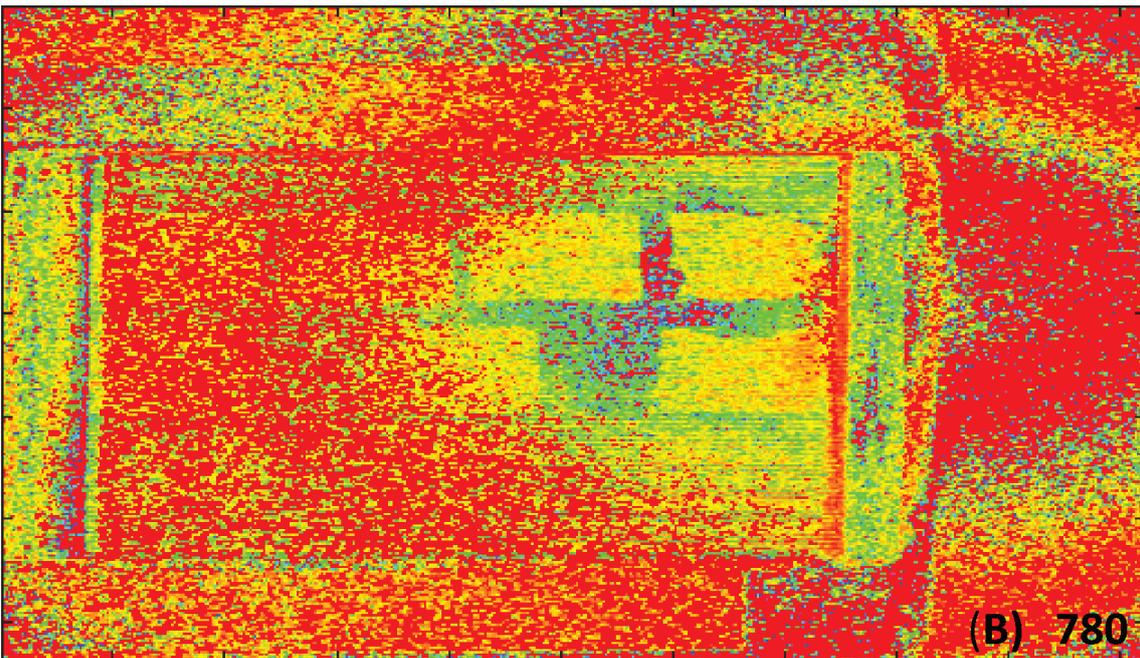
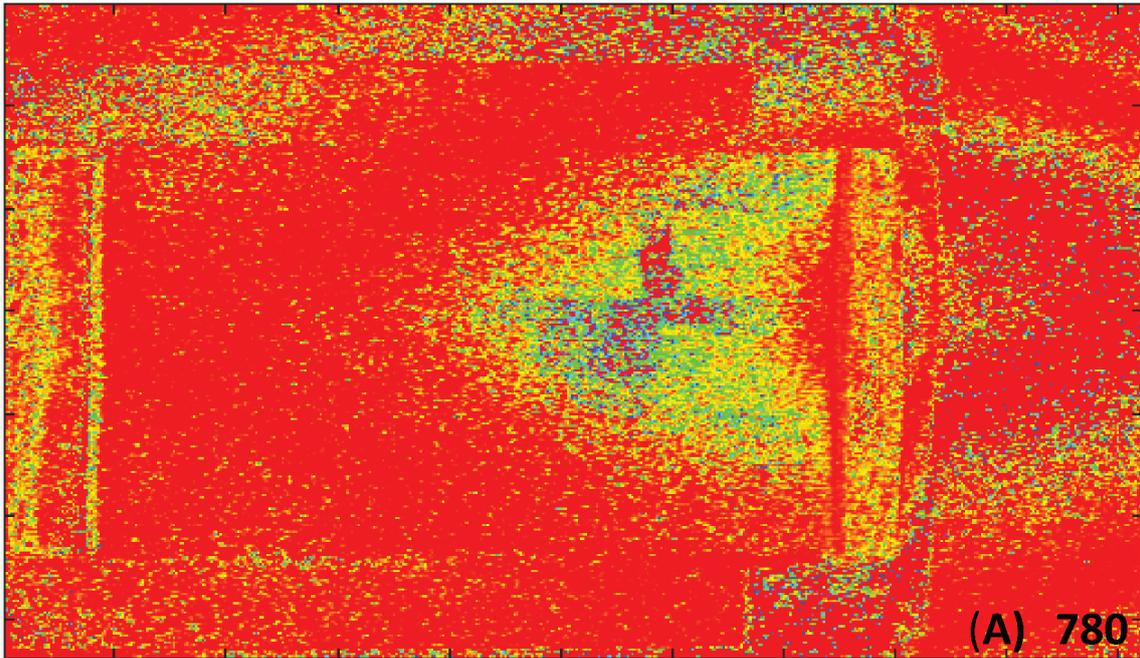


Figura 29: Mapeamento de absorção (A) e espalhamento (B) da ftalocianina de zinco nos comprimentos de onda em 780 nm.

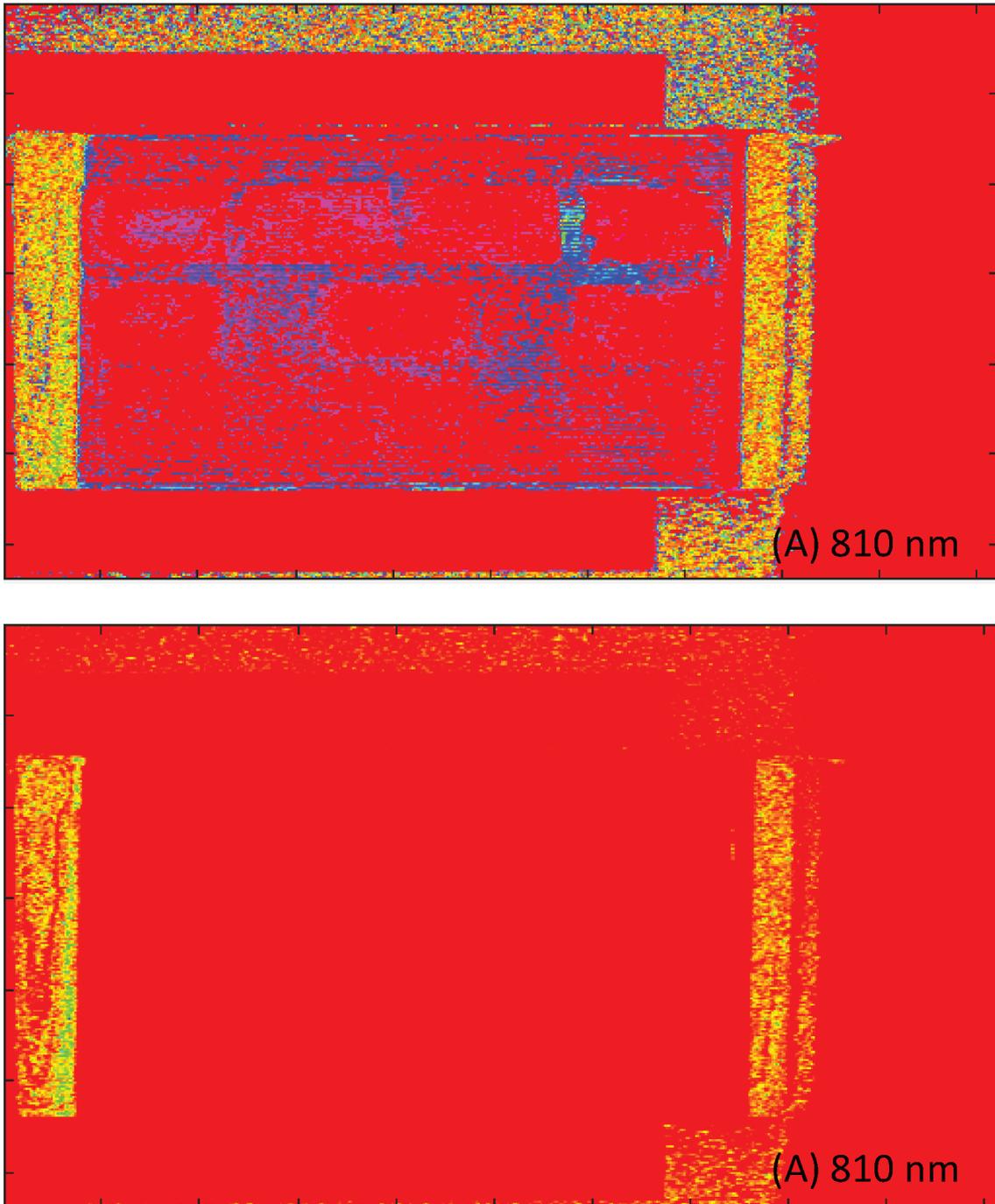
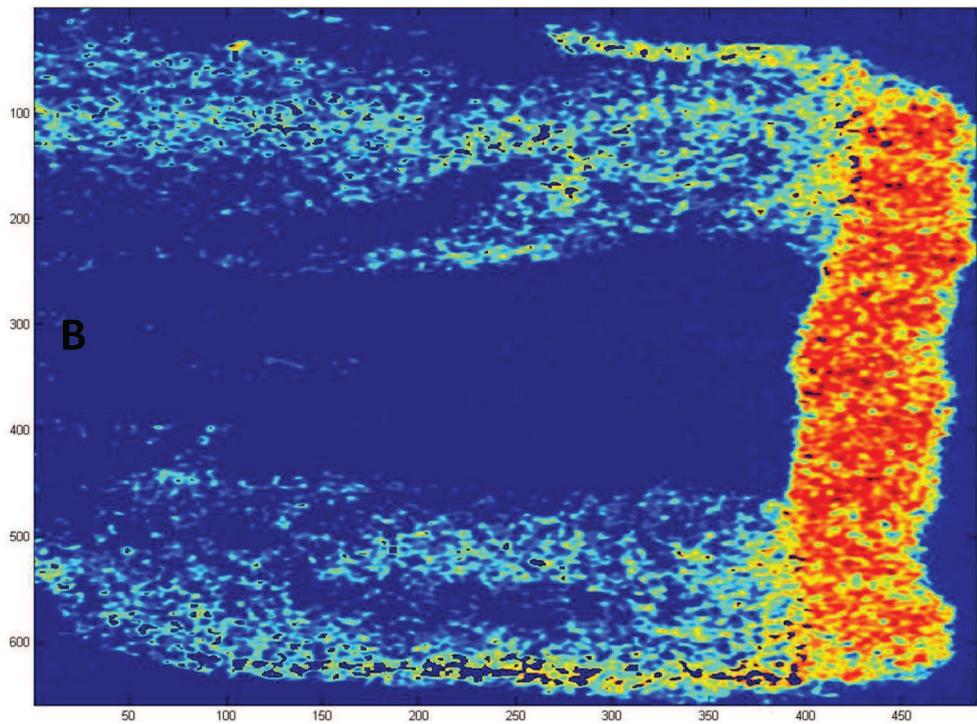
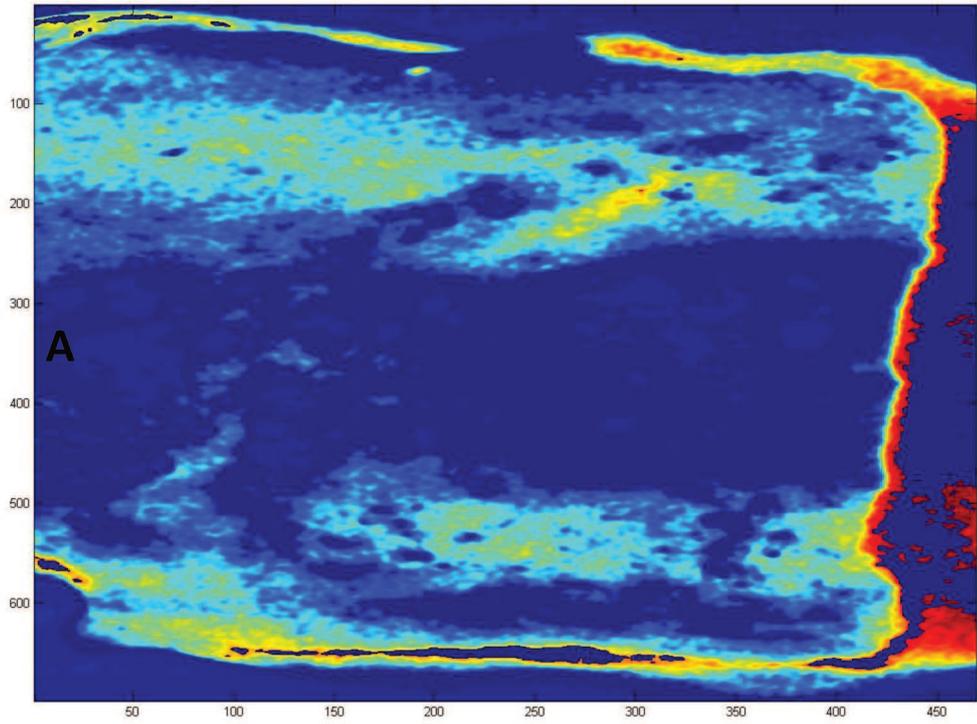


Figura 30: Mapeamento de absorção (A) e espalhamento (B) da ftalocianina de zinco nos comprimentos de onda em 780 nm.

9 ANEXO III



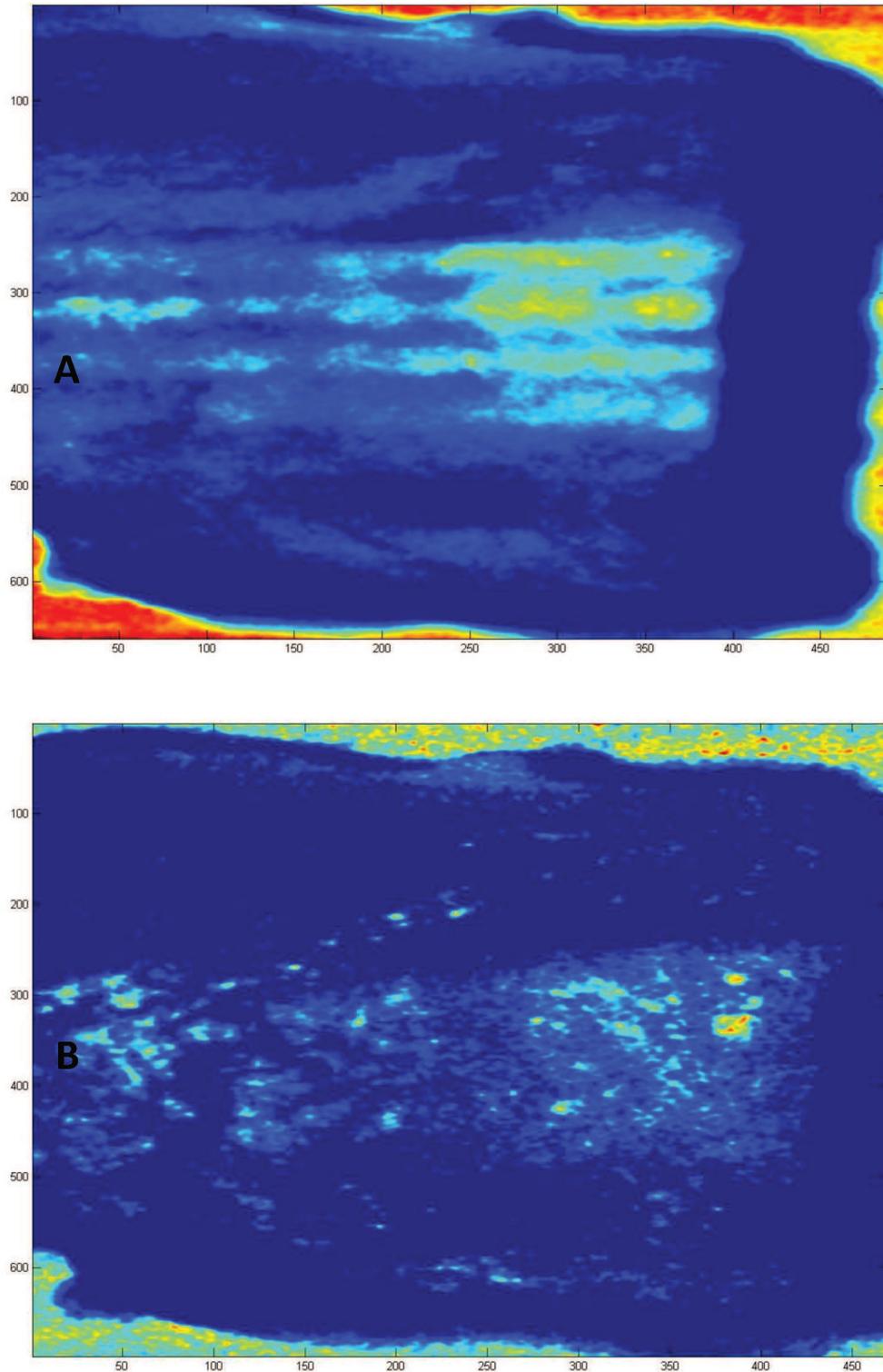


Figura 32: (A) absorção e (B) espalhamento em 650 nm.

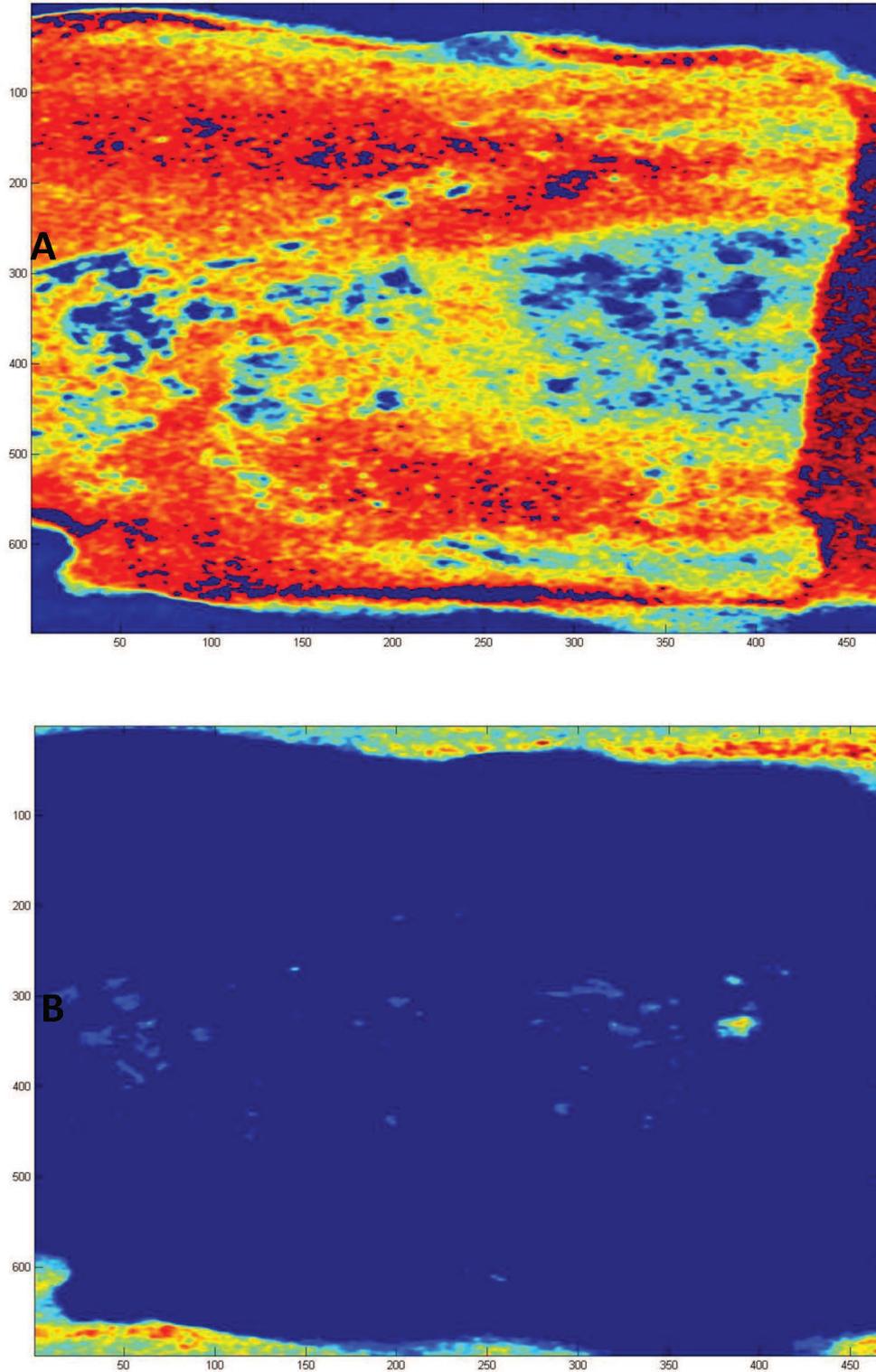
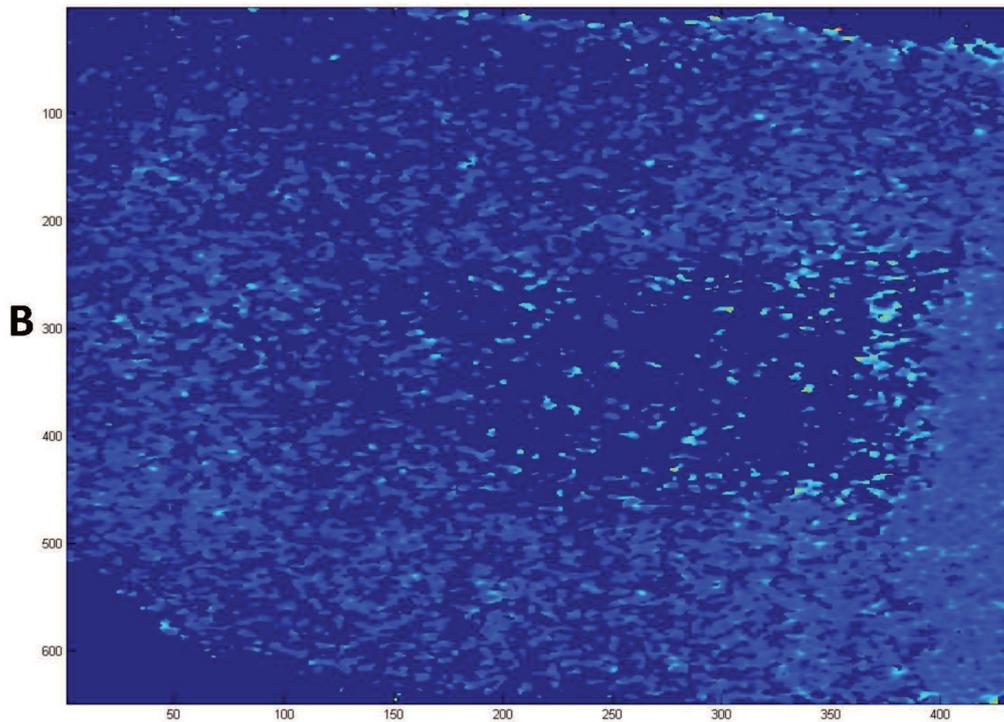
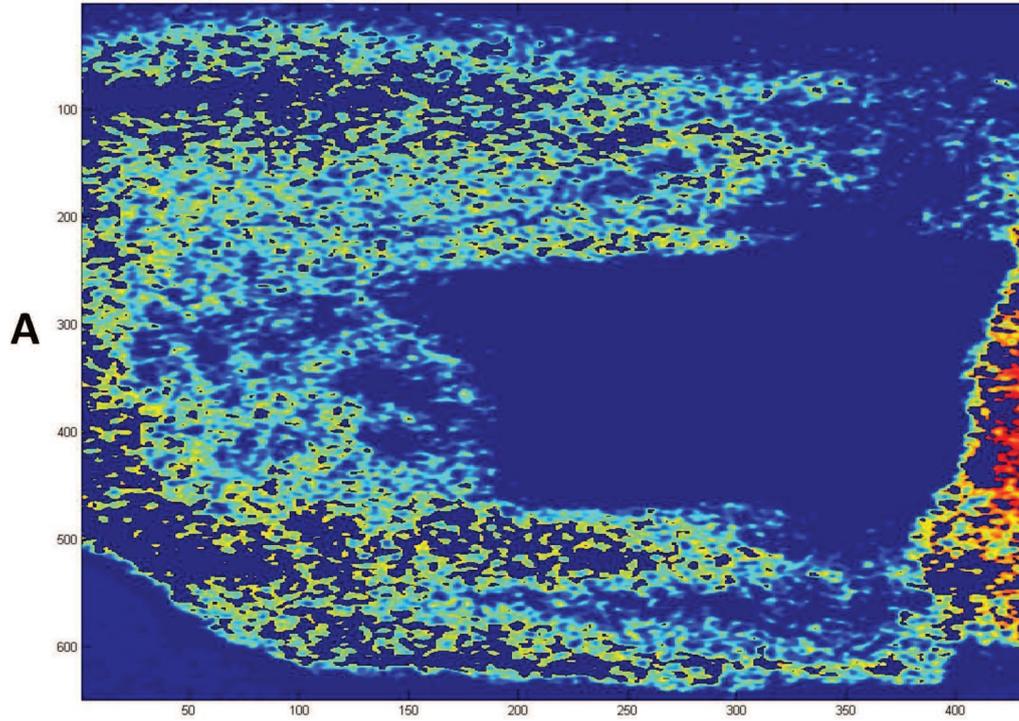


Figura 33: (A) absorção e (B) espalhamento em 680 nm.

10 ANEXO IV



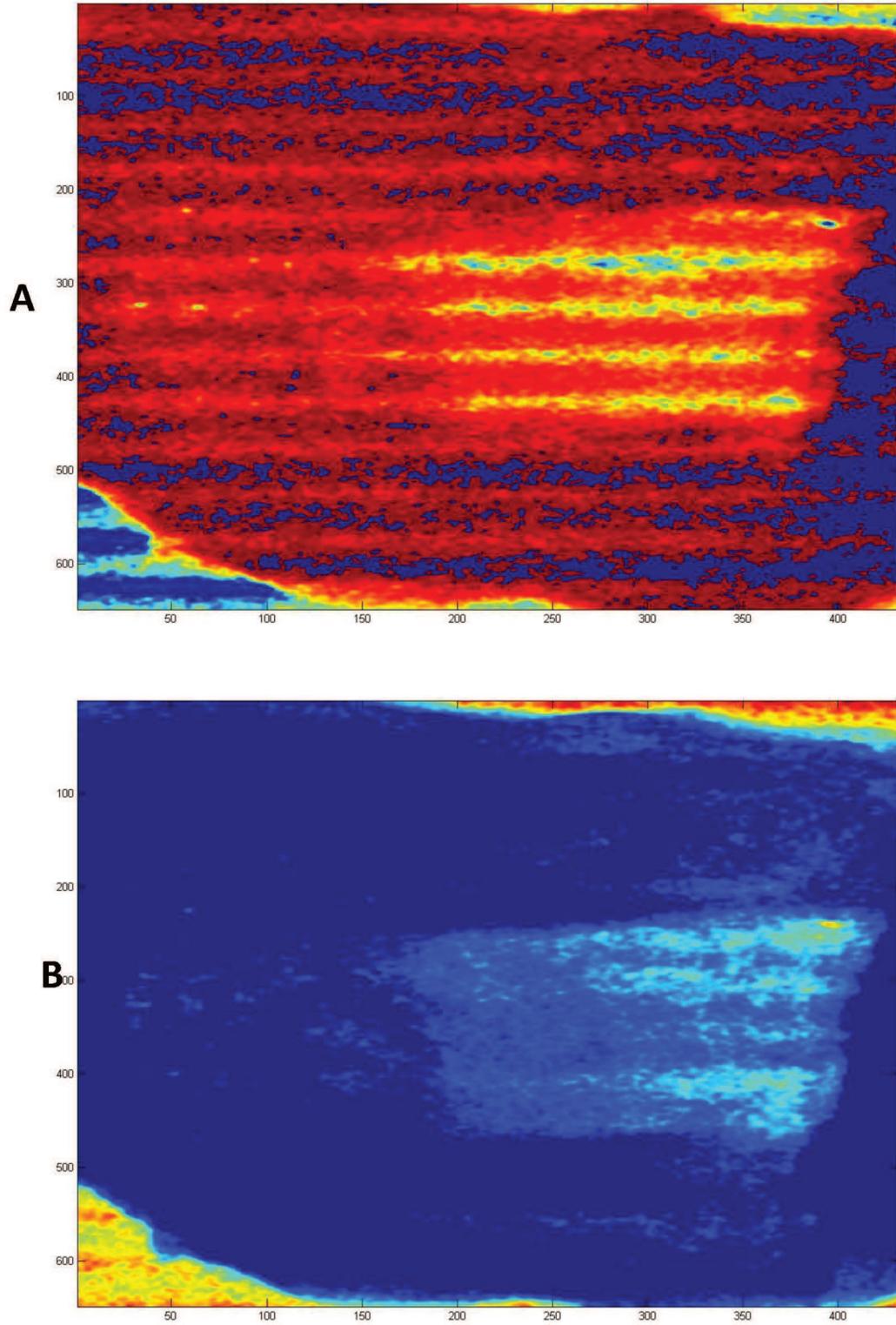


Figura 35: (A) Absorção e (B) espalhamento *phantom* desnaturado em 650 nm.

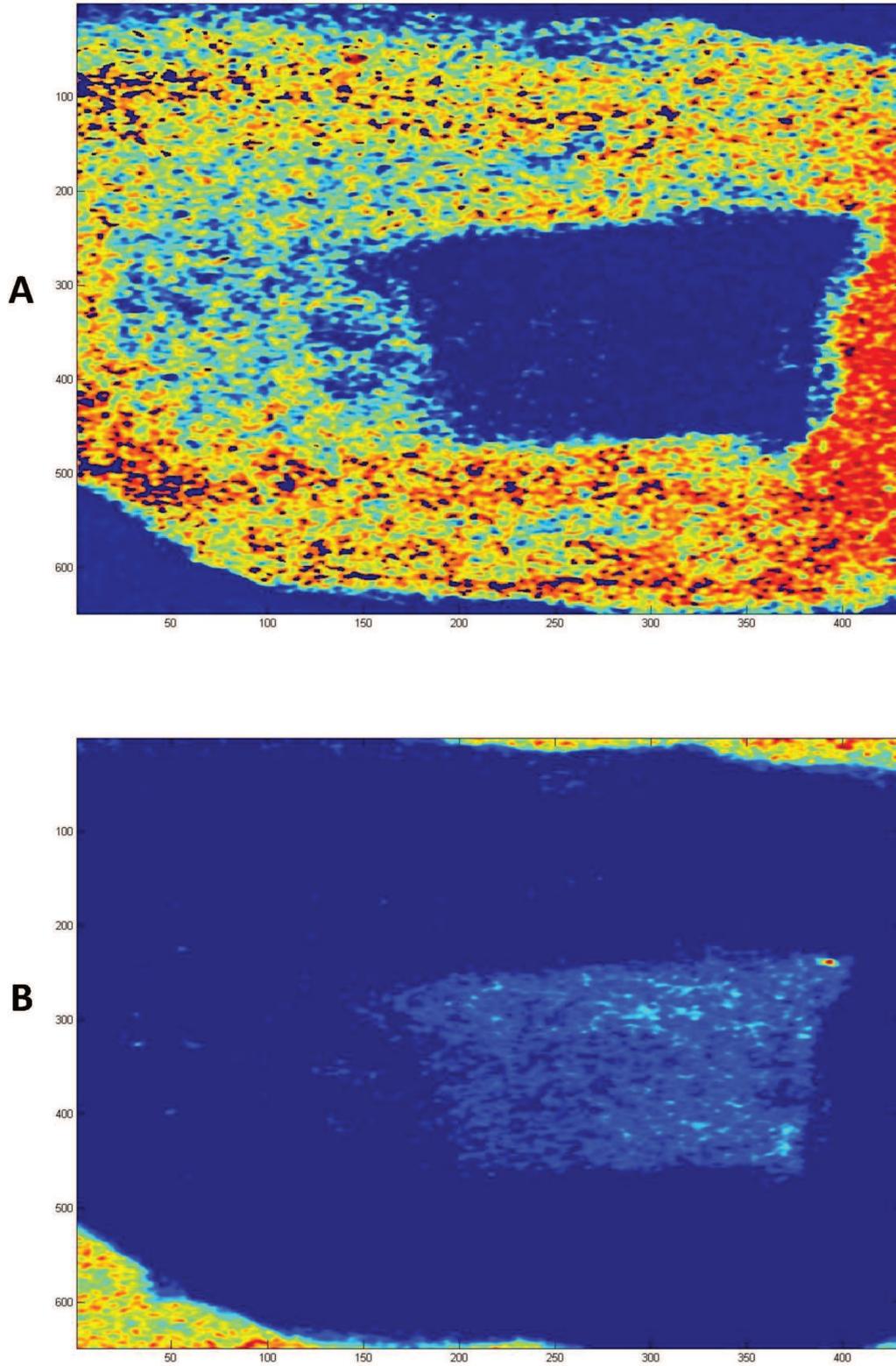


Figura 36: (A) Absorção e (B) espalhamento *phantom* desnaturado em 680 nm.

11 ANEXO V



Research Article

Vol. 57, No. 20 / 10 July 2018 / Applied Optics 5865

applied optics

Preparation and quantitative characterization of polydimethylsiloxane optical phantoms with zinc-phthalocyanine dye absorbers

A. F. G. MONTE,*  A. F. REIS,  L. B. CRUZ JUNIOR,  AND A. ANTUNES*Laboratório de Imagens Funcionais, Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG 38400-902, Brazil***Corresponding author: adamo@ufu.br**Received 19 March 2018; revised 3 May 2018; accepted 7 May 2018; posted 8 May 2018 (Doc. ID 326388); published 10 July 2018*

We described a method for the preparation of polydimethylsiloxane (PDMS) phantoms to mimic the optical properties of biologic tissues at distinct wavelengths ranging from the visible to the near-infrared spectra. The present method for fabricating solid optical tissue phantoms using zinc-phthalocyanine chromophores has demonstrated high photostability with optical absorption coefficients up to 1.0 mm^{-1} , making this phantom proper with absorption bands ranging from 600 to 850 nm. It also happens that the chromophore absorption coefficient is linear as a function of its concentration inside the previous optical window. The optical scattering properties were quantitatively selected by adding TiO_2 particle concentrations to the PDMS phantom. Thus, the quantitative optical properties of absorption and scattering for a large-batch fabrication were demonstrated, making the zinc-phthalocyanine phantoms suitable for use as a reference standard. © 2018 Optical Society of America

OCIS codes: (160.1435) Biomaterials; (160.4670) Optical materials; (170.3660) Light propagation in tissues.

<https://doi.org/10.1364/AO.57.005865>