

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

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DA IMAGEM NO DOMÍNIO DA
FREQUÊNCIA ESPACIAL PARA O ESTUDO DA PROFUNDIDADE DE
PENETRAÇÃO DA LUZ EM FANTOMAS ÓPTICOS QUE SIMULAM O
TECIDO EPITELIAL**

Ana Caroline Moreira Mendes

Uberlândia

2019

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DA IMAGEM NO DOMÍNIO DA
FREQUÊNCIA ESPACIAL PARA O ESTUDO DA PROFUNDIDADE DE
PENETRAÇÃO DA LUZ EM FANTOMA ÓPTICO QUE SIMULA O
TECIDO EPITELIAL**

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

Uberlândia, 10 de julho de 2019

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

M538a Mendes, Ana Caroline Moreira, 1988-
2019 Aplicação da técnica da imagem no domínio da frequência espacial para o estudo da profundidade de penetração da luz em fantoma óptico que simula o tecido epitelial [recurso eletrônico] / Ana Caroline Moreira Mendes. - 2019.

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://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.3009>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Física. 2. Epitélio. 3. Tomografia óptica. 4. Processamento da imagem. I. Monte, Adamo Ferreira Gomes do, 1972-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDU: 53



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Física				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado				
Data:	Dez de julho de dois mil e dezenove	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:30
Matrícula do Discente:	11722FIS002				
Nome do Discente:	Ana Caroline Moreira Mendes				
Título do Trabalho:	<i>Aplicação da técnica da imagem no domínio da frequência espacial para o estudo da profundidade de penetração da luz em fantasmas ópticos que simula o tecido epitelial</i>				
Área de concentração:	Física da Matéria Condensada				
Linha de pesquisa:	Síntese e caracterização de materiais				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	<i>Propriedades ópticas de nanopartículas de ouro em fantasmas para utilização em diagnóstico por imagem óptica por meio das técnicas de luz difusa não invasivas.</i>				

Reuniu-se no Anfiteatro B do Bloco 50, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Física, assim composta: Professores Doutores: Fabrício Macedo de Souza - INFIS/UFU; Denise Maria Zzell - IPEN/USP e Adamo Ferreira Gomes do Monte - INFIS/UFU, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Adamo Ferreira Gomes do Monte, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Adamo Ferreira Gomes do Monte, Presidente**, em 01/08/2019, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Fabrício Macedo de Souza, Professor(a) do Magistério**



Superior, em 06/08/2019, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise Maria Zezell, Usuário Externo**, em 06/08/2019, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1412822** e o código CRC **79B496B6**.

DEDICATÓRIA

Dedico à Jesus Cristo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade de ingressar no mestrado e por ter me dado forças e sabedoria para concluí-lo.

Ao meu esposo Alex que sempre foi um amigo e companheiro me compreendendo, me ajudando e sonhando comigo os meus sonhos.

Ao meu filho Eliézer que sempre foi e será a grande motivação do meu crescimento e sucesso profissional.

Aos meus pais, José Donizete e Elizabete por terem lutado por mim, desde pequena, para me dar a melhor educação e os melhores estudos.

A todos os meus parentes e amigos que sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao meu vovô Izordino Rosa Moreira (In Memoriam), que sempre lutou para que seus filhos e netos estudassem e que pela graça de Deus conseguiu me ver formar, mas infelizmente faleceu antes que eu concluísse este mestrado. A ele eu agradeço por todas as suas orações quando estava desesperada com provas e trabalhos. A ele eu agradeço por um dia ter decidido sair da roça e ir para a cidade dar uma condição melhor de estudo aos filhos.

Ao PPGFIS, programa de pós-graduação em física, por fornecer todo o suporte para a realização da minha pesquisa e a FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Ao meu orientador Adamo Ferreira Gomes do Monte por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar com ele e seu grupo de pesquisa.

RESUMO

Atualmente, uma nova técnica de processamento óptico, denominada Imagem no Domínio da Frequência Espacial ou *Spatial frequency domain imaging* (SFDI), surge como um método de diagnóstico voltado para o tratamento de doenças, lesões e tumores causados no tecido epitelial. Esta técnica caracteriza-se por ser não invasiva e inovadora, que permite quantificar valores de absorção e espalhamento reduzido em uma base pixel por pixel. Além disso, ela pode ser aplicada em meios opacos tal como em tecidos biológicos para determinar os parâmetros ópticos dependentes do comprimento de onda. O objetivo deste trabalho é desenvolver o estudo das propriedades ópticas, tais como absorção e espalhamento, além de encontrar os níveis de profundidade de penetração da luz em fantasmas que simulem o tecido biológico a partir do SFDI. Também foi utilizado outro equipamento para obtenção dos parâmetros ópticos, chamado de Esfera Integradora, a fim de comparar os dados alcançados. Para isto foram produzidos um fantoma de calibração com parâmetros ópticos conhecidos e dois fantasmas simuladores do tecido epitelial. Os cálculos dos coeficientes de absorção e espalhamento reduzido foram feitos utilizando o modelo de refletância difusa e da propagação da luz. Foram utilizados cinco filtros, cujos comprimentos de onda são $\lambda = 475 \text{ nm}$, 488 nm , 532 nm , 580 nm e 650 nm e quatro frequências espaciais $K_x = 0,07 \text{ mm}^{-1}$, $0,1 \text{ mm}^{-1}$, $0,3 \text{ mm}^{-1}$ e $0,4 \text{ mm}^{-1}$. Para estas, concluímos que a frequência de $0,1 \text{ mm}^{-1}$ tornou-se um limite para obtenção das profundidades de penetração da luz no meio, uma vez que não foi possível obtê-la para $K_x = 0,07 \text{ mm}^{-1}$. Já para as demais frequências as profundidades encontradas foram $\delta = 4,92 \text{ mm}$, $3,83 \text{ mm}$ e $2,60 \text{ mm}$, respectivamente. Além disso, $K_x = 0,1 \text{ mm}^{-1}$ é a frequência que melhor apresenta uma aplicação real no tecido epitelial, pois o feixe luminoso consegue penetrar toda a extensão do tecido. Portanto, o SFDI demonstrou-se eficaz como método de processamento de imagem e seus resultados demonstram futuras aplicações in vivo e o desenvolvimento de tomografia óptica.

Palavras-chave: Imagem no Domínio da Frequência Espacial; processamento de imagem; tomografia óptica; fantasmas; tecido epitelial.

ABSTRACT

Nowadays, a new technique of optical processing, called SFDI (*Spacial frequency domain imaging*), has emerged as a method for the diagnosis and treatment of diseases, traumas and tumors caused in the epithelial tissue. This technique is characterized by being non-invasive and innovative, that allows to quantify absorption values and reduced scattering on a pixel-by-pixel basis. In addition, this method can be applied in opaque media such as in biological tissues to determine optical wavelength dependent parameters. The objective of this work is to develop the study of optical properties, such as absorption and scattering, in addition to finding the depth levels of light penetration in phantoms that simulate the biological tissue from SFDI. Another equipment was used to obtain the optical parameters, called the integrating sphere, in order to compare the data obtained. To this it was produced a calibration phantom with known optical parameters and two simulators epithelial tissue phantoms. The calculations of the absorption and reduced scattering coefficients *was realized* using the diffuse reflectance model and propagation of light. Five filters were used, such as $\lambda = 475 \text{ nm}$, 488 nm , 532 nm , 580 nm e 650 nm , and four spatial frequencies $K_x = 0,07 \text{ mm}^{-1}$, $0,1 \text{ mm}^{-1}$, $0,3 \text{ mm}^{-1}$ e $0,4 \text{ mm}^{-1}$. For these, we conclude that the frequency of 0.1 mm^{-1} became a limit to obtain the depths of light penetration in the medium, since it was not possible to obtain it for $K_x = 0,07 \text{ mm}^{-1}$ and for the other frequencies the depths were $\delta = 4.92 \text{ mm}$, 3.83 mm and 2.60 mm , respectively. In addition, $K_x = 0.1 \text{ mm}^{-1}$ is the frequency that best presents a real application in the epithelial tissue, because the light beam is able to penetrate the entire tissue extension. Therefore, SFDI has been shown to be an effective method of image processing, and its results demonstrate future in vivo applications for developing optical tomography.

Keywords: *Spacial frequency domain imaging; image processing; optical tomography; epithelial tissue; phantoms.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.1	OBJETIVOS GERAIS.....	20
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2.1	PROPRIEDADES ÓPTICAS DE UM MEIO.....	21
2.1.1	INTERAÇÃO DA LUZ COM A MATÉRIA.....	21
2.1.2	INTERAÇÃO DA LUZ EM MEIOS TURVOS.....	30
2.2	DIAGNÓSTICO ÓPTICO.....	31
2.3	IMAGEM NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA ESPACIAL (SFDI).....	32
2.4	SFDI NA PROFUNDIDADE DO TECIDO BIOLÓGICO.....	36
2.5	ESFERA INTEGRADORA.....	40
3	MÉTODOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	42
3.1	FANTOMAS.....	42
3.2	MONTAGEM DO APARATO EXPERIMENTAL.....	49
3.2.1	ESFERA INTEGRADORA.....	49
3.2.2	APARATO EXPERIMENTAL DO SFDI.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
4.1	DETERMINAÇÃO DOS FILTROS A SEREM UTILIZADOS.....	55
4.2	UTILIZAÇÃO DO SFDI PARA AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DA IMAGEM.....	56
4.3	ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO ÓPTICO NA PROFUNDIDADE DOS FANTOMAS BIOLÓGICOS.....	62
4.3.1	NA SUPERFÍCIE DO FANTOMA.....	62
4.3.2	NA PROFUNDIDADE DO FANTOMA.....	70
5	CONCLUSÃO.....	79
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	81
7	OUTROS TRABALHOS DESENVOLVIDOS.....	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
9	ANEXO I.....	88
10	ANEXO II.....	94

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. 1: Representação da frequência espacial, medida pelos pares de linhas por milímetro (pl/mm), ou seja, pares formados por uma linha preta e outra branca.....	1
6	
Figura 1. 2: Representação do tecido epitelial e suas principais camadas. Adaptado de (HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002).....	18
Figura 2. 1: Processos de reflexão e refração de um feixe luminoso ao passar do ar para a amostra.....	22
Figura 2. 2: Espectros de absorção dos principais cromóforos presentes no tecido biológico. A região de cor rosa mostra a janela terapêutica, ou seja, a região em que os cromóforos possuem baixa absorção luminosa. Ref. (BOULNOIS, 1986).....	24
Figura 2. 3: Representação da Lei de LB, na qual um feixe de luz de intensidade lo atravessa um meio sofrendo um processo de atenuação.....	26
Figura 2. 4: Processos de espalhamento e absorção do feixe de luz ao atravessar um meio.....	27
Figura 2. 5: representação do espalhamento Rayleigh e do espalhamento Mie.....	28
Figura 2.6: Tabela de consulta, obtida a partir do modelo de difusão, para obtenção das medidas de refletância difusa $R_d(AC)$ e $R_d(DC)$ em zero. Nas linhas pontilhadas verifica-se que em $f_x = 0,0 \text{ mm}^{-1}$ temos $R_d(DC) = 0,55 \text{ mm}^{-1}$ e em $f_x = 0,5 \text{ mm}^{-1}$ temos $R_d(AC) = 0,06 \text{ mm}^{-1}$ e, conseqüentemente, $\mu_a = 0,03 \text{ mm}^{-1}$ e $\mu_s = 1,4 \text{ mm}^{-1}$. Ref.(CUCCIA et al., 2009).	
Figura 2. 7: Modelo esquemático da coleta de dados utilizando o SFDI. Ref.(CUCCIA et al., 2009).....	36

Figura 2. 8: Representação de uma fonte de iluminação modulada, com incidência sobre o eixo x, variando periodicamente. Ref. (CUCCIA et al., 2009).....	38
Figura 2. 9: Representação esquemática da distribuição da luz na esfera integradora. A luz se distribui de maneira homogênea no interior da esfera oca devido a alta reflexão sofrida.....	41
Figura 3. 1: Representação da estrutura química do Polidimetilssiloxano (PDMS), usado para produção da matriz dos fantasmas. Ref.(MOREIRA, 2013).....	42
Figura 3. 2: Espectro de absorção da ftalocianina de Zinco (ZnPc) na presença de sulfóxido de dimetilo (DMSO). Na faixa de 550 a 700 nm observa-se que existe uma banda de absorção máxima em 672 nm e uma banda fraca em 645 nm. Ref.(SHARMA et al., 2013).....	43
Figura 3. 3: Fantoma de calibração, produzido a base de PDMS, TiO ₂ e Namkim.....	45
Figura 3. 4: Fantoma produzido em laboratório para simulação de propriedades ópticas do tecido epitelial. Este apresenta um bloco maior de PDMS e finas películas de ZnPc e TiO ₂ em diferentes concentrações.....	46
Figura 3. 5: “Star Phantom” produzido em laboratório, formado por um bloco de PDMS e finas películas de ZnPc em formato de estrelas e tiras retangulares que estão identificadas pelas linhas pontilhadas em azul.....	48
Figura 3. 6: Imagem do equipamento da esfera integradora, formado por uma fibra óptica, uma fonte luminosa, o espelho, e a esfera integradora. Esta última é composta por uma câmara oca em seu interior cuja função é refletir a luz homogeneamente.....	50
Figura 3. 7: Aparato experimental do SFDI, onde (A) representa a imagem do projetor de luz (P300, AAXA Inc.), (B) a câmara CCD de 1280 x 1024 (Thorlabs Inc) e a base giratória composta por cinco filtros e (C) a montagem final do SFDI.....	52

Figura 3. 8: O aparato experimental da técnica SFDI é formado por um projetor de luz ligado ao módulo DMD que gera padrões de ondas senoidais na superfície do fantoma e uma câmera CCD que captura as imagens formadas pela refletância.....53

Figura 4. 1: Espectro de absorção dos filtros utilizados no equipamento SFDI.....55

Figura 4. 2: Interface gráfica da tela de comandos do LabView que permite a interação entre o usuário e o equipamento SFDI Ref. (BARBOSA DA CRUZ JUNIOR, 2018)57

Figura 4. 3: Imagens moduladas do “Star Phantom” obtidas a partir do LabView nas fases 0o, 120o e 240o e na frequência espacial de 0,4 mm⁻¹.....59

Figura 4. 4: Imagens moduladas do “Star Phantom” obtidas a partir do LabView nas fases 0o, 120o e 240o e na frequência espacial de 0,4 mm⁻¹.....60

Figura 4. 5: Espectro de absorção em função do comprimento de onda do fantoma formado por películas de ZnPc em diferentes concentrações.....63

Figura 4. 6: Espectro de espalhamento em função do comprimento de onda do fantoma formado por películas de ZnPc em diferentes concentrações.....63

Figura 4. 7: O gráfico mostra o comportamento da absorção do feixe de luz em função da concentração para o comprimento de onda de 650 nm, em medidas realizadas na esfera integradora no fantoma formado por películas de ZnPc em diferentes concentrações.....64

Figura 4. 8: O gráfico mostra o comportamento do espalhamento do feixe de luz em função da concentração para o comprimento de onda de 650 nm, em medidas realizadas na esfera integradora no fantoma formado por películas de ZnPc em diferentes concentrações.....65

Figura 4. 9: Mapas de cores da absorção e do espalhamento de cromóforos em um fantoma com películas de ZnPc em diferentes concentrações.....	67
Figura 4. 10: O gráfico está representando como a absorção do feixe de luz varia com a concentração, em 650 nm e frequência espacial de 0,8 mm ⁻¹ , para o fantoma com películas de ZnPc no SFDI.....	68
Figura 4. 11: O gráfico mostra a variação do espalhamento para o feixe luminoso em função da concentração, em 650 nm e frequência espacial de 0,8 mm ⁻¹ , para o fantoma com películas de ZnPc no SFDI.....	69
Figura 4. 12: Espectro de absorção do “Star Phantom” para $f_x = 0,1 \text{ mm}^{-1}$	71
Figura 4. 13: Espectro de absorção do “Star Phantom” para $f_x = 0,3 \text{ mm}^{-1}$	71
Figura 4. 14: Espectro de absorção do “Star Phantom” para (A) $f_x = 0,4 \text{ mm}^{-1}$	71
Figura 4. 15: Variação do coeficiente de absorção e da profundidade em função da frequência espacial.....	74
Figura 4. 16: Variação do coeficiente de espalhamento e da profundidade em função da frequência espacial.....	74
Figura 4. 17: O gráfico mostra o decaimento exponencial do coeficiente de absorção com o aumento da profundidade de penetração da luz.....	75
Figura 4. 18: Imagens do “Star Phantom” processadas em MATLAB no comprimento de onda de 650 nm e frequências espaciais de 0,07 mm ⁻¹ ; 0,1 mm ⁻¹ ; 0,3 mm ⁻¹ ; 0,4 mm ⁻¹	77
Figura 10. 1: Imagens do “Star Phantom” processadas em MATLAB para os comprimentos de onda de 457 a 650 nm e na frequência espacial de 0,07 mm ⁻¹	94

Figura 10. 2: Imagens do “Star Phantom” processadas em MATLAB para os comprimentos de onda de 457 a 650 nm e na frequência espacial de 0,1 mm⁻¹.....95

Figura 10. 3: Imagens do “Star Phantom” processadas em MATLAB para os comprimentos de onda de 457 a 650 nm e na frequência espacial de 0,3 mm⁻¹.....95

Figura 10. 4: Imagens do “Star Phantom” processadas em MATLAB para os comprimentos de onda de 457 a 650 nm e na frequência espacial de 0,4 mm⁻¹.....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1: Concentrações de ftalocianina de zinco e TiO₂ usados para confecção das películas de um fantoma.....47

Tabela 4. 1: Valores de μ_a e μ'_s encontrados para as diferentes frequências espaciais em 650 nm e a profundidade de penetração da luz calculada.....73

LISTA DE ABREVIATURAS

CBC - carcinoma basocelular

CEC - carcinoma espinocelular

CPNM - O câncer de pele não-melanoma

DIFF - Difusão

DMD - Digital Micromirror Device

FHD - flavina adenina dinucleotídeo

IAD - Inverse adding-doubling

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LB - Lei de Lambert- Beer

LUT - look up table

MC - Monte Carlo

NADH - adenina dinucleotídeo

NI - National Instruments

PDMS – Polidimetilssiloxano

SFDI - Imagem no Domínio da Frequência Espacial

s-MTF - spatial modulation transfer function

TiO₂ - Dióxido de Titânio

ZnPc - Zn- Phthalocyanine

1 INTRODUÇÃO

Torna-se cada vez mais frequente o uso do processamento de imagens para o diagnóstico voltado ao tratamento de tumores e doenças. Portanto, este trabalho justifica-se por utilizar uma nova técnica de processamento de imagem chamada de Imagem no domínio da frequência espacial. Esta foi denominada pela primeira vez por DÖGNITZ e WAGNIÈRES em 1998, e por Cuccia et al em 2008, como spacial frequency domain imaging (SFDI) e possibilita o diagnóstico óptico de tumores, lesões e doenças causadas no tecido epitelial.

Uma característica importante desta técnica é o uso da frequência espacial, que consiste em medidas de pares de linhas por milímetro (pl/mm). Cada par de linha por milímetro é formado por um linha preta e uma linha branca, como mostra a **Figura 1. 1** e são usadas para medir a resolução de uma imagem processada.

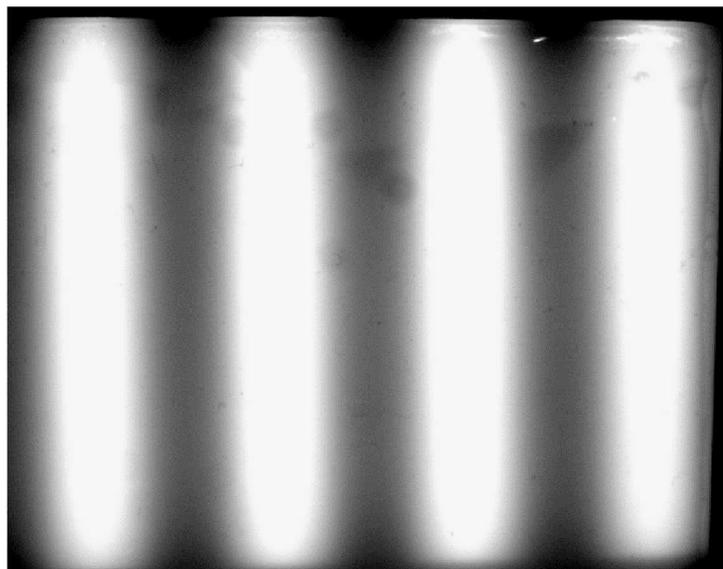


Figura 1. 1: Representação da frequência espacial, medida pelos pares de linhas por milímetro (pl/mm), ou seja, pares formados por uma linha preta e outra branca.

A resolução espacial determina o quanto as linhas estarão próximas umas das outras, sendo, portanto, capaz de distinguir detalhes e objetos presentes nas imagens.

A grande vantagem em se utilizar o SFDI como método de estudo consiste no fato dele ser um método não invasivo, de fácil acesso, baixo custo, fácil transporte e, além disso, por ele ser aplicável em tecidos biológicos, caracterizando in vivo tais sistemas (BARBOSA DA CRUZ JUNIOR, 2018). Outra vantagem deste estudo está no fato de investigar a aplicação do SFDI na profundidade do tecido epitelial, a fim de se fazer tomografia óptica (MONTE et al., 2018).

Este trabalho também pretende contribuir com outros estudos já realizados, como por exemplo, o trabalho descrito por Cuccia et al sobre o SFDI e que tem sido utilizado para observar alterações nos cromóforos teciduais, como oxi / deoxi-hemoglobina, água, melanina e parâmetros estruturais como o espectro do μ_s' (coeficiente de espalhamento reduzido) para uma variedade de tecidos. Além de outros trabalhos, como o de Tabassum et al, publicado em 2016, que propõe que o SFDI pode ser utilizado para a investigação pré-clínica de terapias contra o câncer.

O tecido epitelial corresponde a um conjunto de células que tem a função de revestir a superfície do corpo, protegendo-a (ROSS; PAWLINA, 2012). Ao mesmo tempo que apresenta a função de proteção, ele também está constantemente exposto a ação de agentes externos, como fungos e bactérias que podem provocar várias doenças de pele, como Psoríase, Dermatite atópica, Granulosaroid (linfoma de célula T cutâneo) e vitiligo (DE ANDRADE et al., 2010).

A pele ou tecido epitelial é constituído por uma camada superior chamada epiderme e por outra inferior denominada derme. A epiderme compreende uma porção epitelial de origem ectodérmica e a derme uma porção conjuntiva de origem mesodérmica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Na **Figura 1. 2** está representado o tecido epitelial e suas principais camadas.

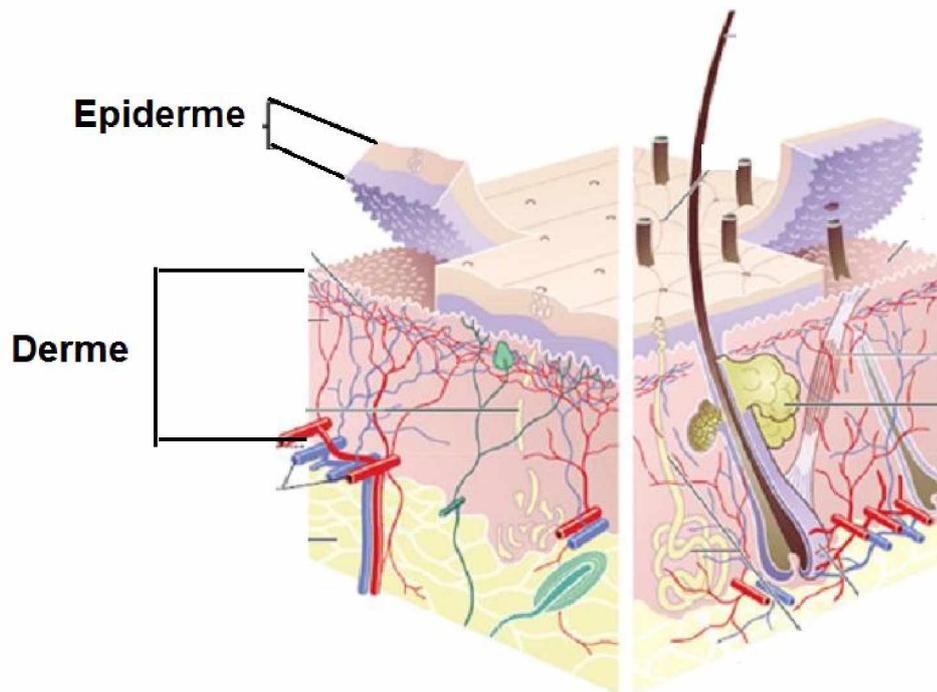


Figura 1. 2: Representação do tecido epitelial e suas principais camadas. Adaptado de (HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002).

Na **Figura 1. 2**, o tecido epitelial apresenta uma espessura que varia de 0,5 a 4,0 mm (SAMPAIO; CASTRO; RIVITTI, 1981), sendo que a epiderme possui de 0,07 a 0,12 mm de espessura (SILVER; FREEMAN; DEVORE, 2001) e a derme 2,0 mm, aproximadamente (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

O câncer de pele não-melanoma (CPNM) é o tipo de carcinoma que acomete com mais frequência a população brasileira, segundo dados do INCA (“TIPOS DE CÂNCER | INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER”, 2018). Nele as células ao sofrerem divisões, organizam-se em camadas dando origem a diferentes tipos de câncer de acordo com a camada atingida. Os tipos de CPNM mais encontrados são o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC) (DERGHAM, 2002).

O tratamento de um CPNM pode ser através de uma cirurgia ou não, mas para isso é importante que o médico conheça a área que deverá ser tratada e a profundidade da região lesionada, a fim de decidir qual procedimento deverá ser adotado.

Assim, o SFDI surge como um método capaz de diagnosticar lesões e infecções no tecido epitelial e também realizar o diagnóstico precoce do CPNM, dispensando a biópsia e possibilitando ao médico decidir qual será a melhor forma de tratamento adotada. Por outro lado, esta técnica também pode ser utilizada para monitorar a evolução do tratamento no paciente, apresentando aplicações no pré e no pós-operatório. Este trabalho pretende, portanto, realizar o estudo do grau de profundidade de penetração da luz no tecido epitelial, para verificar até em qual camada do tecido ele pode ser útil como um método de diagnóstico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVOS GERAIS

Levando-se em consideração a grande busca por novos métodos de processamento de imagens, principalmente na área biomédica, este trabalho tem como objetivo geral, desenvolver a partir de uma técnica não invasiva e que não utiliza radiação ionizante, como o SFDI, o estudo das propriedades ópticas (absorção e espalhamento) em meios que simulam o tecido epitelial.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Ao utilizarmos como meio de fundo os fantasmas de silicone que simulam o tecido epitelial, o objetivo específico deste projeto consiste na obtenção de mapas de absorção e espalhamento óptico em diferentes profundidades deste tecido. Para isso é necessário estudar e determinar as frequências espaciais a serem utilizadas para a obtenção das imagens no SFDI, pois através delas obtemos os coeficientes de absorção e espalhamento óptico que nos informam os níveis de profundidade de penetração da luz no meio. Além disso, também é de suma importância a determinação correta dos comprimentos de onda dos filtros a serem usados, pois estes devem estar presentes na região que compreende a janela terapêutica, para que aconteça a iluminação adequada com recorrente absorção e espalhamento da luz.

2 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

2.1 PROPRIEDADES ÓPTICAS DE UM MEIO

Quando a radiação eletromagnética, em especial a luz visível, interage com a matéria temos alguns processos importantes que ocorrem neste meio, os quais são: absorção, espalhamento e reflexão. Tais acontecimentos caracterizam as propriedades ópticas da matéria e que, portanto, serão alvo de discussão neste capítulo.

Através das propriedades ópticas, como absorção e espalhamento, é possível obter o diagnóstico de cânceres, tumores e doenças causadas no tecido (WANG; WU, 2007). Para tanto, a importância em utilizar-se fantasmas como objeto de estudo neste trabalho, consiste no fato deles serem de grande proveito para o estudo da propagação da luz, uma vez que apresentam propriedades ópticas similares ao tecido epitelial (BARBOSA DA CRUZ JUNIOR, 2018).

2.1.1 INTERAÇÃO DA LUZ COM A MATÉRIA

No processo de interação da luz com a matéria, podendo esta ser transparente, opaca ou turva, uma parcela da luz que incide no meio é refletida e outra é transmitida, além de ocorrer a reflexão parcial dessa intensidade luminosa. Além disso, o feixe de luz incidente, quando é transmitido, sofre uma atenuação em função dos processos de absorção e espalhamento que ocorreram no meio. Neste contexto, o comprimento de onda é fundamental para definir se um meio é transparente ou opaco, pois ele pode ser transparente em um determinado comprimento de onda, mas opaco em outro. Além disso, o comprimento de onda também é importante para determinar o quanto de luz será absorvida ou atenuada em um meio turvo (NIEMZ, 2004). Em meio transparente, como o vidro, praticamente não ocorre atenuação da luz. Há apenas um processo de refração, onde ocorre um desvio de uma parte da luz que o atravessa devido a variação de sua velocidade, que é provocada na mudança de um meio para outro. No meio opaco, como o carvão, a intensidade da luz que atravessa o meio é quase toda absorvida e, portanto, é praticamente nula a luz transmitida. Em meios

turvos, como o tecido biológico e que neste trabalho será abordado o tecido epitelial, a atenuação da luz ocorre devido aos processos de absorção e espalhamento. Os diversos espalhamentos da luz ocorrem devido a presença de elementos microscópicos e a absorção devido aos cromóforos que absorvem luz a um determinado comprimento de onda. De acordo com o local e a quantidade de luz absorvida no tecido, poderemos ter resultados bons ou ruins, pois tudo depende da resposta biológica para determinado estímulo, uma vez que se não há absorção da luz, então não haverá resposta (GROSSWEINER, 2005).

2.1.1.1 REFRAÇÃO

O processo de refração da luz ocorre quando esta sofre uma variação em sua velocidade ao atravessar de um meio para outro. Opticamente, cada material é caracterizado pelo seu índice de refração, pois ele é responsável por descrever a propagação da luz na região. Os meios homogêneos são descritos pela Lei de Snell, enquanto meios heterogêneos por não apresentarem a velocidade de propagação da luz constante possuem refração contínua. A **Figura 2. 1** representa o processo de refração sofrido por um feixe luminoso quando este atravessa um meio:

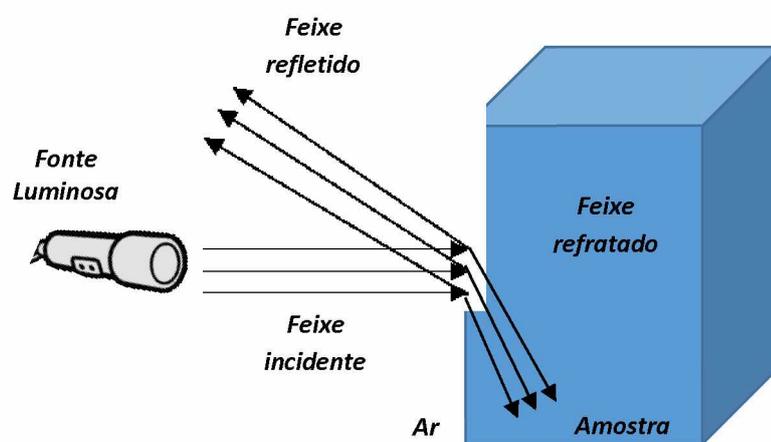


Figura 2. 1: Processos de reflexão e refração de um feixe luminoso ao passar do ar para a amostra.

Embora fantasmas são considerados meios homogêneos, temos que aqueles que simulam o tecido biológico (meio opaco) são meios heterogêneos e, portanto, cada componente presente na região apresenta um índice de refração diferente. Devido à dificuldade em se obter tais índices de refração a opção é fazer uma média ponderada em volume dos elementos presentes naquele meio, obtendo assim o índice de refração relativo. A água, cujo índice de refração é $n = 1.33$, por ser o elemento mais abundante nos tecidos torna-se o padrão de referência, uma vez que suas propriedades ópticas são estudadas em diversos compostos (TSUCHIKAWA & TSUTSUMI, 1999). Portanto, neste trabalho, uma vez que o nosso objeto de estudo são fantasmas que simulam o tecido epitelial, o índice de refração não será nosso tópico de estudo.

2.1.1.2 ABSORÇÃO

Através da técnica SFDI, podemos obter os parâmetros de espalhamento e absorção óptica a partir de medidas realizadas com várias separações, diferentes, entre o detector e a fonte (BARBOSA DA CRUZ JUNIOR, 2018). Nela, padrões espaciais de luz são emitidos sobre um meio, no qual ocorrem os processos de absorção, espalhamento e reflexão da luz.

A onda eletromagnética é composta por campos elétricos e magnéticos e transporta a energia proveniente desses campos. Estes campos, ao atravessarem um meio, interagem com as cargas no interior da matéria. Parte dessa energia é então transferida para as cargas e convertida para o meio em forma de calor, deslocamento de cargas e outros. Além disso, ela também pode ser reemitida para o meio externo em forma de luz (fotoluminescência). Portanto, a absorção é o fenômeno no qual parte da energia da radiação permanece no meio, sem ser transmitida (SOKOLIK, 2005).

Quando fótons incidem em um meio e são absorvidos em energias específicas, as moléculas ou átomos do sistema interagem com uma onda eletromagnética passando a oscilar com a mesma frequência. Ocorre, então, a amplificação das vibrações, pois um elétron de ligação da molécula é excitado para um estado (eletrônico, vibracional ou rotacional) superior. O coeficiente de absorção, por sua vez,

é responsável pela caracterização de materiais devido a dissipação de energia que ocorre das colisões entre tais moléculas (BOHREN, CRAIG F. , HUFFMAN, 1998).

Os cromóforos são grupos de átomos ou moléculas responsáveis por absorver a luz no tecido biológico (GROSSWEINER, 2005). A região dentro do espectro eletromagnético, entre o vermelho e IV próximo que compreende os comprimentos de onda de 600 a 1200 nm é chamada de janela terapêutica e está representada na **Figura 2. 2**.

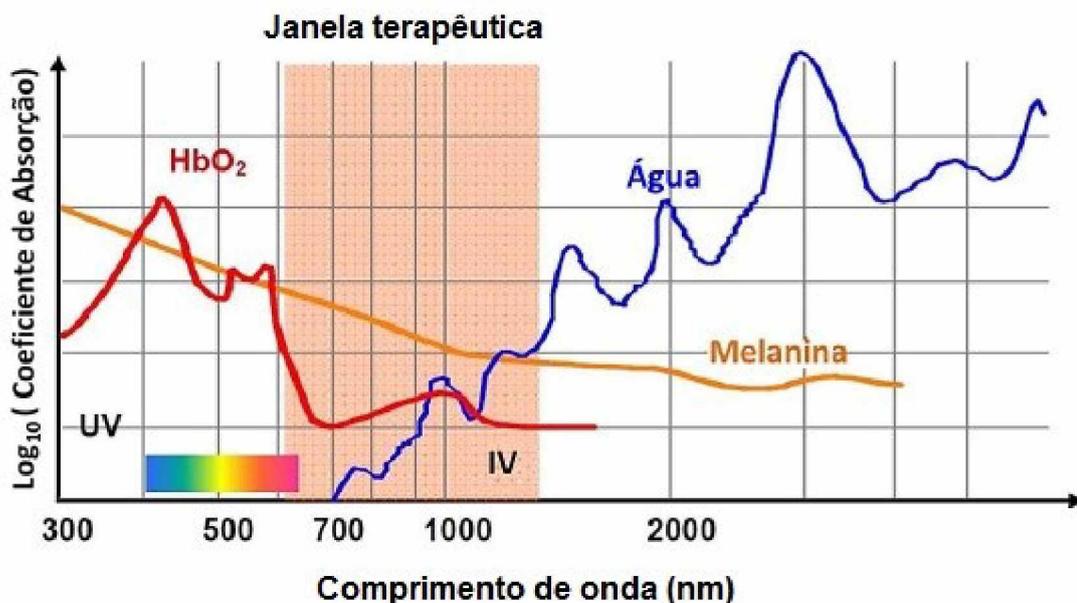


Figura 2. 2: Espectros de absorção dos principais cromóforos presentes no tecido biológico. A região de cor rosa mostra a janela terapêutica, ou seja, a região em que os cromóforos possuem baixa absorção luminosa. Ref. (BOULNOIS, 1986).

Na janela terapêutica representada na **Figura 2. 2**, os cromóforos presentes no tecido absorvem pouca luz, o que ocasiona pouca perda de energia e, portanto, permite o tratamento, de regiões mais profundas, por radiações presentes na janela terapêutica (NIEMZ, 2004).

Em mecânica quântica, durante o processo de transição de níveis de energia, ou seja, quando um elétron passa de um estado de menor energia para um estado de maior energia ocorre a absorção de um fóton cuja energia é dada pela **Equação 2.1**:

$$\Delta E = h\nu \quad (2.1)$$

em que ΔE corresponde a diferença de energia entre os estados, h é a constante de Planck dada por $6,62607004 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg/s}$ e a frequência de emissão do fóton é dada por ν (BARBOSA DA CRUZ JUNIOR, 2018).

O coeficiente de absorção μ_a é definido como a probabilidade de um meio absorver um fóton de luz e, portanto, está relacionado com a secção de choque (σ_a), que é definida pela área que determina a probabilidade de que haja colisão entre dois feixes de partículas e é dada pela **Equação 2.2** (NORTON; VO-DINH, 2003).

$$\sigma_a = \frac{P_a}{I_0} \frac{[w]}{[w/cm^2]} \quad (2.2)$$

em que σ_a é dado em cm^2 , a potência da luz absorvida pelo meio (P_a) é dada em W (watts) e a intensidade da luz incidente de uma onda plana uniforme (I_0) em W/cm^2 .

Quando a luz se propaga em um meio com um único absorvedor, ela sofre uma atenuação em sua intensidade devido as partículas presentes na região. A distância média percorrida por um fóton antes dele ser absorvido (L_a) é denominado livre caminho médio e definido pela **Equação 2.3** (NORTON; VO-DINH, 2003):

$$L_a = \frac{1}{\mu_a} \quad (2.3)$$

em que μ_a é denominado coeficiente de absorção.

A luz ao se propagar em um meio por uma distância dL sofre uma variação em sua intensidade dI , cuja atenuação é dada pela **Equação 2.4**:

$$\frac{dI}{dL} = -\mu_a I_0 \quad (2.4)$$

em que I é a intensidade luminosa transmitida (NORTON; VO-DINH, 2003).

Na **Equação 2.4** o sinal negativo indica um decaimento da intensidade I em função do aumento da espessura L . Este decaimento é representado pela Lei de Lambert- Beer (LB) como mostra a **Figura 2. 3**:

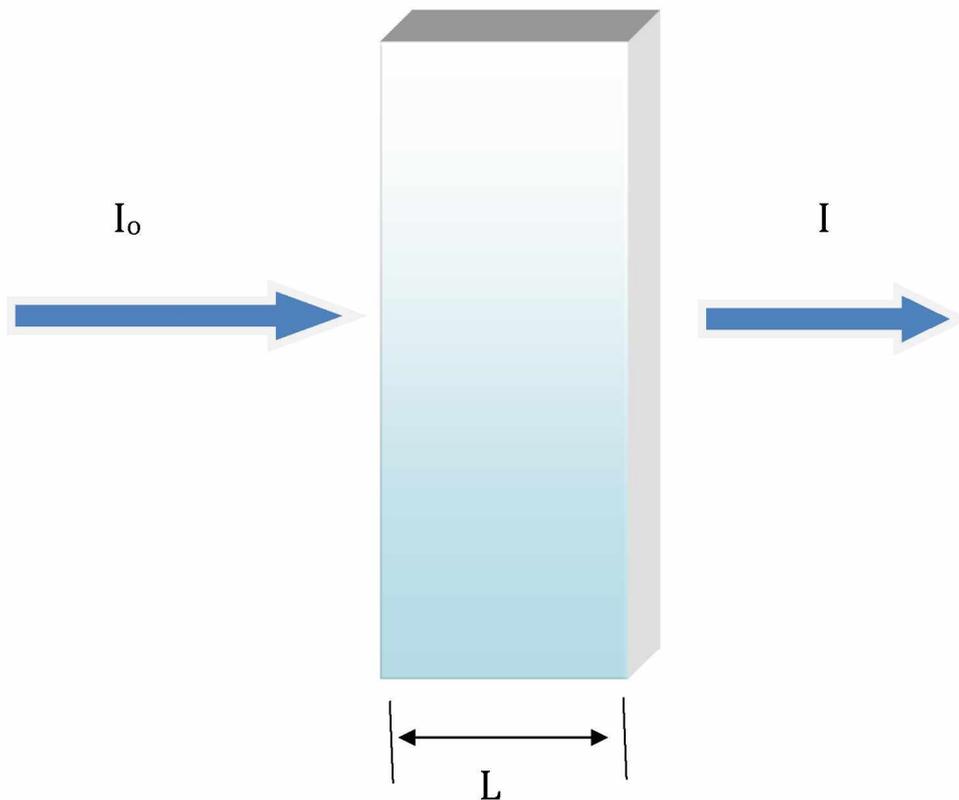


Figura 2. 3: Representação da Lei de LB, na qual um feixe de luz de intensidade I_0 atravessa um meio sofrendo um processo de atenuação.

Integrando a **Equação 2.4** obtemos a **Equação 2.5** que define a Lei de Lambert- Beer:

$$I = I_0 e^{-\mu_a L} \quad (2.5)$$

em que I_0 é a intensidade inicial do feixe e I é a intensidade do feixe após atravessar um material com coeficiente de absorção μ_a e espessura L .

2.1.1.3 ESPALHAMENTO

Ao incidir na amostra, a onda eletromagnética também pode sofrer espalhamento. Neste fenômeno, ao contrário do processo de absorção, não ocorre a remoção da energia do campo de radiação, mas o seu redirecionamento, ou seja, seria como dizer que a energia de radiação é absorvida e em seguida é reemitida (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

A **Figura 2. 4** representa os processos de absorção e espalhamento sofridos por um feixe de luz quando este atravessa um meio que contém núcleos absorvedores e espalhadores.

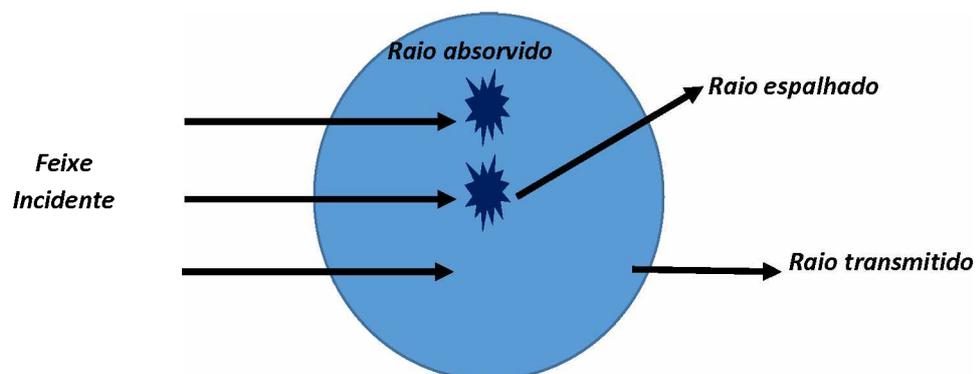


Figura 2. 4: Processos de espalhamento e absorção do feixe de luz ao atravessar um meio.

Na **Figura 2. 4**, tanto no processo de absorção quanto no de espalhamento ocorre a diminuição da intensidade luminosa (SOKOLIK, 2005).

Quando um feixe luminoso atravessa um meio, havendo inhomogeneidades no material, a luz será espalhada interferindo no seu processo de absorção. Portanto, cada partícula que compõe o próprio meio deve agir como centro espalhador, quebrando a homogeneidade do espaço vazio (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

Do ponto de vista mecânico, o espalhamento pode ocorrer de forma elástica e inelástica. No espalhamento inelástico, a radiação espalhada adquire um comprimento de onda diferente do original. No entanto, para o espalhamento elástico, o comprimento de onda da radiação espalhada não se modifica. Neste trabalho será estudado o espalhamento da radiação para o caso elástico. No tecido biológico existem dois tipos de espalhamento elástico, o espalhamento Rayleigh e o espalhamento Mie. No **espalhamento Rayleigh**, segundo Lord Rayleigh, em 1871, os elétrons da partícula espalhadora sofrem uma vibração provocada pelo campo elétrico oscilante da onda eletromagnética e irradiam luz com comprimento de onda igual ao da onda incidente, pois o tamanho das partículas espalhadoras é bem menor que o comprimento de onda da luz incidente. Além disso, o espalhamento Rayleigh é considerado isotrópico, pois independente da direção tomada, o meio continuará apresentando as mesmas propriedades físicas. No **espalhamento Mie**, o tamanho dos centros espalhadores é da mesma ordem que o comprimento de onda da luz incidente e o espalhamento ocorre de preferência na direção de propagação (GROSSWEINER, 2005).

A **Figura 2. 5** mostra de maneira esquemática os espalhamentos Rayleigh e Mie:

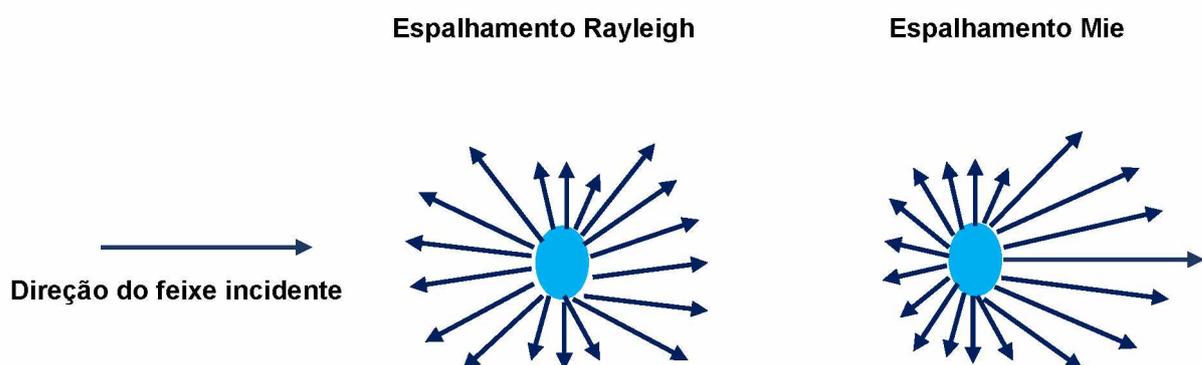


Figura 2. 5: representação do espalhamento Rayleigh e do espalhamento Mie.

Como demonstrado na **Figura 2. 5**, os fatores que diferenciam o espalhamento Mie do espalhamento Rayleigh são, portanto, a direção de espalhamento e a proporcionalidade em relação a luz espalhada, sendo que o espalhamento Rayleigh é proporcional a λ^{-4} e o espalhamento Mie a λ^{-x} sendo $0,4 \leq x \leq 0,5$ (NIEMZ, 2004).

Podemos definir a secção de choque de espalhamento pela **Equação 2.6** (NORTON; VO-DINH, 2003):

$$\sigma_s(\hat{\Omega}) = \frac{P_s}{I_o} \quad (2.6)$$

em que P_s é a potência espalhada, I_o é a intensidade da onda incidente e $\hat{\Omega}$ é a direção em que a onda incidente se propaga em relação ao espalhador.

O coeficiente de espalhamento é dado pela **Equação 2.7** como um somatório da secção de choque individual (σ_s) e da densidade das partículas espalhadoras [ρ_s^i] (NORTON; VO-DINH, 2003):

$$\mu_s = \sum_{i=0}^m \rho_s^i \sigma_s^i \quad (2.7)$$

Para que a equação de difusão seja válida é necessário que o meio onde ocorre o deslocamento de fótons, devido ao espalhamento, seja isotrópico. No entanto, após uma colisão, cada partícula presente no meio possui uma probabilidade de emissão de fótons em determinado ângulo de espalhamento, caracterizando um meio anisotrópico. Assim, deve-se fazer uma conversão do meio anisotrópico para isotrópico através de um parâmetro de anisotropia g para obter-se o coeficiente de espalhamento reduzido, que é dado pela **Equação 2.8** (NORTON; VO-DINH, 2003):

$$\mu_s' = (1 - g) \mu_s \quad (2.8)$$

Teremos um caso particular de um meio isotrópico quando $\mu_s' = \mu_s$, ou seja, para $g = 0$ (NORTON; VO-DINH, 2003). Porém, se $g = 1$ o espalhamento irá ocorrer de preferência na direção frontal, se $g = -1$ ocorre o retroespalhamento e g entre 0,7 e 0,99 é predominantemente de tecidos biológicos (NIEMZ, 2004).

2.1.2 INTERAÇÃO DA LUZ EM MEIOS TURVOS

A maioria dos tecidos biológicos, cujos cromóforos absorvem luz em comprimentos de onda que estejam dentro da janela terapêutica, são meios turvos. Neles ocorrem tanto absorção quanto o espalhamento da luz. A soma dos coeficientes de absorção e espalhamento é chamada de coeficiente de atenuação representada pela **Equação 2.9**:

$$\mu = \mu_a + \mu_s \quad (2.9)$$

A lei de LB possibilita a determinação da intensidade ou energia da onda eletromagnética após atravessar um meio, conhecendo-se os efeitos da atenuação. A intensidade de atenuação dI de um feixe de luz, após ele atravessar uma superfície de espessuras dL é dada pela **Equação 2.10** (JACINTO, C ; CATUNDA, T. ; JAQUE, D ; SOLÉ, 2005):

$$dI = -\mu I_0 dL \quad (2.10)$$

Portanto, integrando a **Equação 2.10**, obtém-se o coeficiente de atenuação do material que é dado a partir da **Equação 2.11** (JACINTO, C ; CATUNDA, T. ; JAQUE, D ; SOLÉ, 2005):

$$I = I_0 e^{-\mu L} \quad (2.11)$$

em que I_0 é a intensidade inicial do feixe de luz, I é a intensidade do feixe após atravessar um meio de espessura L e que mantém a mesma direção e energia do fóton e μ é o coeficiente de atenuação.

Os coeficientes de atenuação e espalhamento reduzidos, μ' e μ_s' , também são utilizados, onde $\mu' = \mu_a + \mu_s'$ e $\mu_s' = \mu_s (1 - g)$ (NIEMZ, 2004). O coeficiente de espalhamento reduzido mostra o número de fótons que foram espalhados e desviados da sua direção de propagação inicial.

Em meios turvos, devido aos inúmeros espalhamentos, a luz do meio torna-se difusa devido a desorientação sofrida pelo feixe de incidência e o primeiro espalhamento e, portanto, a direção dos fótons é de fato isotrópica, ou seja, eles apresentam direção independente e diferenciada após alguns espalhamentos (GROSSWEINER, 2005).

2.2 DIAGNÓSTICO ÓPTICO

O uso de técnicas ópticas, para o mapeamento e diagnóstico de tumores e doenças infecciosas causadas na pele, tem sido cada vez mais frequentes, pois são de baixo custo, são métodos não invasivos e realizados em tempo real. Além disso, com o emprego de técnicas ópticas, na maioria das vezes, não há a necessidade de remover fragmentos teciduais para realização de biópsia (BIGIO; MOURANT, 1997).

Quando a luz penetra o tecido epitelial, ela interage com os cromóforos presentes no meio. Os cromóforos são classificados como fluoróforos, absorvedores e espalhadores. Os fluoróforos ao absorverem a luz transformam-nas em fluorescência, tais como os aminoácidos aromáticos (triptofano e tiroxina), colágeno, elastina, porfirinas, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e adenina dinucleotídeo (NADH). Os absorvedores são aqueles que absorvem a luz e não a converte em fluorescência, assim como a água, a hemoglobina e a melanina. Já os espalhadores mantêm a energia conservada dos fótons incidentes, porém provocam o redirecionamento deles (KOLLIAS et al., 1998).

Assim, o conhecimento estrutural/ morfológico do tecido pode ser obtido a partir das propriedades de espalhamento. Por outro lado, o conhecimento bioquímico dá-se a partir da absorção, fluorescência e espalhamento Raman (BIGIO; MOURANT, 1997).

Neste trabalho, será descrito a seguir a técnica da imagem no domínio da frequência espacial (SFDI) que será o nosso método de estudo aplicado no tecido epitelial para realização de diagnóstico óptico.

2.3 IMAGEM NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA ESPACIAL (SFDI)

O SFDI (spacial frequency domain imaging) é uma técnica óptica usada para o rastreamento e mapeamento de tumores e infecções na pele. É uma técnica inovadora e não invasiva que permite quantificar valores de absorção e espalhamento reduzido em uma base pixel por pixel (MONTE et al., 2018).

Os coeficientes de absorção μ_a e espalhamento reduzido μ_s' são estabelecidos a partir da espectroscopia por migração de fótons de múltiplas distâncias (DÖGNITZ; WAGNIÈRES, 1998). Nela, as propriedades ópticas são obtidas em um comprimento de onda específico através da modulação espacial da luz em um fantoma opticamente difuso usado como referência. Uma câmera megapixel, então, é usada para capturar uma imagem obtida como resultado da refletância em função da frequência espacial senoidal, codificada pela iluminação projetada na região de interesse. Portanto, o SFDI pode ser aplicado em meios opacos, tal como em tecidos biológicos, para determinar os coeficientes de absorção μ_a e espalhamento reduzido μ_s' dependentes do comprimento de onda (MONTE et al., 2018).

A equação que determina o padrão de oscilação espacial em uma única dimensão para iluminar a amostra é dado pela **Equação 2.12** (CUCCIA et al., 2009):

$$I_{IN} = \frac{I_0}{2} [1 + M_0 \cos(2\pi f_x x + \alpha)] \quad (2.12)$$

em que I_0 é a intensidade da fonte de iluminação, M_0 a profundidade de modulação, f_x a frequência espacial e α a fase espacial.

Já a intensidade do padrão de refletância é dada pela soma das refletâncias espacialmente moduladas (AC) e planares (DC), de acordo com a **Equação 2.13** (CUCCIA et al., 2009):

$$I_{out} = I_{AC} + I_{DC} \quad (2.13)$$

Seja,

$$I_{AC} = M_{AC}(x) \cos(2\pi f_x + \alpha) \quad (2.14)$$

Portanto a intensidade do padrão de refletância é dada pela **equação 2.15** (CUCCIA et al., 2009):

$$I_{OUT} = M_{AC}(x) \cos(2\pi f_x + \alpha) + I_{DC} \quad (2.15)$$

A função que transforma, a uma dada frequência f_x , a amplitude de onda estacionária de densidade de fótons que sofre reflexão é chamada de função envelope $M_{AC}(X_i)$. Utilizando uma câmera 2-D é possível obter, simultaneamente, uma amostragem espacial de milhões de valores de refletância. Isto é possível, pois a câmera permite montar diversas curvas M_{AC} paralelamente a cada linha y de pixels.

A função M_{AC} pode ser obtida ao iluminarmos o meio em diferentes fases (0° , 120° e 240°) com a mesma frequência senoidal. Assim, obtemos esta função algebricamente, a partir de cada localização espacial x_i , de acordo com a **Equação 2.16** (CUCCIA et al., 2009):

$$M_{AC}(x_i, f_x) = \frac{\sqrt{2}}{3} \sqrt{[I_1(x_i) - I_2(x_i)]^2 + [I_2(x_i) - I_3(x_i)]^2 + [I_3(x_i) - I_1(x_i)]^2} \quad (2.16)$$

em que I_1 , I_2 e I_3 são os valores de I_{AC} correspondentes a cada uma das diferenças de fase para cada localização. Este procedimento torna-se bastante benéfico ao eliminar possíveis erros de calibração espacial, uma vez que remove das três imagens elementos como ruídos, luz ambiente e iluminação uniforme.

Utilizando $f_x = 0$, podemos repetir o mesmo procedimento anterior, mostrando que não há diferença de fase entre as intensidades de refletância, para encontrar a variação espacial não modulada DC, dada pela **Equação 2.17** (CUCCIA et al., 2009):

$$M_{DC} = \frac{1}{3} [I_1(x_i) + I_2(x_i) + I_3(x_i)] \quad (2.17)$$

A função M_{AC} também pode ser encontrada no domínio da frequência espacial, como um produto da intensidade de iluminação da fonte (I_0), da função de modulação do sistema óptico de iluminação e imagem (MTF_{sistema}) e pela real reflexão sofrida pelo meio turvo, R_d , de acordo com a **Equação 2.18** (CUCCIA et al., 2009):

$$M_{AC}(x_i, f_x) = I_0 \cdot MTF_{\text{sistema}}(x_i, f_x) \cdot R_d(x_i, f_x) \quad (2.18)$$

Podemos encontrar uma função $M_{AC,ref}(x, f_x)$ ao realizarmos medidas de referência em um fantoma com propriedades ópticas conhecidas, para calibrar tanto a intensidade absoluta da fonte quanto para o MTF do sistema de imagem. Assim, temos que a refletância difusa em cada localização espacial é dada pela **Equação 2.19** (CUCCIA et al., 2009):

$$R_d(x_i, f_x) = \frac{M_{AC}(x_i, f_x)}{M_{AC,ref}(x_i, f_x)} \cdot R_{d,ref}(f_x) \quad (2.19)$$

O grande benefício ao realizar esta calibração em medidas da SFD sobre outras medições espaciais, consiste em eliminar os ruídos ao evitar a desconvolução no domínio espacial real do sistema PSF.

Para separar o μ_a do μ_s usando duas frequências espaciais é importante criar uma tabela de consulta (Lookup table) como mostra a **Figura 2. 6**.

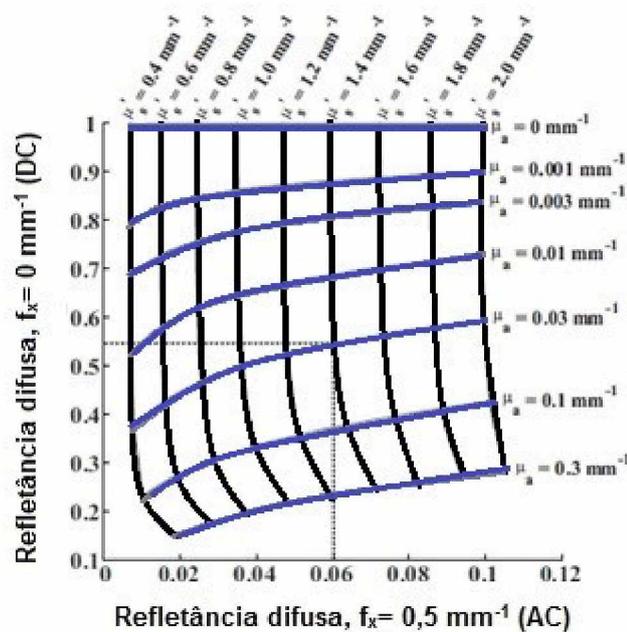


Figura 2. 6: Tabela de consulta, obtida a partir do modelo de difusão, para obtenção das medidas de refletância difusa R_d (AC) e R_d (DC) em zero. Nas linhas pontilhadas verifica-se que em $f_x = 0,0 \text{ mm}^{-1}$ temos R_d (DC) = $0,55 \text{ mm}^{-1}$ e em $f_x = 0,5 \text{ mm}^{-1}$ temos R_d (AC) = $0,06 \text{ mm}^{-1}$ e, conseqüentemente, $\mu_a = 0,03 \text{ mm}^{-1}$ e $\mu_s = 1,4 \text{ mm}^{-1}$. Ref.(CUCCIA et al., 2009).

Na **Figura 2. 6**, as linhas em tom de azul correspondem a constante de absorção e as linhas em preto a constante de espalhamento. Além disso, temos que R_d (AC) e R_d (DC) são as medidas de refletância difusa modulada com frequência espacial f_x diferente de zero e não modulada com f_x igual a zero, respectivamente.

Finalmente, a **Figura 2. 7** apresenta um esquema do processamento de dados que são obtidos através do SFDI.

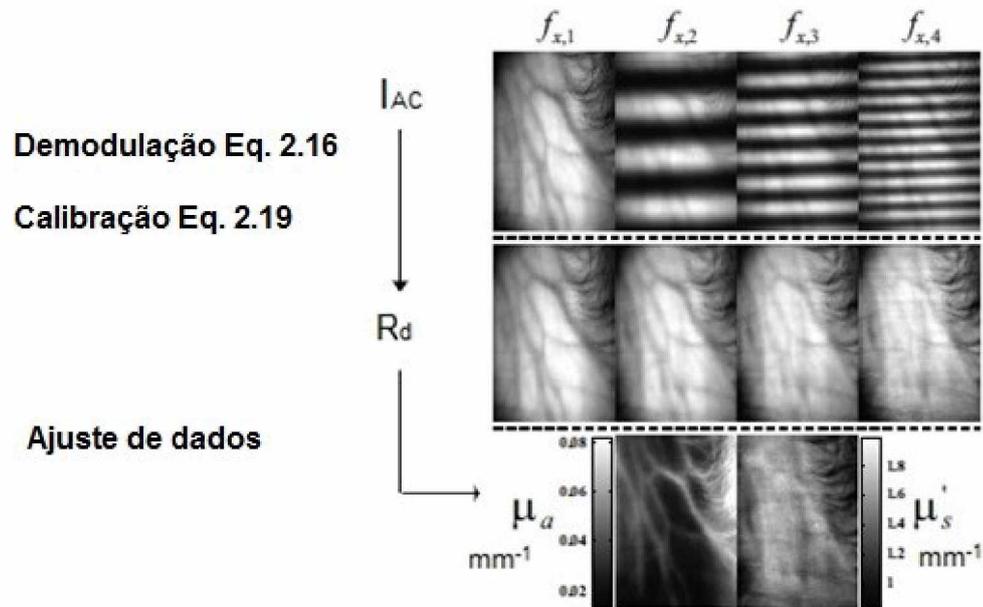


Figura 2. 7: Modelo esquemático da coleta de dados utilizando o SFDI. Ref.(CUCCIA et al., 2009).

A **Figura 2. 7** mostra os dados de intensidade por frequência que foram obtidos no SFDI. Foram utilizadas as **Equações 2.18 e 2.21** para realizar a demodulação e a calibração, respectivamente (CUCCIA et al., 2009).

2.4 SFDI NA PROFUNDIDADE DO TECIDO BIOLÓGICO

Para definirmos a profundidade de penetração da luz em meios turvos (tecido biológico) é importante introduzirmos o conceito de equação de difusão, uma vez que temos como alvo obter as propriedades de refletância de ondas planas de densidade de fótons espacialmente moduladas, bem como a sua taxa de fluência.

De acordo com Cuccia (2009), as ondas de densidade de fótons moduladas espacialmente são representadas pela transformada de Fourier de fontes pontuais e perturbações espaciais, cuja equação de difusão independente do tempo em meio homogêneo é dada pela **Equação 2.20**:

$$\nabla^2 \varphi - \mu_{\text{eff}}^2 \varphi = -3\mu_{\text{TR}} \varphi \quad (2.20)$$

em que φ é a taxa de fluência, q a fonte, μ_{TR} o coeficiente de transporte e μ_{eff} o coeficiente de atenuação efetivo.

Na **Equação 2.20**, o coeficiente de transporte é dado pela **Equação 2.21** (CUCCIA et al., 2009):

$$\mu_{TR} = \mu_a + \mu'_s \quad (2.21)$$

e

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a\mu_{TR}} \quad (2.22)$$

Sendo μ_a o coeficiente de absorção e μ'_s o coeficiente de espalhamento reduzido dado pela **Equação 2.23** (CUCCIA et al., 2009):

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (2.23)$$

no qual g é o cosseno do ângulo de espalhamento médio.

A **Figura 2. 8** mostra como varia periodicamente uma fonte q de iluminação modulada. Esta é considerada uma fonte de onda plana com incidência normal e está representada pela **Equação 2.24** (CUCCIA et al., 2009):

$$q = q_0(z)\cos(k_x x + \alpha)\cos(k_y y + \beta) \quad (2.24)$$

Neste caso, as fases espaciais dadas por α e β são dependentes arbitrariamente da profundidade z e se prolongam ao longo dos eixos x e y . As frequências espaciais, por sua vez, são dadas pelas **Equações 2.25** (CUCCIA et al., 2009):

$$f_x = \frac{K_x}{2\pi} \quad \text{e} \quad f_y = \frac{K_y}{2\pi} \quad (2.25)$$

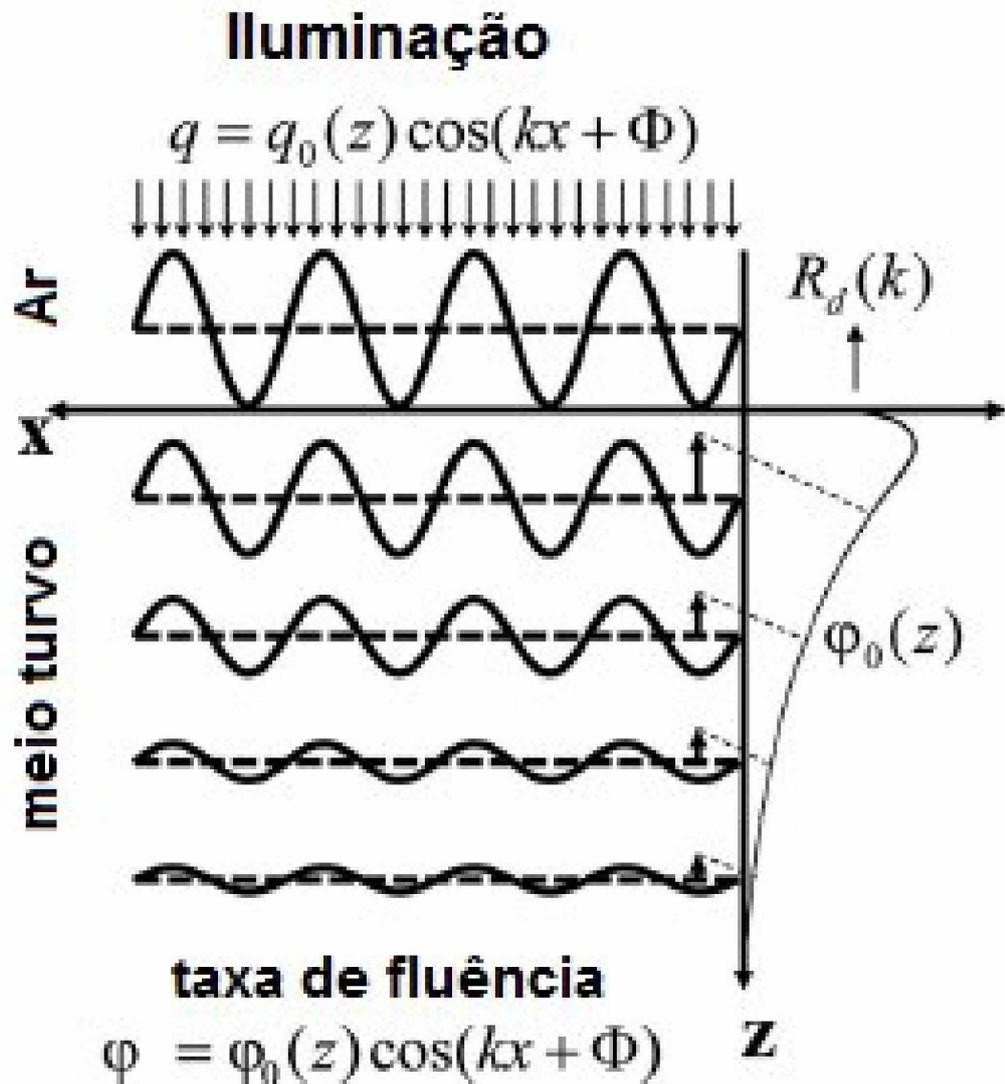


Figura 2. 8: Representação de uma fonte de iluminação modulada, com incidência sobre o eixo x , variando periodicamente. Ref. (CUCCIA et al., 2009).

Em um meio linear de propagação, cuja resposta é proporcional a intensidade incidente, obtemos uma taxa de fluência difusa φ , com a mesma fase e frequência da fonte de iluminação sinusoidal da **Figura 2. 8**. A solução para φ é dada segundo a **Equação 2.26** (CUCCIA et al., 2009):

$$\varphi = \varphi_o(z) \cos(K_x x + \alpha) \cos(K_y y + \beta) \quad (2.26)$$

Se substituirmos as **Equações 2.24 e 2.26** em **2.20**, obtemos a **Equação 2.27** para a taxa de fluência φ em função da penetração z (CUCCIA et al., 2009):

$$\frac{d^2}{dz^2} \varphi_o(z) - \mu'_{eff} \varphi_o(z) = -3\mu_{TR} \varphi_o(z) \quad (2.27)$$

na qual temos que:

$$\mu'_{eff} = (\mu_{eff}^2 + k_x^2 + k_y^2)^{1/2} = \frac{1}{\delta'_{eff}} \quad (2.28)$$

onde δ'_{eff} é a profundidade de penetração efetiva da luz na amostra em função das frequências espaciais k_x e k_y . Neste caso, teremos a propagação de uma onda com coeficiente de atenuação escalar μ'_{eff} que surge devido a uma onda plana modulada em x e y (CUCCIA et al., 2009).

Ao considerarmos a frequência espacial nula ($k_x = k_y = 0$), ou seja, na ausência de modulação espacial, temos que $\mu'_{eff} = \mu_{eff}$, o que significa que a profundidade de penetração efetiva é proporcional a de uma onda planar com iluminação constante e é obtida a partir da **Equação 2.29** (CUCCIA et al., 2009):

$$\delta'_{eff} = \frac{1}{\mu_{eff}} \quad (2.29)$$

Substituindo as **Equações 2.21 e 2.22** na **Equação 2.29**, podemos obter a **profundidade de penetração da luz** em um meio turvo (tecido biológico) de acordo com a **Equação 2.30**:

$$\delta'_{\text{eff}} = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}} \quad (2.30)$$

Portanto, a **Equação 2.30** mostra que a partir dos coeficientes de absorção e espalhamento reduzido é possível determinar a profundidade de penetração da luz em um meio.

2.5 ESFERA INTEGRADORA

Além do SFDI, existe um outro método capaz de determinar os valores de absorção e espalhamento de um material, com o uso da esfera integradora. A partir desta técnica e utilizando o método IAD (*Inverse adding-doubling*) obtém-se μ_a e μ_s a partir dos valores de transmitância e refletância medidos (TARTARI et al., 2018).

De acordo com a Lei de Lambert- Beer é possível definir os conceitos de transmitância e absorbância:

A Transmitância é definida como a fração do feixe de luz que incide em uma amostra, para um determinado comprimento de onda, e que consegue atravessá-la. Ela é dada pela **Equação 2.31**(ATKINS; P., 2010):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.31)$$

A absorbância é a capacidade que os materiais possuem de absorver radiações a uma frequência específica e é dada pela **Equação 2.32** (ATKINS; P., 2010):

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log (T) \quad (2.32)$$

Portanto, a transmitância e a absorbância são medidas neste sistema a partir das **Equações 2.31 e 2.32**.

A esfera integradora é composta por uma câmara oca, cuja a superfície interna possui a função de refletir a luz de modo que ela se distribua de maneira homogênea em seu interior (LEMAILLET; BOUCHARD; ALLEN, 2015).

O modelo do sistema da esfera integradora está representado na **Figura 2. 9**:

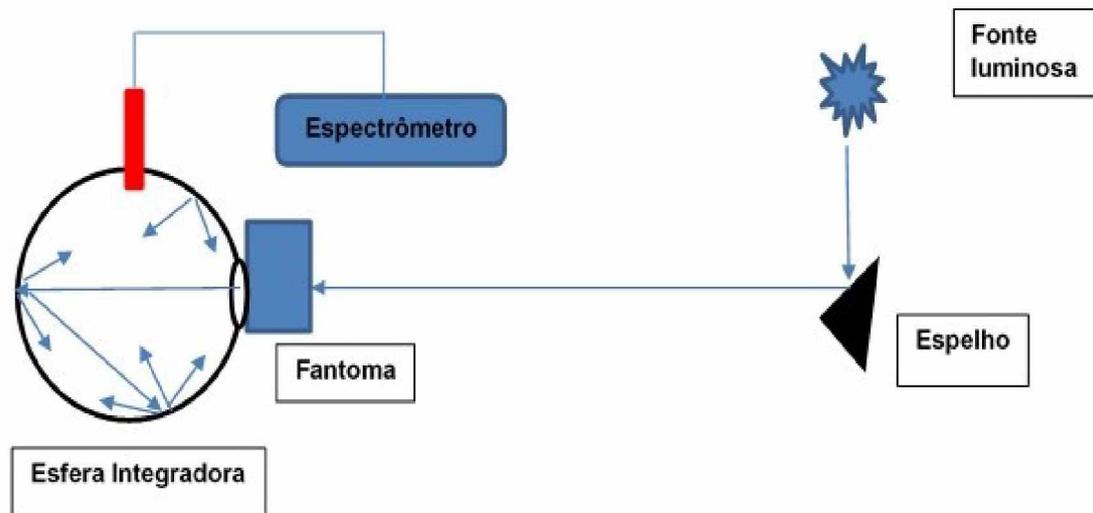


Figura 2. 9: Representação esquemática da distribuição da luz na esfera integradora. A luz se distribui de maneira homogênea no interior da esfera oca devido a alta reflexão sofrida.

De acordo com a **Figura 2. 9** o equipamento é formado por uma fonte luminosa que incide a luz sobre um espelho. A esfera integradora é composta por uma porta de entrada e uma porta de saída. A amostra, então, é posicionada na porta de entrada e a luz ao ser refletida pelo espelho incide sobre a amostra, no caso um fantoma, atravessando-o e, conseqüentemente, entra na esfera integradora sofrendo o processo de reflexão interna e, por fim, o espectrômetro irá medir a transmitância da luz. Por outro lado, para obter os valores de refletância, a amostra deverá ser posicionada na porta de saída da esfera integradora.

MÉTODOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 FANTOMAS

Neste trabalho, utilizamos os fantasmas ou *Phantoms* como objeto de estudo, visto que eles são simuladores, pois apresentam características morfológicas semelhantes a estrutura biológica estudada. Estas características morfológicas são referentes aos cromóforos e elementos microscópicos presentes no tecido epitelial, que são responsáveis pela absorção e espalhamento da luz no meio, respectivamente.

Portanto, medidas em fantasmas, com parâmetros ópticos conhecidos, foram realizadas constantemente utilizando o SFDI e fazendo o uso do modelo de refletância difusa e da propagação da luz para determinarmos a absorção e o espalhamento nas profundidades do tecido. Isto nos garante maior segurança e confiança na validade do método e dos resultados obtidos.

Para prepararmos a matriz dos fantasmas, utilizamos o Polidimetilssiloxano (PDMS), cuja estrutura química está representada na **Figura 3. 1**:

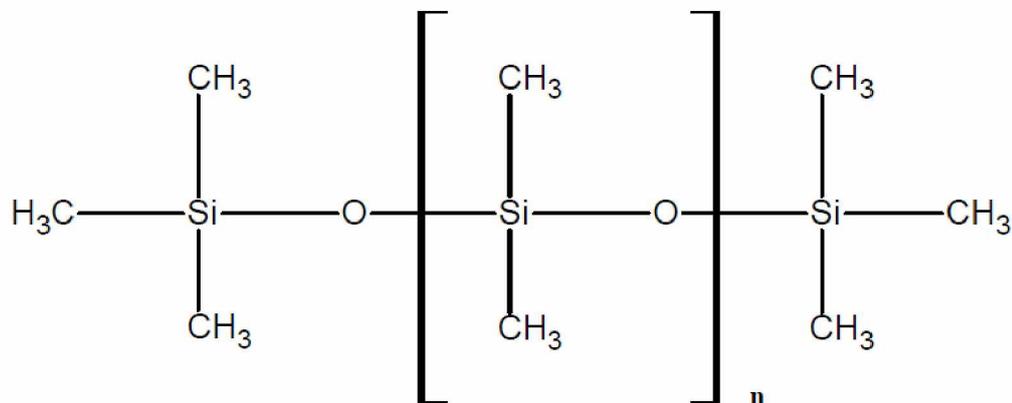


Figura 3. 1: Representação da estrutura química do Polidimetilssiloxano (PDMS), usado para produção da matriz dos fantasmas. Ref.(MOREIRA, 2013).

De acordo com a **Figura 3. 1** a estrutura química do PDMS apresenta em sua cadeia o radical metil (CH_3 -) e ligações de silício e oxigênio e, portanto, este composto pertence ao grupo dos polímeros orgânicos sintéticos que fazem parte da família dos silicones.

O PDMS é um elastômero de silicone, ou seja, um material polimérico orgânico de alta biocompatibilidade e de baixo custo e atualmente é muito utilizado na indústria biomédica (MOREIRA, 2013).

Além do PDMS, também utilizamos para a produção dos fantasmas o Dióxido de Titânio como meio espalhador e a ftalocianina de Zinco (ZnPc), cujo espectro de absorção está representado na **Figura 3. 2**:

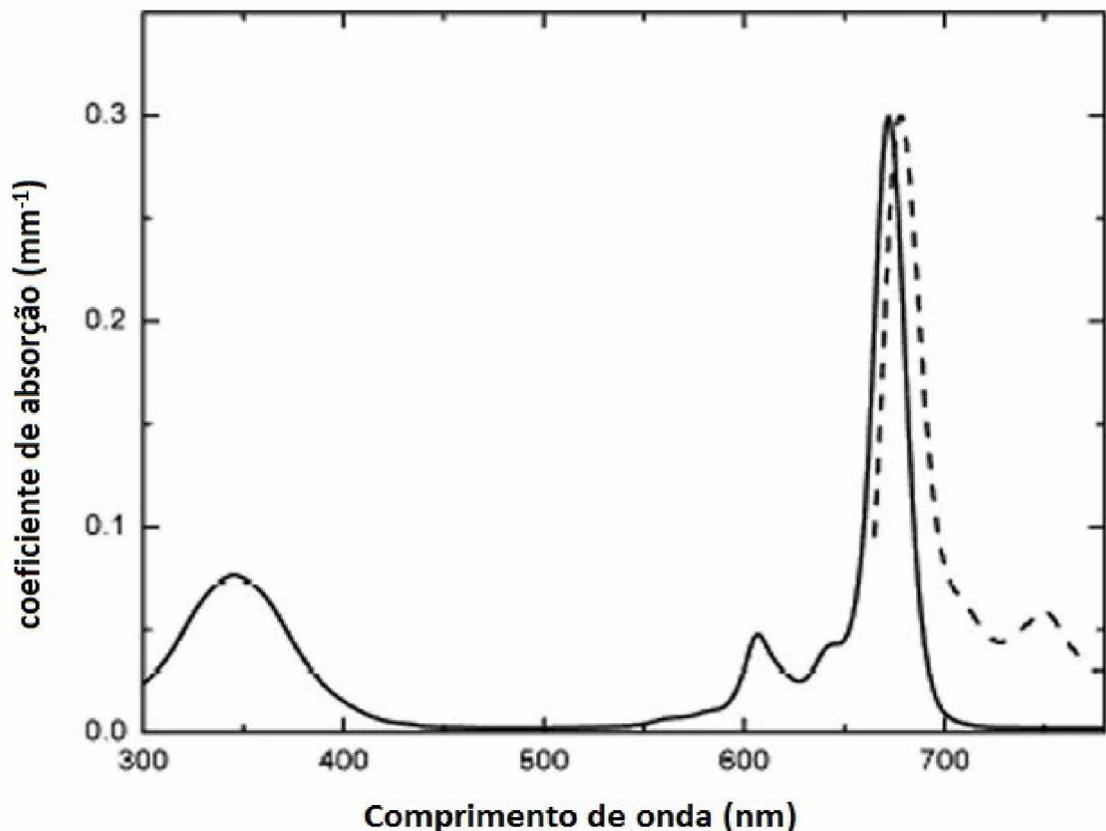


Figura 3. 2: Espectro de absorção da ftalocianina de Zinco (ZnPc) na presença de sulfóxido de dimetilo (DMSO). Na faixa de 550 a 700 nm observa-se que existe uma banda de absorção máxima em 672 nm e uma banda fraca em 645 nm. Ref. (SHARMA et al., 2013).

A **Figura 3. 2** representa o espectro de absorção da ftalocianina de Zinco em presença de sulfóxido de dimetilo (DMSO), um composto também bastante utilizado na indústria e em laboratório. Nele observa-se que em uma faixa de 550 a 700 nm a ftalocianina de zinco apresenta duas bandas de absorção, sendo uma banda máxima em 672 nm e uma banda fraca em 645 nm. Portanto, verifica-se que a ZnPc apresenta picos de absorção dentro da janela terapêutica (600 a 1200nm), o que torna importante utilizar este composto como meio absorvedor nos fantasmas. De fato, isto é interessante, porque os cromóforos presentes nesta região ao absorverem luz, perdem pouca energia e, portanto, podem ser utilizados para o diagnóstico a fim de tratar regiões mais profundas.

Os tecidos biológicos caracterizam-se por serem meios turvos, heterogêneos e complexos, visto que neste trabalho o foco do estudo é o tecido epitelial. Portanto, os fantasmas utilizados simularam de maneira eficaz as propriedades ópticas de espalhamento e absorção da luz nestes meios.

Além de simular o tecido biológico, os fantasmas também servem como método para calibração de equipamentos. Neste caso, utilizamos, para calibrar o equipamento SFDI, fantasmas cuja matriz é produzida a base de Polidimetilssiloxano (PDMS) e que apresentam como núcleos espalhadores de luz o Dióxido de Titânio (TiO_2) e como corante o Nankim (PRO- 4100, 183 Pro Art).

Para prepararmos o fantoma de calibração, inicialmente misturamos 0,05 g de TiO_2 para 144,75 g de PDMS e 70 ml de Nakim para dar um tom cinza ao composto. Em seguida, mexemos bem os reagentes até obtermos uma mistura homogênea e, então, adicionamos 15 ml do agente ativador (Kit P-4, Eager Plastic) que é utilizado para vulcanizar o sistema, ou seja, dar forma ao produto final.

Por último, utilizamos uma bomba de vácuo para retirar os gases presentes no meio. O fantoma de calibração está representado abaixo pela **Figura 3. 3**:

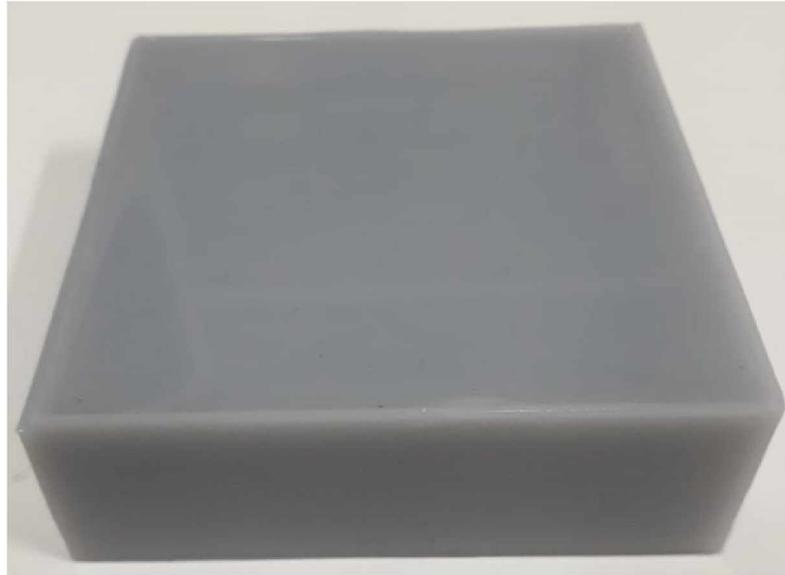


Figura 3. 3: Fantoma de calibração, produzido a base de PDMS, TiO_2 e Namkim.

Além do fantoma de calibração, também foram confeccionados outros dois tipos de fantasmas, sendo eles simuladores de propriedades características do tecido epitelial (biológico). Um deles foi preparado com o intuito de mostrar as propriedades ópticas do sistema na superfície e o outro para mostrar em profundidade.

Depois do fantoma de calibração, o próximo a ser elaborado foi um fantoma no qual foram inseridas finas películas com diferentes concentrações de um composto absorvedor, a ftalocianina de Zinco (ZnPc). Nele foram realizadas medidas no equipamento SFDI e em outro equipamento denominado Esfera Integradora. Estas medições tiveram o objetivo de, primeiramente, comprovar a validade do método SFDI ao compará-lo com dados obtidos na esfera integradora. E posteriormente, podermos realizar medidas em outro fantoma que apresenta graus de profundidade. O fantoma de ZnPc está representado na **Figura 3. 4:**

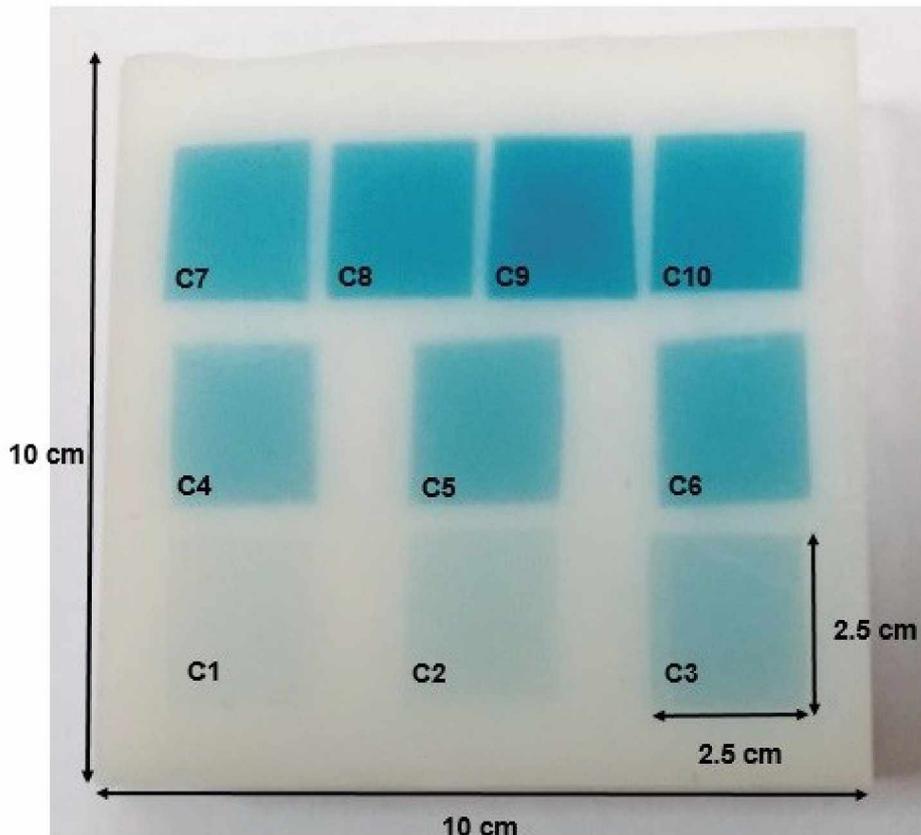


Figura 3. 4: Fantoma produzido em laboratório para simulação de propriedades ópticas do tecido epitelial. Este apresenta um bloco maior de PDMS e finas películas de ZnPc e TiO_2 em diferentes concentrações.

A produção do fantoma de ZnPc representado pela **Figura 3. 4** foi dividida em três etapas:

1º ETAPA: inicialmente foi produzido, em temperatura ambiente, um bloco composto por 125 g de PDMS e 15 ml do agente ativador (Kit P-4, Eager Plastic). Este bloco apresenta um formato cúbico com 10.00 cm de altura e comprimento;

2º ETAPA: nesta etapa foram produzidas dez películas finas com 1.00 mm de espessura cada. Elas também foram preparadas em formato cúbico com 2.5 cm de altura e comprimento. Para o seu preparo, utilizamos como matriz uma pequena quantidade fixa do substrato de PDMS que foi produzido na 1º etapa e adicionamos em cada película, quantidades diferentes de ZnPc, e uma concentração fixa de 2.5 mg/ml de TiO_2 usado como meio espalhador, como mostra a **Tabela 3. 1:**

Tabela 3. 1: Concentrações de ftalocianina de zinco e TiO_2 usados para confecção das películas de um fantoma.

Fantomas	ZnPc (mg)	TiO_2 (mg/ml)
C1	5.00	2.50
C2	10.00	2.50
C3	20.00	2.50
C4	40.00	2.50
C5	50.00	2.50
C6	60.00	2.50
C7	70.00	2.50
C8	80.00	2.50
C9	100.00	2.50
C10	90.00	2.50

Portanto, de acordo com a **Tabela 3. 1**, foram preparadas dez películas de ZnPc em diferentes concentrações.

3º ETAPA: nesta última etapa, foram inseridas as dez películas de ftalocianina de zinco, com diferentes concentrações, no substrato de PDMS produzido na 1º etapa, formando finalmente o fantoma de ZnPc.

Finalmente, o último fantoma a ser produzido foi chamado de “**Star- Phantom**”, pois ele é formado por um bloco de PDMS no qual foram inseridas finas películas de 1.00 mm de espessura que possuem o formato de estrelas e tiras retangulares. As estrelas apresentam uma inclinação dentro do bloco que nos permite analisar a profundidade de penetração da luz no mesmo. O “**Star- Phantom**” segue abaixo sendo representado pela **Figura 3. 5**:

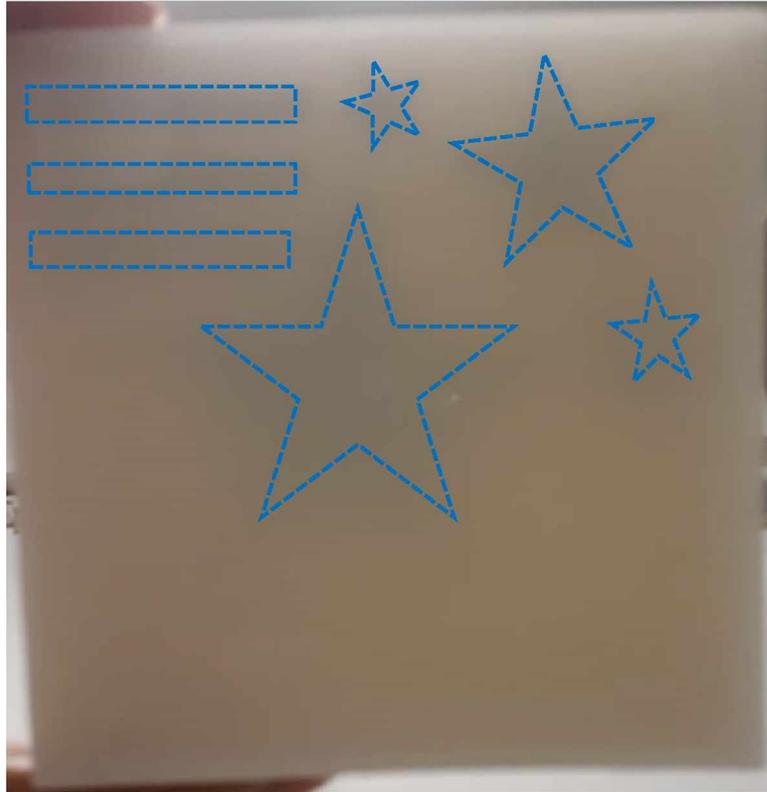


Figura 3. 5: “Star Phantom” produzido em laboratório, formado por um bloco de PDMS e finas películas de ZnPc em formato de estrelas e tiras retangulares que estão identificadas pelas linhas pontilhadas em azul.

Na **Figura 3. 5**, as películas de ZnPc em forma de estrelas e tiras retangulares foram demarcadas pelas linhas pontilhadas a fim de facilitar a visualização.

A produção do “*Star Phantom*” também se divide em três etapas:

1º ETAPA: para a fabricação deste fantoma, primeiro criamos um composto que chamamos de “**Nova Matriz**”. Para isso, agregamos 1,18 g de TiO_2 em 158,12 g do agente ativador (Kit P-4, Eager Plastic), usado para dar forma ao bloco;

2º ETAPA: nesta etapa criamos um bloco chamado de “**Phantom- matriz**”, formado a partir da adição de 125.00 g de PDMS em 13.00 g da “Nova Matriz” produzida inicialmente;

3º ETAPA: nesta última etapa, produzimos as finas películas em forma de estrelas e tiras retangulares. Para isto, incorporamos 1,29 g da “Nova Matriz” em 8,09 g de PDMS e 0,02 g de ZnPc e, então, as agregamos com um certo grau de inclinação ao “*Phantom- matriz*” produzido na 2º etapa, dando origem ao “*Star Phantom*”.

Em ambos os fantasmas de simulação é importante ressaltar que a técnica adotada para a coloração das películas foi com Hematoxilina. As técnicas de coloração são importantes pois permitem diferenciar as estruturas presentes no tecido, sendo os cromóforos os responsáveis pela coloração no tecido epitelial. A Hematoxilina foi utilizada, pois ela é responsável pela coloração azul dos núcleos a fim de fornecer maiores informações intranucleares.

3.2 MONTAGEM DO APARATO EXPERIMENTAL

3.2.1 ESFERA INTEGRADORA

Para caracterizar as propriedades ópticas do fantoma na superfície, foram feitas medidas em um equipamento chamado Esfera integradora, a fim de comparar com os resultados obtidos no SFDI e verificar a validade da técnica.

O equipamento da esfera integradora utilizada neste trabalho está representado na **Figura 3. 6**.

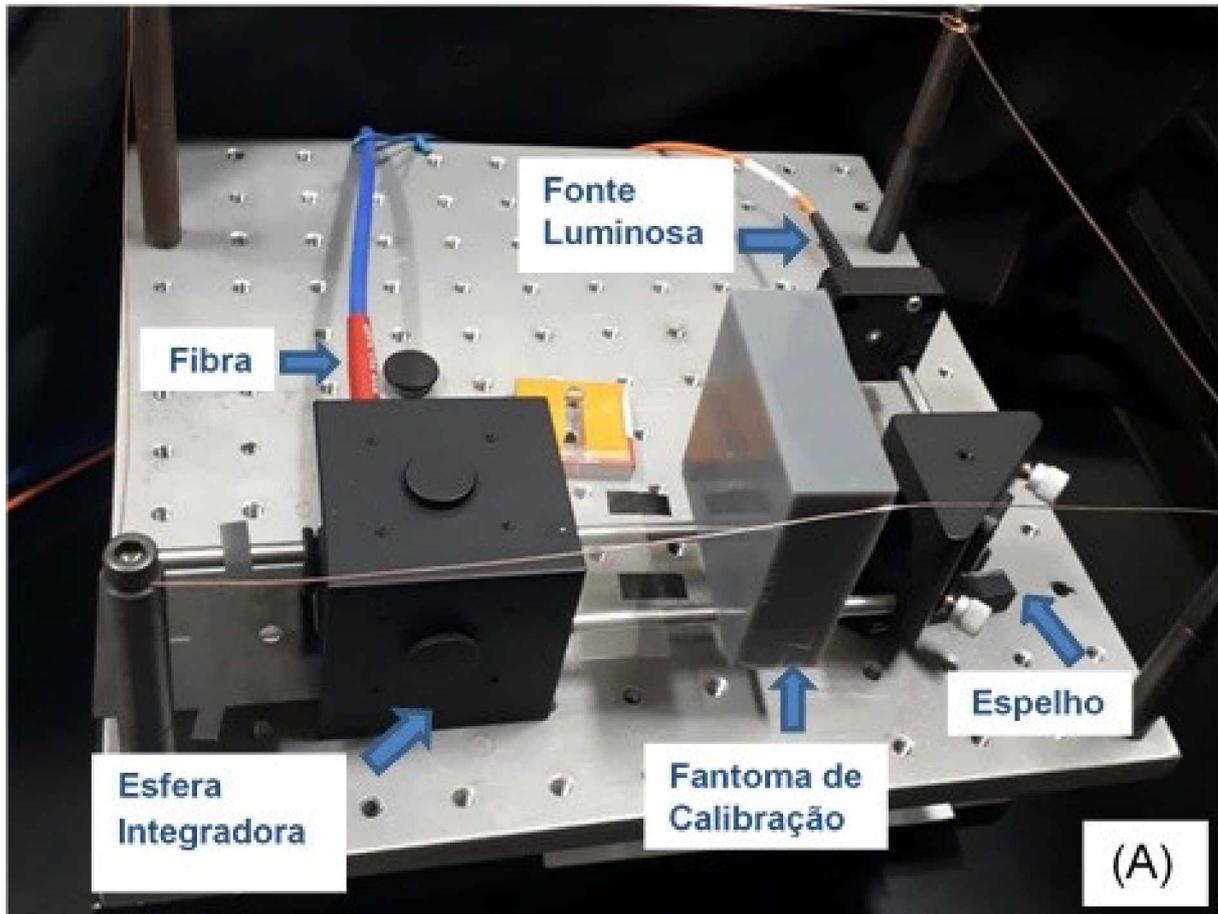


Figura 3. 6: Imagem do equipamento da esfera integradora, formado por uma fibra óptica, uma fonte luminosa, o espelho, e a esfera integradora. Esta última é composta por uma câmera oca em seu interior cuja função é refletir a luz homogeneamente.

Para calcular os valores de μ_a e μ_s através do método IAD (*Inverse adding-doubling*), que usa os valores de refletância e transmitância, utilizamos uma esfera integradora composta por vinte portas e quatro portas da Thorlabs, Inc ligada a um espectrômetro da Ocean Optics USB4000-UV-VIS que armazena os dados na forma de texto, sendo uma coluna formada pelo comprimento de onda e a outra pela sua intensidade luminosa.

Para determinar os espectros de absorção e espalhamento foi utilizado o programa Origin juntamente com um código implementado em Matlab, no qual foram fornecidos alguns valores importantes, tais como a espessura da amostra ($d= 1\text{mm}$), o índice de refração ($n= 1,4$) e a anisotropia do meio ($g= 0,9$).

3.2.2 APARATO EXPERIMENTAL DO SFDI

Neste trabalho, as medidas no equipamento SFDI foram realizadas primeiro em um fantoma para mostrar as propriedades ópticas em sua superfície e depois em outro para mostrar as propriedades em profundidade.

Para montagem do equipamento, uma fonte de luz halógena (OSL2, Thorlabs Inc), um projetor de luz (P300, AAXA Inc.), uma câmera CCD de 1280 x 1024 pixels (Thorlabs Inc) e uma base giratória composta por cinco filtros foram acopladas em uma placa metálica formando o SFDI, como mostra a **Figura 3. 7**:



Figura 3. 7: Aparato experimental do SFDI, onde (A) representa a imagem do projetor de luz (P300, AAXA Inc.), (B) a câmera CCD de 1280 x 1024 (Thorlabs Inc) e a base giratória composta por cinco filtros e (C) a montagem final do SFDI.

A base giratória acoplada a câmera CCD é composta por cinco filtros. Estes são responsáveis por selecionar os comprimentos de onda que desejamos trabalhar. Neste trabalho, os filtros selecionados apresentam uma interferência passa-banda para transmissão nos picos em 475, 488, 532, 580, 650 nm.

Como mostrado na **Figura 3. 7**, a saída da fonte de luz é conectada através da fibra óptica ao DMD (Digital Micromirror Device) que fica dentro do projetor e modula a luz para ser projetada na amostra. As aquisições de imagem foram realizadas sem interferência de luz externa quando a sala ficou escura. Essas condições melhoram a relação sinal / ruído (SNR) e previnem diafonia com luzes falsas.

O SFDI requer a modulação espacial da iluminação, bem como medidas em um fantoma difusivo usado como referência (fantoma de calibração da **Figura 3. 3**) para determinar as propriedades ópticas em um determinado comprimento de onda. O módulo DMD gera padrões de onda senoidal que apresentam três fases distintas (0° , 120° e 240°) e cinco frequências espaciais. Esses padrões são projetados em sequência na superfície do *phantom* e a luz refletida é coletada com a câmera CCD. As imagens originais têm 1024×1024 pixels de tamanho e podem cobrir uma área do *phantom* de 70 mm x 60 mm.

A **Figura 3. 8** mostra uma representação esquemática do aparato experimental da técnica SFDI, onde a câmera externa é responsável por capturar a refletância resultante e medir a função s-MTF (spatial modulation transfer function).

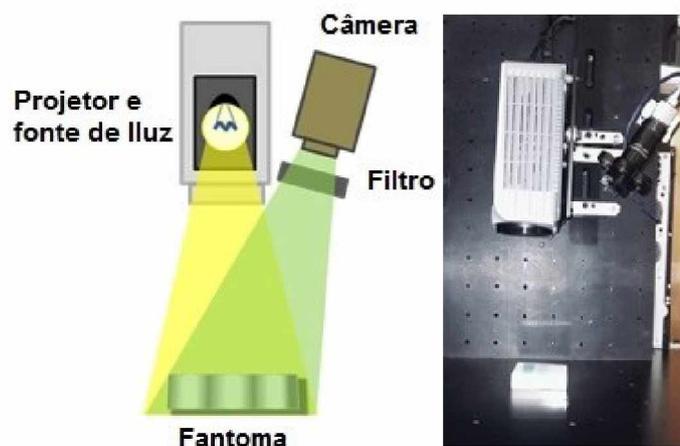


Figura 3. 8: O aparato experimental da técnica SFDI é formado por um projetor de luz ligado ao módulo DMD que gera padrões de ondas senoidais na superfície do fantoma e uma câmera CCD que captura as imagens formadas pela refletância.

Na **Figura 3. 8**, o projetor incide o feixe de luz modulada sobre o fantoma produzindo padrões senoidais na parte superior da amostra. A luz passa então pela base giratória, onde cada filtro selecionado irá determinar o comprimento de onda que queremos trabalhar. Por último, a câmera CCD irá capturar as imagens produzidas do fantoma.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DETERMINAÇÃO DOS FILTROS A SEREM UTILIZADOS

Para determinarmos os filtros a serem usados na base giratória do equipamento SFDI, foi importante verificarmos o espectro de absorção dos filtros disponíveis. Para isto, utilizamos um espectrômetro USB4000-UV-VIS da Ocean Optics e para o cálculo dos espectros de absorbância foi empregada a **Equação 2.32** e o programa Origin.

Um fator importante para a escolha dos filtros foi verificar se eles se encontram na região do espectro eletromagnético compreendida entre o vermelho e IV próximo, ou seja, com comprimento de onda de 600 a 1200 nm. A **Figura 4. 1** mostra o espectro de transmissão dos filtros:

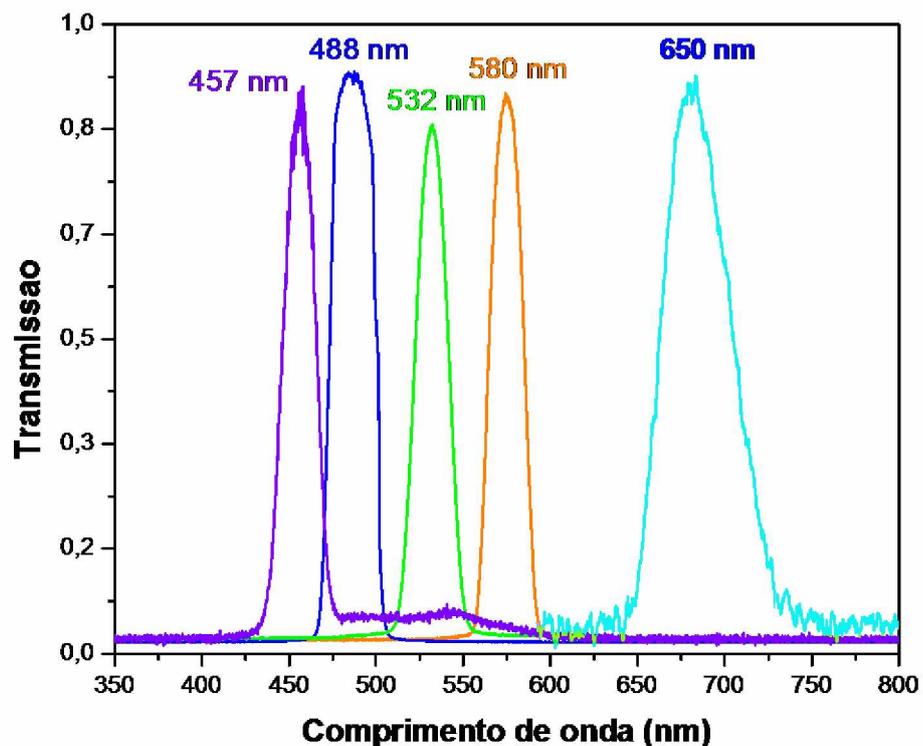


Figura 4. 1: Espectro de absorção dos filtros utilizados no equipamento SFDI.

Na **Figura 4. 1**, os filtros apresentam transmissão em 457 nm, 488 nm, 532 nm, 580 nm, 650 nm, respectivamente. Estes filtros foram fundamentais para a análise da profundidade em *phantoms* biológicos, utilizando o SFDI. Apenas um deles (650 nm) apresenta comprimento de onda dentro da janela terapêutica e, portanto, ao absorver pouca luz ocasiona a baixa perda de energia e consequentemente o alcance de regiões mais profundas pelo feixe luminoso.

4.2 UTILIZAÇÃO DO SFDI PARA AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DA IMAGEM

Nesta seção será descrito como foi realizada a aquisição e o processamento da imagem utilizando o SFDI.

A realização deste procedimento foi possível devido ao uso de um software de instrumentação virtual conhecido como LabView. Este foi desenvolvido pela National Instruments (NI), onde cada instrumento virtual é composto por uma tela de comandos, pelo diagrama de blocos e um conector. A **Figura 4. 2** mostra a interface gráfica da tela de comandos do LabView usada neste trabalho.

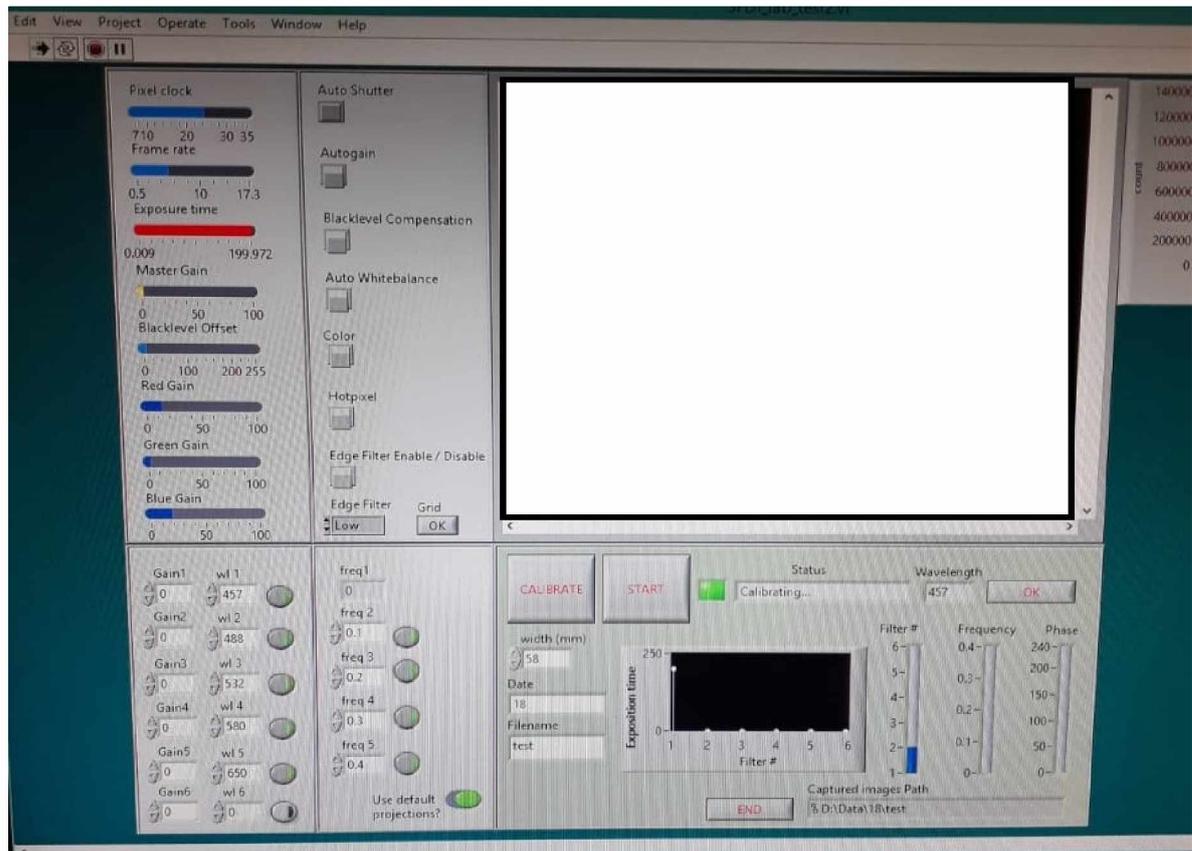


Figura 4. 2: Interface gráfica da tela de comandos do LabView que permite a interação entre o usuário e o equipamento SFDI Ref. (BARBOSA DA CRUZ JUNIOR, 2018) .

Na tela de comandos da **Figura 4. 2** estão presentes botões como o Master gain e Blacklevel Offset que são responsáveis por aumentar e diminuir a intensidade do feixe luminoso na amostra, além do botão Auto Shutter que corrige automaticamente a luminosidade e botões para os comprimentos de onda e as frequências a serem utilizadas.

Para a aquisição das imagens, a tela da câmera CCD, também presente no painel principal, comunica-se com o código que foi programado anteriormente e captura a projeção adequada do SFDI (BARBOSA DA CRUZ JUNIOR, 2018).

Para que haja formação da imagem, esta técnica precisa de no mínimo dois comprimentos de onda. Portanto, como já citado anteriormente, foram escolhidos cinco filtros com comprimentos de onda diferentes, os quais devem ser registrados na tela de comando pelo usuário.

Além dos comprimentos de onda, outro fator importante para a análise da profundidade em *phantoms* biológicos através do SFDI, está na determinação das frequências espaciais. Decidimos, portanto, adotar cinco conjuntos, sendo cada um composto por cinco frequências espaciais diferentes que também devem ser inseridas na tela de comandos do LabView. Um dos conjuntos foi usado para o processo de aquisição de imagens no fantoma formado por finas películas com diferentes concentrações de ZnPc e os demais conjuntos para o “**Star- Phantom**”. Em cada um deles será selecionada a frequência determinante durante o processamento da imagem.

Ainda no processo de aquisição de imagem, pastas de dados são formadas para cada frequência espacial selecionada, por conta da modulação sinusoidal (BARBOSA DA CRUZ JUNIOR, 2018). Por exemplo, para um conjunto formado pelas frequências 0 mm^{-1} ; $0,08 \text{ mm}^{-1}$; $0,1 \text{ mm}^{-1}$; $0,4 \text{ mm}^{-1}$ e $0,8 \text{ mm}^{-1}$ teremos cinco pastas para cada uma delas. Em cada uma das pastas serão armazenadas 15 imagens para os cinco comprimentos de onda dos filtros e três fases distintas (0° , 120° e 240°). Logo, no final do processo são formadas 75 imagens. A **Figura 4. 3** mostra as imagens moduladas que foram formadas para o “**Star- Phantom**” e a **Figura 4. 4** apresenta um esquema de imagens moduladas para o mesmo fantoma, mantendo-se um comprimento de onda fixo (650 nm) e variando as frequências espaciais:

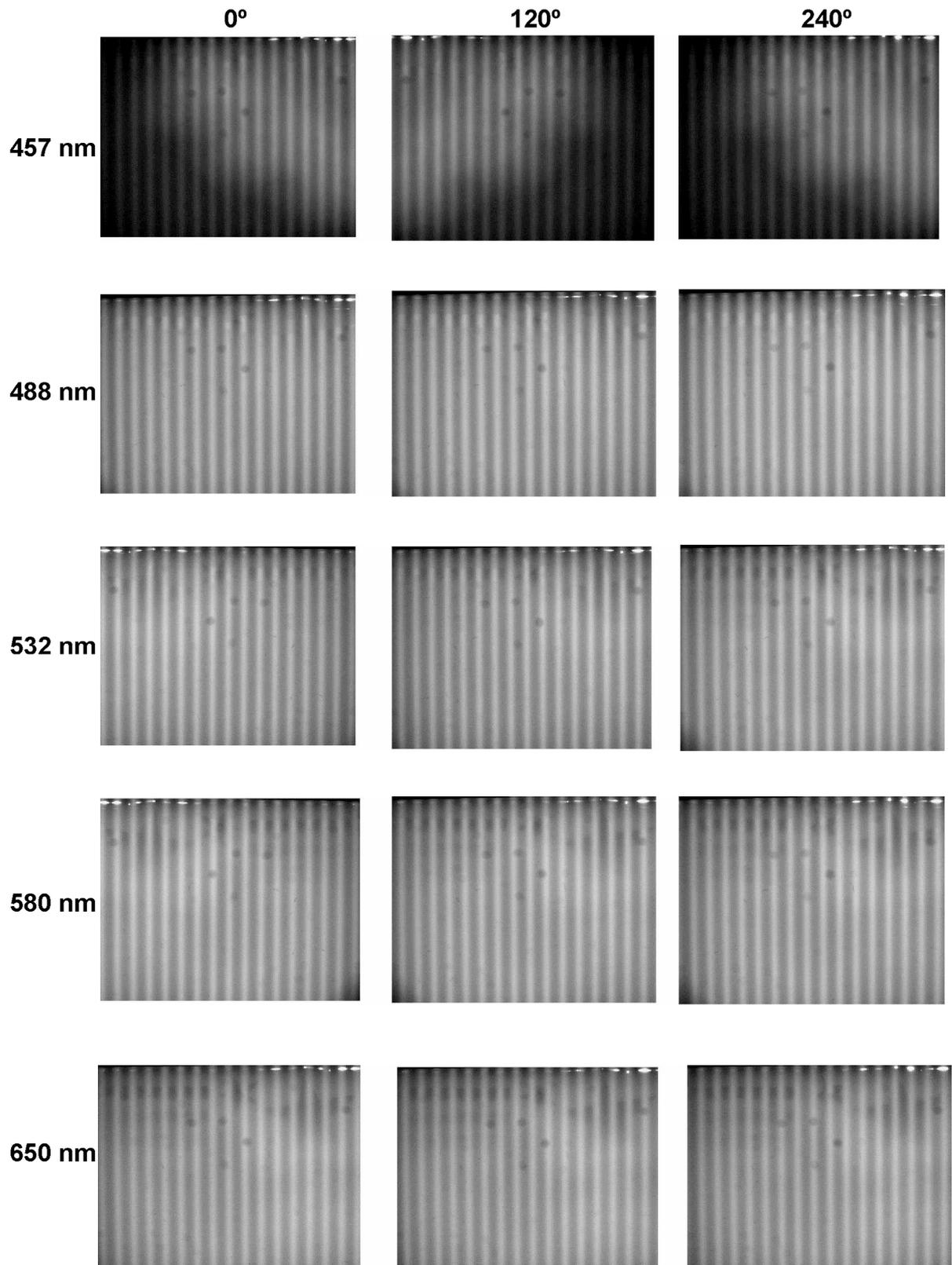


Figura 4. 3: Imagens moduladas do “Star Phantom” obtidas a partir do LabView nas fases 0° , 120° e 240° e na frequência espacial de $0,4\text{ mm}^{-1}$.

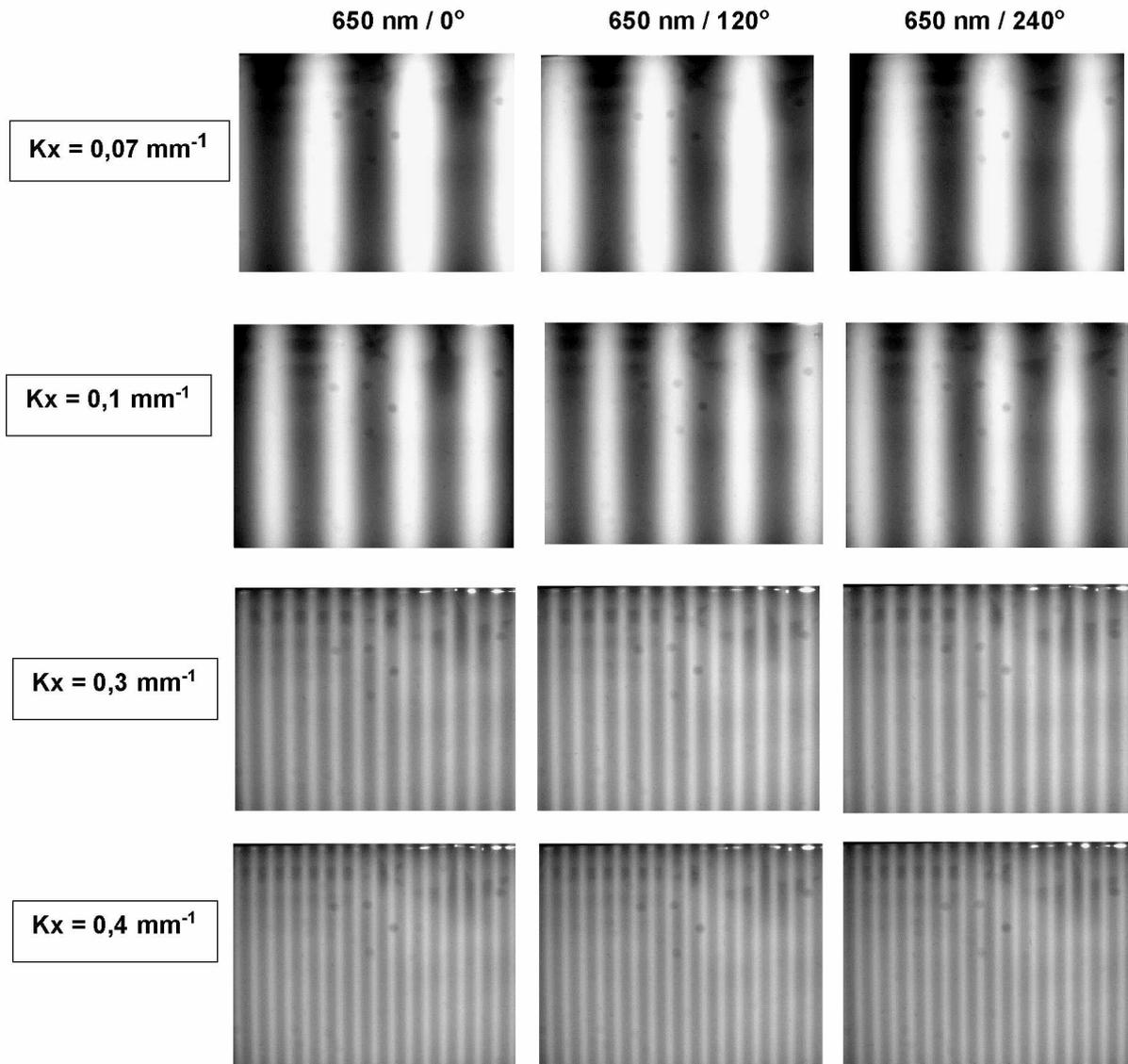


Figura 4. 4: Esquema de imagens moduladas do “Star Phantom” com o comprimento de onda fixo em 650 nm e quatro frequências espaciais $f_x = 0,07 \text{ mm}^{-1}$, $0,1 \text{ mm}^{-1}$, $0,3 \text{ mm}^{-1}$ e $0,4 \text{ mm}^{-1}$.

Logo após a aquisição das imagens moduladas dos fantasmas, obtidas pelo LabView, deve-se então realizar o processamento delas através do MATLAB. Este é um software que faz a compactação das imagens de reflexão adquiridas, ou seja, das cinco pastas com 75 imagens cada uma, em um único grupo. Além disso, o MATLAB fornece os coeficientes de absorção e espalhamento que são parâmetros ópticos importantes dos fantasmas estudados, a partir de cálculos computacionais e das informações processadas das imagens obtidas.

Para o processamento das imagens, foi utilizado um código implementado no MATLAB dividido em três partes importantes, como apresentado no final deste trabalho (**Anexo I**). Na **primeira etapa** do processamento, utilizamos o **convert_HC1_data.m** responsável por transformar em dados o formato de imagem modulada adquirida pelo SFDI e através do LabView. Neste processo é criado um arquivo **Raw** que contém todos os dados da imagem capturada pela câmera, sem nenhuma perda ou modificação.

Na **segunda etapa**, usamos o **test_script_for_HC1.m** que converte as informações do arquivo Raw em um mapa de cores. Neste procedimento, pede-se ao usuário alguns dados importantes para o processamento da imagem, tais como:

1) O método de processamento da imagem: look up table (Lut), Difusão (Diff) e Monte Carlo (MC). Sendo que neste trabalho usamos a look up table e a Difusão. O primeiro método é fundamentado em uma tabela de referência baseada em Monte Carlo. O segundo baseia-se na **Equação de Difusão 2.22** e cuja refletância difusa dada pela **Equação 2.21**, em última análise, será usada para calcular o coeficiente de absorção da luz no meio (μ_a) e o coeficiente de espalhamento reduzido (μ_s').

2) Um par de frequências espaciais (LUTfreqsidx): Se o método utilizado for LUT, então para cada conjunto de 5 frequências espaciais usadas e que foram introduzidas no painel de controle do LabView, deve-se selecionar apenas duas para o processamento da imagem. Por exemplo, ao usarmos as frequências $f_x = 0,0 \text{ mm}^{-1}$; $0,1 \text{ mm}^{-1}$; $0,2 \text{ mm}^{-1}$; $0,5 \text{ mm}^{-1}$; $1,0 \text{ mm}^{-1}$ e determinarmos como LUTfreqsidx [1 5], significa que as frequências selecionadas serão a primeira e a última.

Um fator importante neste procedimento é selecionar a frequência $0,0 \text{ mm}^{-1}$, pois ela não gera padrões de ondas senoidais que são projetadas na superfície do fantoma e, portanto, gera uma imagem planar. Ou seja, para esta frequência o SFDI é capaz de projetar imagens reais tridimensionais (3D) em um plano (2D).

Na **terceira e última etapa** do processamento de imagens, o Matlab pede para que o usuário selecione regiões de interesse que serão responsáveis por determinar a absorção e o espalhamento médio na região.

4.3 ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO ÓPTICO NA PROFUNDIDADE DOS FANTOMAS BIOLÓGICOS

4.3.1 NA SUPERFÍCIE DO FANTOMA

Para obtenção e análises dos coeficientes de absorção e espalhamento na superfície dos fantasmas, utilizamos a esfera integradora e o SFDI. As duas técnicas foram empregadas a fim de compararmos os resultados obtidos e verificarmos se a técnica SFDI é válida, pois os espectros de absorção e espalhamento de um meio que contém ZnPc e PDMS podem sofrer algumas alterações. Uma vez que comprovada a eficácia do método, ele pode então ser usado para o estudo da profundidade de penetração da luz em fantasmas biológicos que simulam o tecido epitelial.

4.3.1.1 UTILIZAÇÃO DA ESFERA INTEGRADORA

As primeiras medidas realizadas foram utilizando a esfera integradora, visto que, esta técnica possui elevada precisão na obtenção dos coeficientes de absorção e espalhamento do meio.

O fantoma utilizado foi aquele formado por finas películas de ZnPc em diferentes concentrações. É importante lembrarmos que para este fantoma foram usados o PDMS, como meio de fundo, o ZnPc como meio absorvedor, e o TiO₂ como meio espalhador. As **Figura 4. 5** e **Figura 4. 6** mostram os espectros de absorção e espalhamento, respectivamente, para este fantoma.

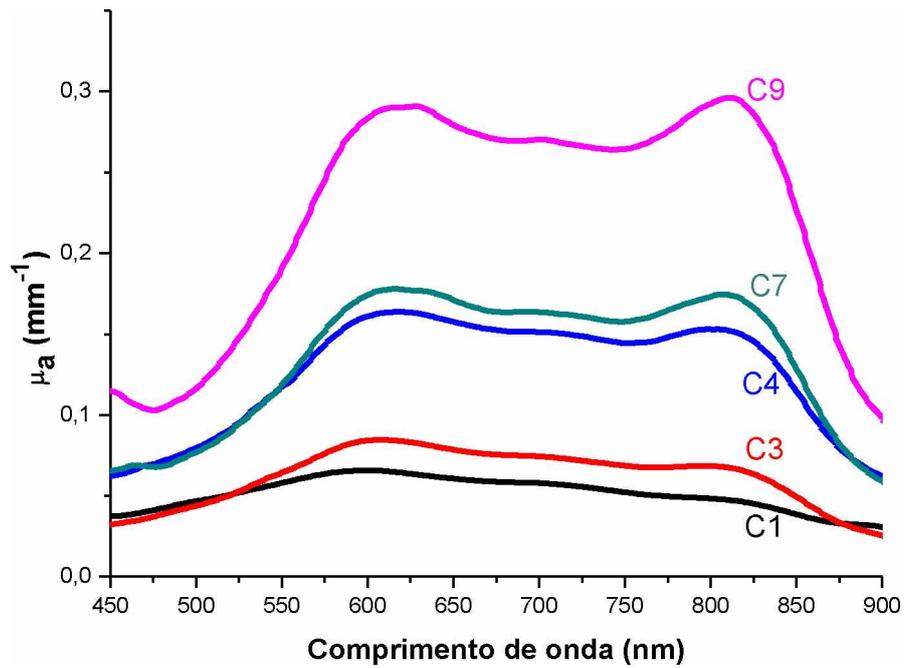


Figura 4. 5: Espectro de absorção em função do comprimento de onda do fantoma formado por películas de ZnPc em diferentes concentrações.

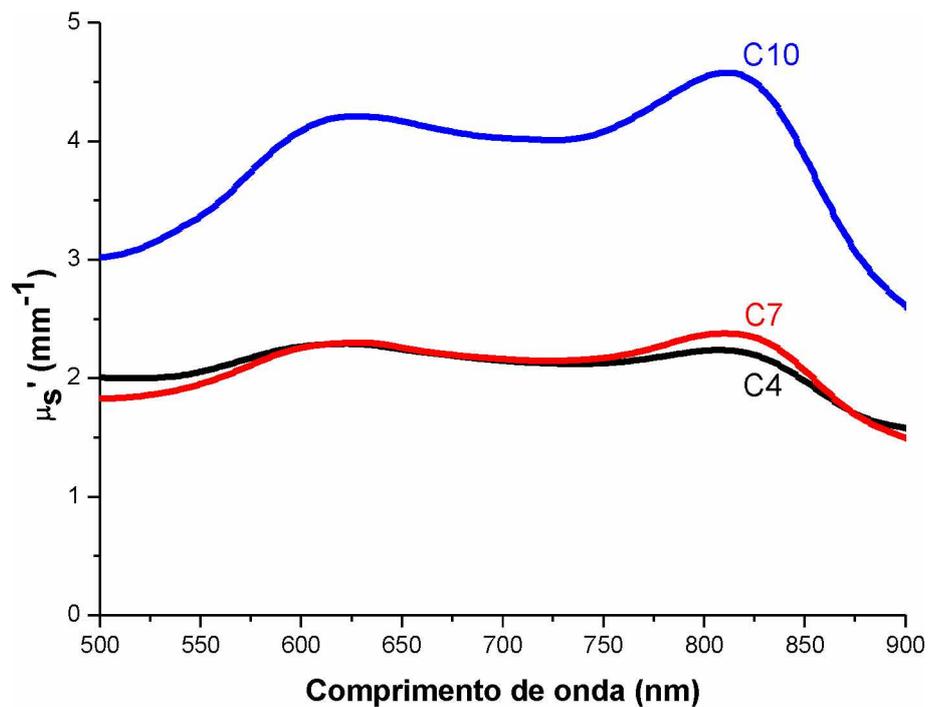


Figura 4. 6: Espectro de espalhamento em função do comprimento de onda do fantoma formado por películas de ZnPc em diferentes concentrações.

Na **Figura 4. 5** e **Figura 4. 6**, os espectros de absorção e espalhamento no fantoma deve-se a presença de ZnPc e do TiO_2 , respectivamente. Segundo eles, existem duas bandas de maior absorção e espalhamento da luz em, aproximadamente, 610 e 810 nm e outra menor em 450 nm.

Uma vez que o nosso interesse é observar as propriedades ópticas referentes aos comprimentos de onda que se encontram dentro da janela terapêutica, verificamos o comportamento da absorção e do espalhamento no meio em função da concentração das películas, para o comprimento de onda de 650 nm, de acordo com os gráficos da **Figura 4. 7** e **Figura 4. 8**.

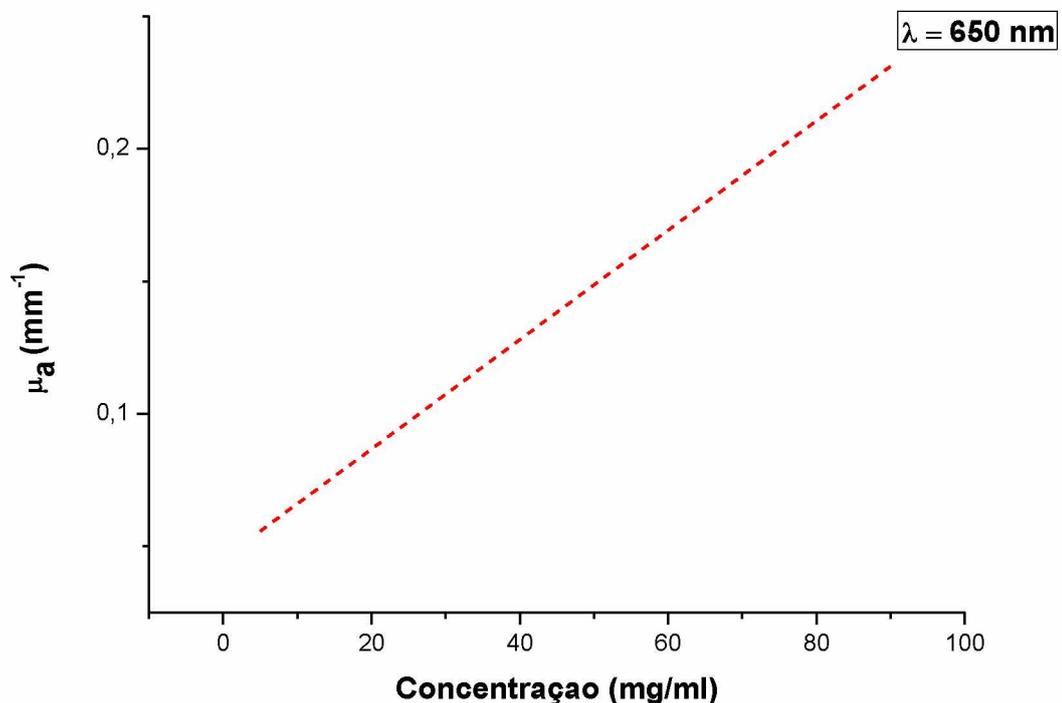


Figura 4. 7: O gráfico mostra o comportamento da absorção do feixe de luz em função da concentração para o comprimento de onda de 650 nm, em medidas realizadas na esfera integradora no fantoma formado por películas de ZnPc em diferentes concentrações.

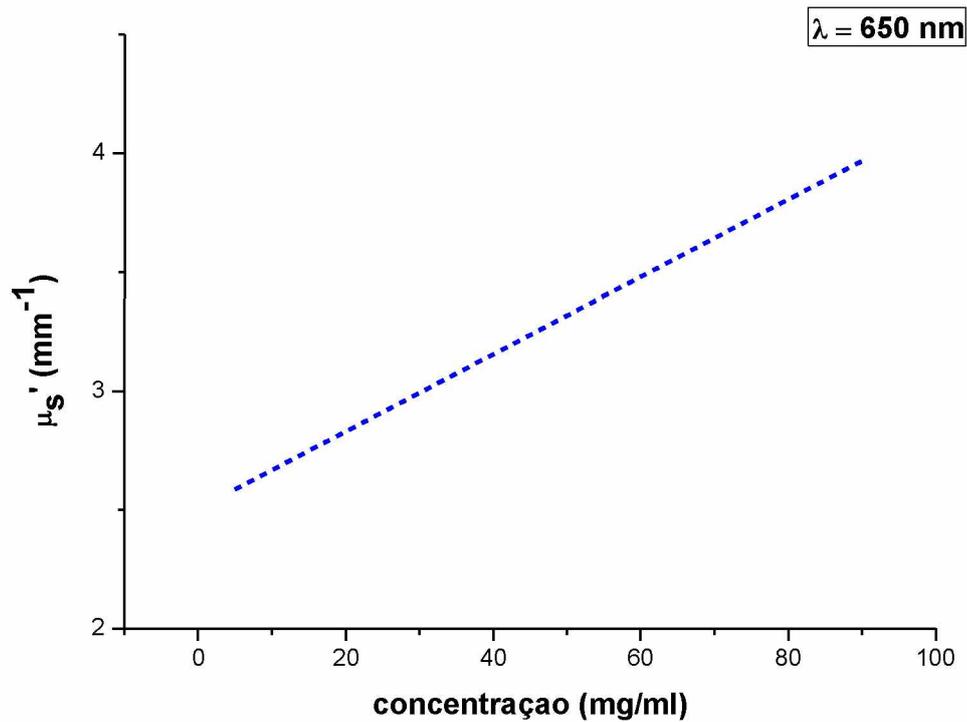


Figura 4. 8: O gráfico mostra o comportamento do espalhamento do feixe de luz em função da concentração para o comprimento de onda de 650 nm, em medidas realizadas na esfera integradora no fantoma formado por películas de ZnPc em diferentes concentrações.

Na **Figura 4. 7**, observa-se que a absorção aumenta para os meios de maior concentração. Este comportamento pode ser facilmente descrito pela Lei de Lambert-Beer, segundo a qual, para amostras que apresentam maiores concentrações, a intensidade do feixe de luz diminui ao atravessar o meio devido a alta absorção sofrida.

Na **Figura 4. 8**, o espalhamento também aumenta para os meios de maior concentração, pois o feixe de luz ao atravessar o fantoma sofre uma mudança em sua direção de propagação. Neste caso, a energia do campo de radiação é absorvida e depois reemitida mudando o seu direcionamento.

4.3.1.2 UTILIZAÇÃO DO SFDI

Posteriormente as medidas espectroscópicas utilizando a esfera integradora, as mesmas foram realizadas utilizando o equipamento SFDI. Para a aquisição e processamento da imagem foram usados os filtros com comprimentos de onda de 475 nm, 488 nm, 532 nm, 580 nm, 650 nm e frequência espacial $f_x = 0,8 \text{ mm}^{-1}$. O método de processamento de imagem utilizado foi a look up table e a Difusão. Este último foi usado para obtenção dos parâmetros de absorção e espalhamento a partir da equação de difusão e da refletância difusa e a look up table para o mapeamento dos cromóforos no fantoma. A **Figura 4. 9** mostra este mapeamento em função do comprimento de onda.

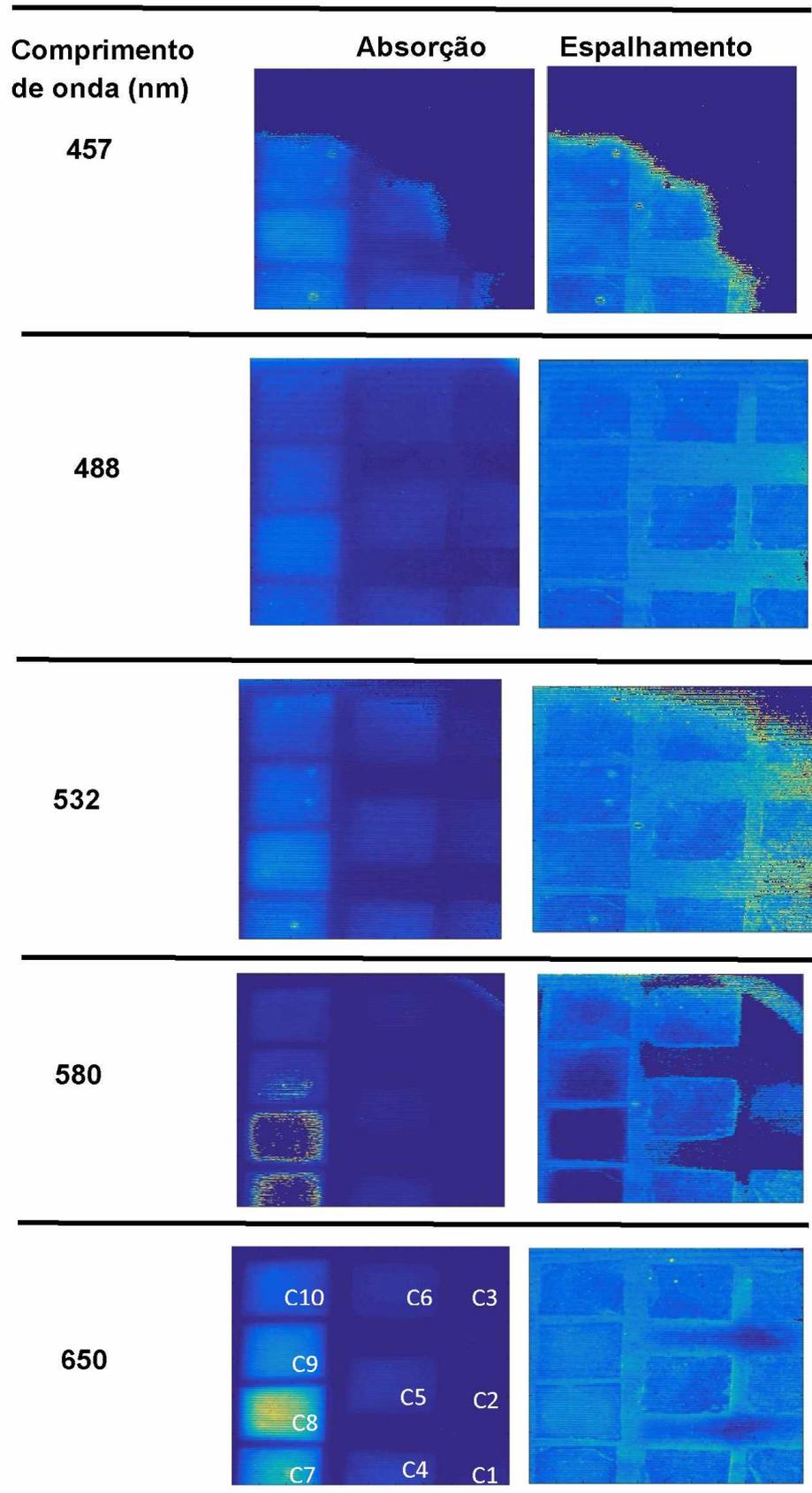


Figura 4. 9: Mapas de cores da absorção e do espalhamento de cromóforos em um fantoma com películas de ZnPc em diferentes concentrações.

Os resultados obtidos no SFDI e representados pela **Figura 4. 9** são comparáveis àqueles fornecidos pela esfera integradora. Primeiramente, porque observamos que tanto a absorção quanto o espalhamento são baixos em 457 nm e mais acentuados de 488 a 650 nm.

Em 650nm verifica-se um maior contraste entre as regiões contendo PDMS, ZnPc e TiO₂, devido ao alto nível de absorção e espalhamento. Para este comprimento de onda, os gráficos da **Figura 4. 10** e **Figura 4. 11** mostram o comportamento da absorção e do espalhamento em função da concentração das películas de ZnPc presentes no fantoma.

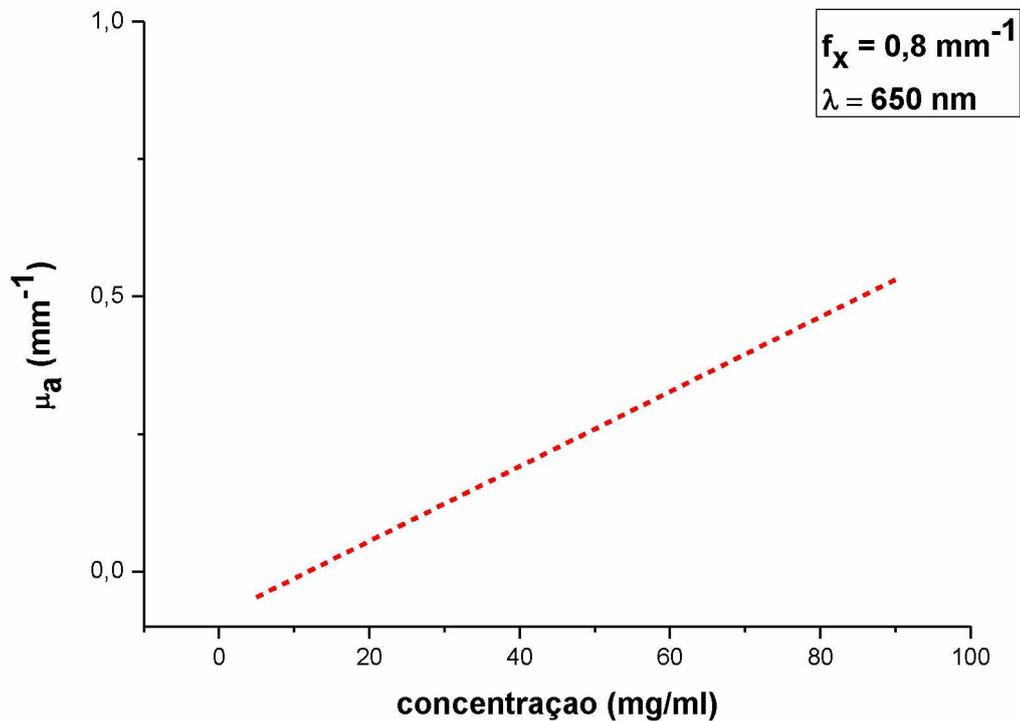


Figura 4. 10: O gráfico está representando como a absorção do feixe de luz varia com a concentração, em 650 nm e frequência espacial de 0,8 mm⁻¹, para o fantoma com películas de ZnPc no SFDI.

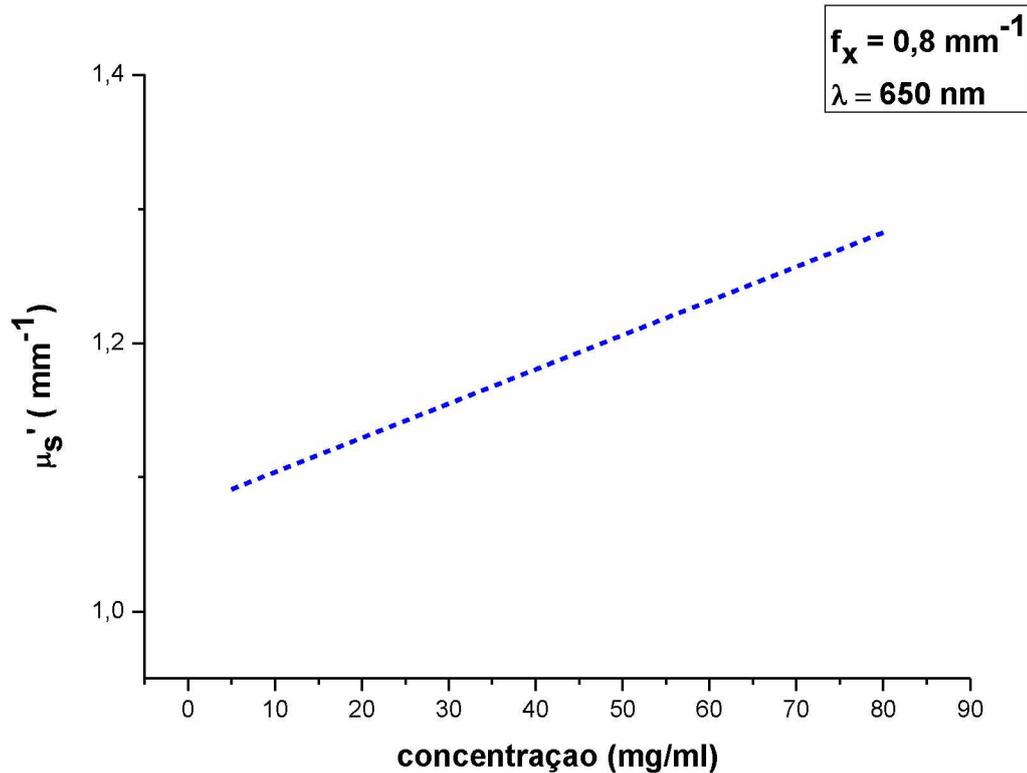


Figura 4. 11: O gráfico mostra a variação do espalhamento para o feixe luminoso em função da concentração, em 650 nm e frequência espacial de $0,8 \text{ mm}^{-1}$, para o fantoma com películas de ZnPc no SFDI.

Ambos os gráficos da **Figura 4. 10** e da **Figura 4. 11** foram obtidos a partir de um ajuste de dados.

Ao compararmos os gráficos da **Figura 4. 7**, **Figura 4. 8**, **Figura 4. 10** e **Figura 4. 11** mais uma vez observamos que os resultados obtidos no SFDI e na esfera integradora apresentam o mesmo comportamento. Isto ocorre, pois, a absorção e o espalhamento aumentam em ambos os gráficos, para os meios de maior concentração, estando de acordo com a Lei de Lambert-Beer.

4.3.2 NA PROFUNDIDADE DO FANTOMA

Nesta secção, será abordado as medidas feitas no SFDI para o “**Star Phantom**”. Para isso, foi realizado o processamento das imagens e a partir delas foi possível obter os valores de μ_a e μ_s' . Além disso, também foi alvo de estudo a profundidade de penetração da luz no meio, para diferentes frequências espaciais.

4.3.2.1 UTILIZAÇÃO DO SFDI PARA O ESTUDO DO “STAR PHANTOM”

Novamente, os filtros utilizados para o estudo das propriedades ópticas no “*Star Phantom*” possuem comprimento de onda de 475 nm, 488 nm, 532 nm, 580 nm e 650 nm, por estarem presentes na faixa compreendida pela janela terapêutica.

O “*Star Phantom*”, assim como o fantoma formado por películas de ZnPc em diferentes concentrações, também apresenta películas de ZnPc, porém estas possuem a forma de estrelas e estão inclinadas no meio. No entanto, o que diferencia este estudo daquele feito no outro fantoma é o uso de frequências espaciais diferentes, porque elas são fundamentais para a investigação da profundidade de penetração da luz no meio. Portanto, as frequências adotadas neste estudo foram $0,07 \text{ mm}^{-1}$; $0,1 \text{ mm}^{-1}$; $0,3 \text{ mm}^{-1}$ e $0,4 \text{ mm}^{-1}$.

A **Figura 4. 12**, **Figura 4. 13** e **Figura 4. 14** mostram os espectros de absorção ($\mu_a \times \lambda$) do “**Star- Phantom**”, que foram medidos em uma faixa de 400-660 nm para as frequências espaciais de $0,1 \text{ mm}^{-1}$; $0,3 \text{ mm}^{-1}$ e $0,4 \text{ mm}^{-1}$:

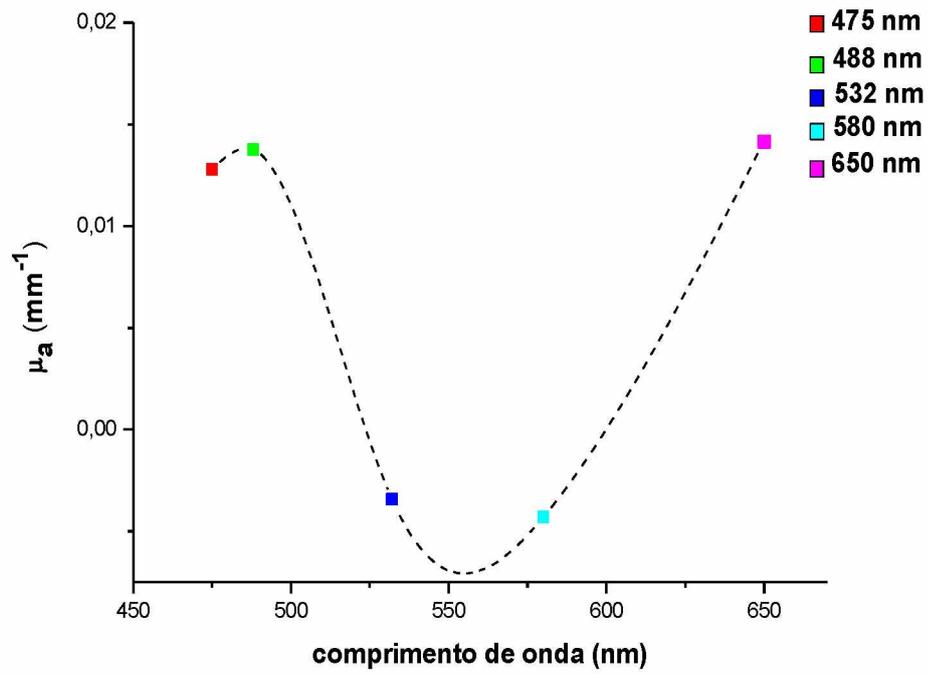


Figura 4. 12: Espectro de absorção do “Star Phantom” para $f_x = 0,1 \text{ mm}^{-1}$.

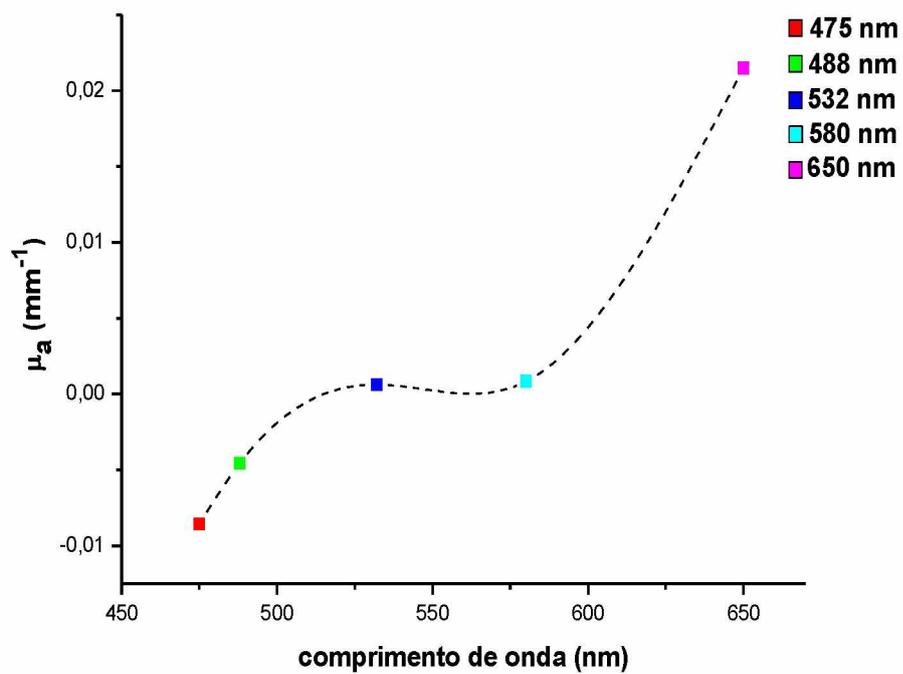


Figura 4. 13: Espectro de absorção do “Star Phantom” para $f_x = 0,3 \text{ mm}^{-1}$.

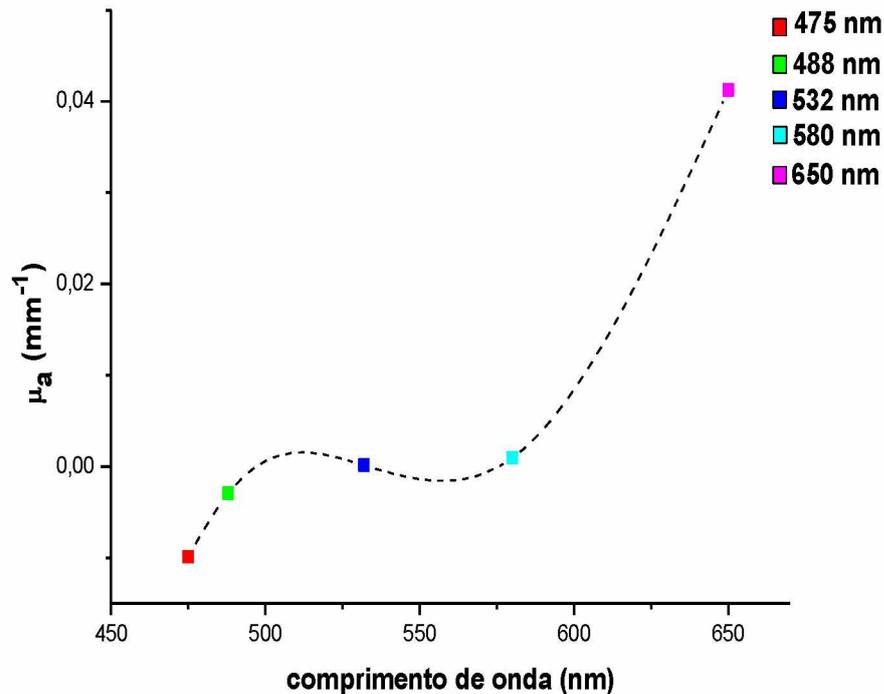


Figura 4. 14: Espectro de absorção do “Star Phantom” para (A) $f_x = 0,4 \text{ mm}^{-1}$.

Os espectros de absorção representados pela **Figura 4. 12**, **Figura 4. 13** e **Figura 4. 14** foram obtidos a partir de um ajuste linear e referem-se as três frequências espaciais utilizadas, sendo uma responsável por determinar os parâmetros ópticos em alta profundidade de penetração da luz ($f_x = 0,1 \text{ mm}^{-1}$), outra em média profundidade ($f_x = 0,3 \text{ mm}^{-1}$) e a última em baixa profundidade ($f_x = 0,4 \text{ mm}^{-1}$). Em ambos os espectros, verifica-se que o coeficiente de absorção da ZnPc, presente nas finas películas em forma de estrela, apresentam uma banda de absorção com intensidade máxima em 650 nm. Portanto, tomamos como referência para a determinação da profundidade nas diferentes frequências espaciais adotadas, medidas com comprimento de onda $\lambda = 650 \text{ nm}$.

Para o cálculo da profundidade de penetração da luz no fantoma foi usada a **Equação 2.32** da secção 2.5 deste trabalho, que se baseia nos valores de μ_a e μ'_s obtidos no processamento da imagem. O método utilizado foi a Difusão, pois ele apresentou valores mais exatos do que a look up table (lut). A **Tabela 4. 1** mostra os valores de μ_a , μ'_s e a profundidade encontrada para as diferentes frequências espaciais.

Tabela 4. 1: Valores de μ_a e μ'_s encontrados para as diferentes frequências espaciais em 650 nm e a profundidade de penetração da luz calculada. A frequência espacial de $0,1 \text{ mm}^{-1}$ foi tomada como um limite para começarmos a obter os parâmetros de absorção e espalhamento.

$f_x \text{ (mm}^{-1}\text{)}$	$\mu_a \text{ (mm}^{-1}\text{)}$	$\mu'_s \text{ (mm}^{-1}\text{)}$	$\delta \text{ (mm)}$
0,07	$(-0,21 \pm 0,02) \times 10^{-2}$	$3,09 \pm 0,27$	----
0,1	$(0,14 \pm 0,01) \times 10^{-1}$	$0,96 \pm 0,13$	4,92
0,3	$(0,21 \pm 0,04) \times 10^{-1}$	$1,04 \pm 1,55$	3,83
0,4	$(0,41 \pm 0,13) \times 10^{-1}$	$1,15 \pm 0,17$	2,60

Na **Tabela 4. 1**, verifica-se que o coeficiente de absorção para $f_x = 0,07 \text{ mm}^{-1}$ é um valor negativo, ou seja, $(-0,21 \pm 0,02) \times 10^{-2}$, o que resultaria em uma profundidade cujo valor é um número complexo e, portanto, podemos descartar a absorção nesta frequência espacial. Além disso, foram realizados vários procedimentos repetidos para frequências abaixo de $0,1 \text{ mm}^{-1}$ e não foram alcançados valores coerentes com a teoria para os coeficientes de absorção e espalhamento. Assim, subentende-se que este é um limite para a obtenção de dados e, como consequência, possivelmente seja inviável atingir os parâmetros ópticos nesta região.

Os gráficos da **Figura 4. 15** e **Figura 4. 16** representam como a absorção, o espalhamento e a profundidade de penetração da luz no phantom variam com a frequência espacial:

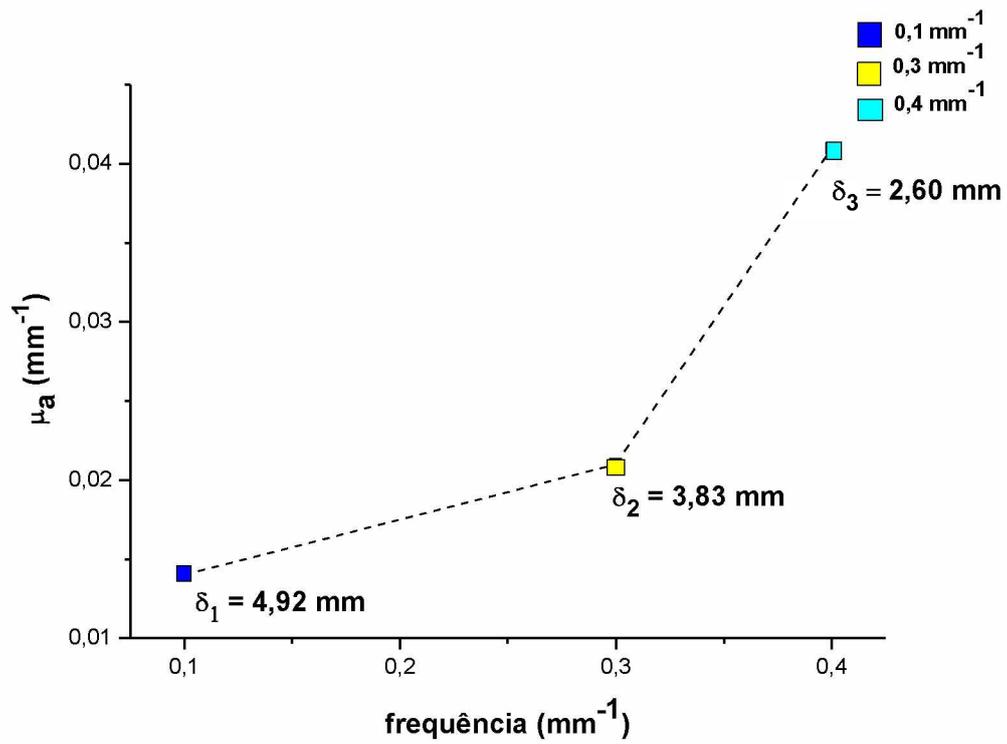


Figura 4. 15: Variação do coeficiente de absorção e da profundidade em função da frequência espacial.

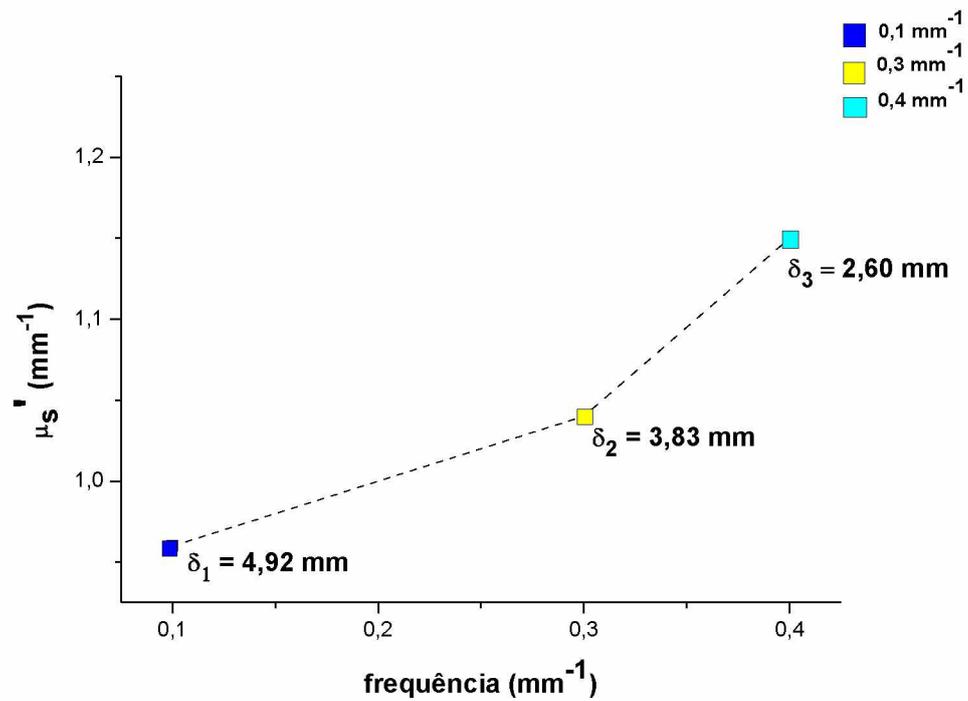


Figura 4. 16: Variação do coeficiente de espalhamento e da profundidade em função da frequência espacial.

De acordo com os gráficos da **Figura 4. 15** e **Figura 4. 16** observa-se que, quanto maior o valor da frequência espacial adotada, menores serão os coeficientes de absorção e espalhamento obtidos e, conseqüentemente, o feixe de luz alcançará níveis de penetração mais profundos. Estes dados mostram, portanto, que a absorção apresenta um decaimento exponencial com o aumento da profundidade de penetração da luz, como mostra o gráfico da **Figura 4. 17**:

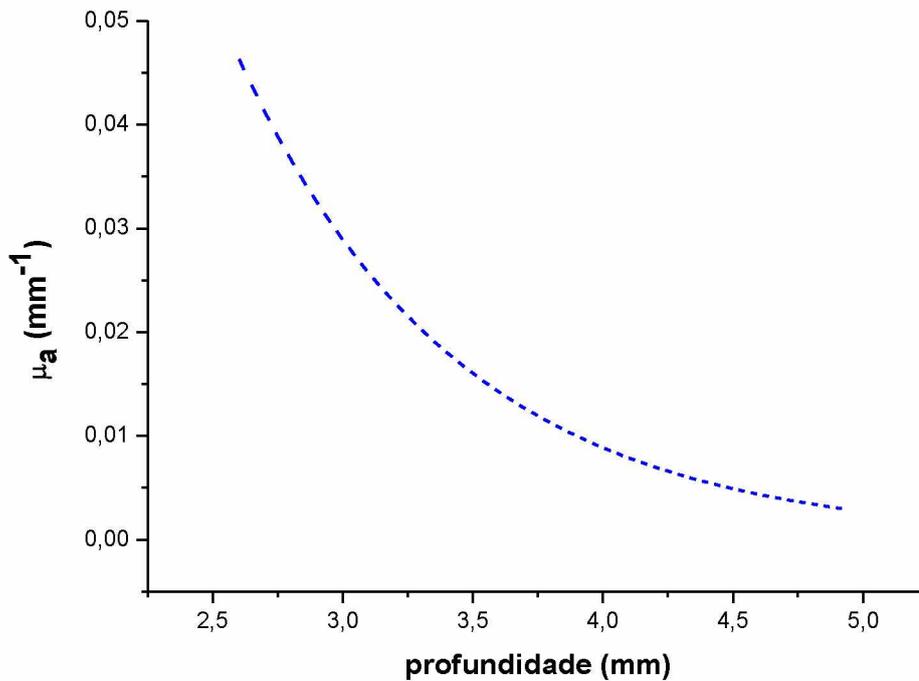


Figura 4. 17: O gráfico mostra o decaimento exponencial do coeficiente de absorção com o aumento da profundidade de penetração da luz.

O gráfico da **Figura 4. 17** foi obtido a partir de um ajuste de curva e juntamente com os valores da **Tabela 4. 1** demonstram que a técnica SFDI pode ser utilizada como método de processamento de imagem para o diagnóstico do tratamento de tumores e lesões no tecido epitelial. Além disso, observa-se que neste conjunto de frequências, aquela que melhor apresenta uma aplicação real no tecido epitelial seria a de $0,1 \text{ mm}^{-1}$, pois ela é capaz de fazer uma varredura em toda a extensão do tecido. Isto é possível, porque de acordo com a teoria a espessura do tecido epitelial varia de 0,5 a 4,0 mm e os dados experimentais deste trabalho demonstraram que a luz alcança uma profundidade de penetração que vai até $4,92 \text{ mm}^{-1}$.

Além disso, a **Figura 4. 17** também mostra que os dados alcançados estão de acordo com a **Equação 2.5** da secção 2.1.1.2 que descreve a Lei de Lambert- Beer, pois devido aos processos de absorção e espalhamento ocorre um decaimento da intensidade luminosa. A atenuação da intensidade luminosa depende da espessura do meio que a luz incide e da concentração molar da espécie absorvedora, sendo que quanto maior o caminho óptico percorrido pelo feixe de luz dentro do material, menores serão os coeficientes de absorção e espalhamento do meio (ATKINS; P., 2010).

4.3.2.2 IMAGENS PROCESSADAS DO “STAR PHANTOM”

Os resultados obtidos através do SFDI são baseados em cálculos computacionais e, portanto, estão sujeitos a transparecer as deformidades e ruídos referentes as imagens armazenadas. No entanto, constatamos que a câmera CCD sensível, com tamanho de 1024 x 1024 pixels, fornece imagens cuja qualidade possibilita obter com exatidão os valores de μ_a e μ_s .

O método de processamento de imagem utilizado foi a look up table, pois este ocorre a partir de uma tabela de referência baseada em Monte Carlo e, além disso, o motivo da escolha está relacionado ao tempo gasto de processamento para cada método. Enquanto levamos cerca de 15 minutos para processar em look up table, em difusão o tempo estimado é de 30 minutos e em Monte Carlo pode levar de horas até dias.

A **Figura 4. 18** mostra as imagens processadas do “*Star Phantom*” para o comprimento de onda de 650 nm e para as frequências de 0,07 mm⁻¹; 0,1 mm⁻¹; 0,3 mm⁻¹; 0,4 mm⁻¹. No Anexo II, no final deste trabalho estão presentes as imagens processadas deste fantoma para os demais comprimentos de onda utilizados.

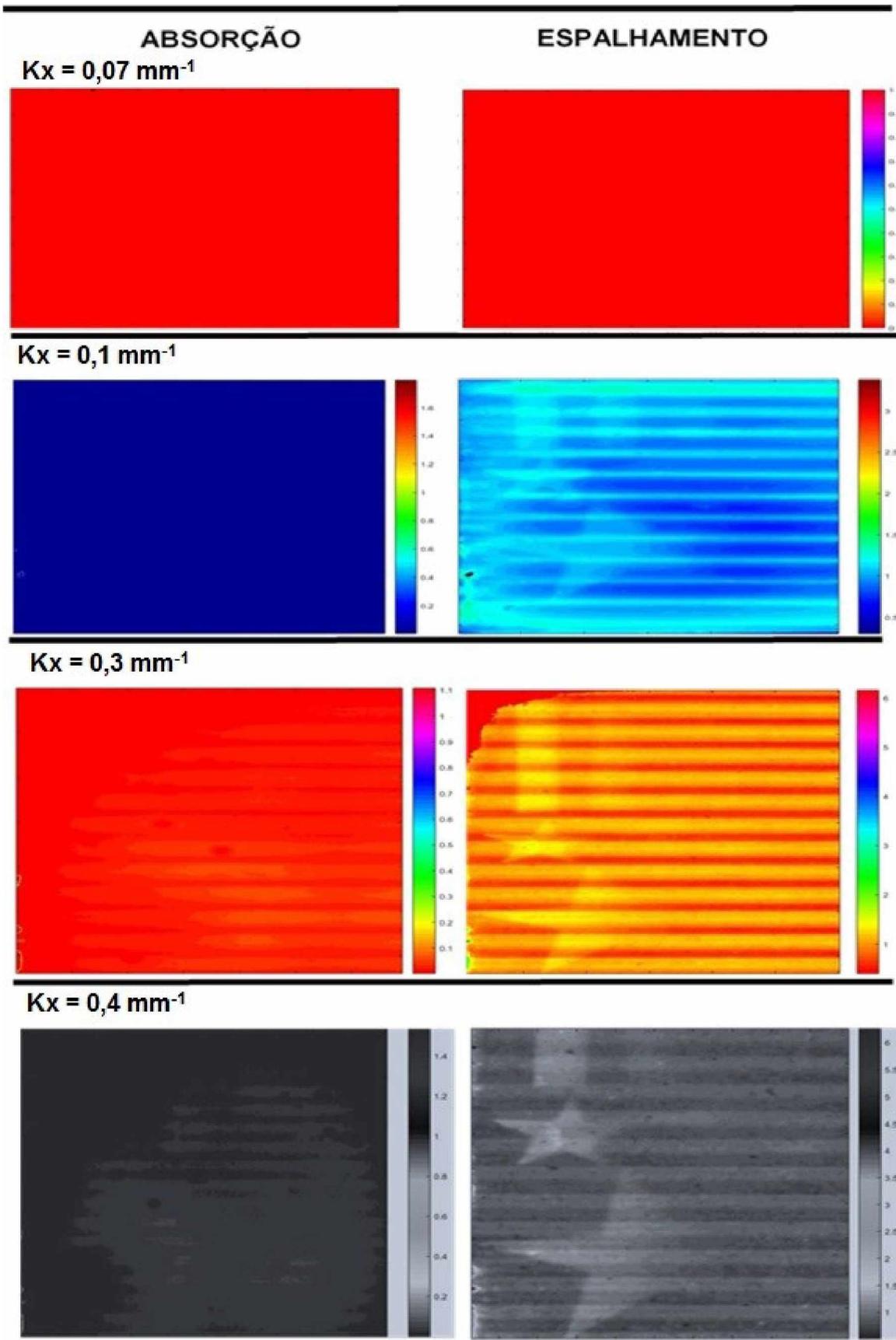


Figura 4. 18: Imagens do “Star Phantom” processadas em MATLAB no comprimento de onda de 650 nm e frequências espaciais de $0,07 \text{ mm}^{-1}$; $0,1 \text{ mm}^{-1}$; $0,3 \text{ mm}^{-1}$; $0,4 \text{ mm}^{-1}$.

Nas imagens processadas na **Figura 4. 18** verificamos que para a frequência espacial de $0,07 \text{ mm}^{-1}$ não há nenhuma imagem sendo formada. Isso acontece por causa da baixa absorção que está ocorrendo na região, como mostrado na **Tabela 4. 1**. Neste caso, como já falado anteriormente, o fato do valor da absorção no meio ser negativo, mostra que a luz não chega a alcançar este ponto e, portanto, não existe imagem a ser formada.

Para as demais imagens de $0,1 \text{ mm}^{-1}$; $0,3 \text{ mm}^{-1}$ e $0,4 \text{ mm}^{-1}$, observamos que quanto maior é a frequência espacial, maior é o contraste entre as regiões que apresentam PDMS, ZnPc e TiO_2 , gerando imagens com estrelas mais nítidas.

No entanto, somente conseguimos visualizar as estrelas nos mapas de espalhamento. Isto ocorre, porque no fantoma que simula o tecido biológico o espalhamento é sempre maior que a absorção. Isto implica que cada partícula de TiO_2 que compõe as estrelas e que está agindo como agente espalhador, após absorver a luz, ele a redireciona quebrando a homogeneidade do meio e, conseqüentemente, isto interfere no processo de absorção pela ZnPc também presente na região.

Assim, a partir das imagens processadas e dos valores de μ_a , μ'_s e da profundidade δ fornecidos pela **Tabela 4. 1**, observa-se que os feixes luminosos, quando submetidos a alta frequência espacial, apresentam elevado coeficiente de absorção e espalhamento, além de baixo poder de penetração. O contrário ocorre para as baixas frequências, onde o feixe de luz possui baixo poder de absorção e espalhamento e alta profundidade de penetração.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentada uma nova metodologia denominada Imagem no domínio da frequência espacial ou spacial frequency domain imaging (SFDI), que utiliza fantasmas como objeto de estudo. Estes simulam as propriedades ópticas do tecido biológico, como por exemplo, o tecido epitelial.

Devido a grande necessidade em desenvolver-se métodos de processamento de imagem para o diagnóstico de tumores e doenças infecciosas no tecido epitelial, o SFDI surge como uma técnica inovadora por não ser invasiva, ser de baixo custo e de fácil transporte.

Ao utilizar-se o SFDI foi possível obter os parâmetros de absorção e espalhamento reduzido de um feixe de luz emitido por uma lâmpada de halogêneo, localizada no interior de um projetor de luz.

Além do SFDI, também foi utilizado o método da esfera integradora, cujos resultados fornecidos, como μ_a e μ'_s , foram tomados como referência de comparação com os valores do SFDI.

Os resultados dos coeficientes de absorção e espalhamento reduzido, que foram obtidos no SFDI para o fantoma de ZnPc em diferentes concentrações, são equivalentes àqueles fornecidos pela esfera integradora, pois em ambos os casos, a absorção e o espalhamento são baixos em 457 nm e mais acentuados de 488 a 650 nm. Isto tornou possível o uso do SFDI para a realização do estudo da profundidade de penetração da luz em outro fantoma biológico que chamamos de "*Star Phantom*".

A determinação das frequências espaciais a serem utilizadas foi decisivo para a obtenção da profundidade de penetração do feixe luminoso no meio. Foi possível concluir que a frequência de $0,1 \text{ mm}^{-1}$ é um limite para a obtenção de dados, pois as frequências inferiores a ela não forneceram coeficientes de absorção e espalhamento positivos, tornando impossível encontrar a profundidade de penetração da luz na região. Além disso, esta frequência é a que melhor apresenta uma aplicação real no tecido epitelial, pois verificou-se que, ao utilizar-se o SFDI, o feixe de luz atinge uma profundidade de 4,92 mm para esta frequência, compatível com a espessura do tecido epitelial.

Os dados alcançados demonstram que, ao reduzirmos os valores da frequência espacial, os coeficientes de absorção e espalhamento da luz se tornam cada vez menores e, conseqüentemente, a profundidade de penetração da luz no meio será maior.

O SFDI demonstrou-se uma técnica eficiente para obtenção dos parâmetros ópticos de *fantomas* biológicos e para a determinação da profundidade de penetração da luz nos mesmos. Além de possibilitar o processamento da imagem através de códigos implementados no MATLAB.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos aqui descritos demonstraram que o SFDI pode ser eficiente como um método de processamento de imagem e diagnóstico de tumores e doenças no tecido epitelial. No entanto, este foi apenas um estudo introdutório que deve ser aperfeiçoado. Para isso, o equipamento SFDI deve ser aprimorado de modo a fornecer resultados de acordo com uma finalidade clínica.

Mais fantasmas de referência também deverão ser produzidos para fornecer uma boa calibração ao equipamento, além de fantasmas biológicos que simulem o tecido epitelial.

Estes resultados fornecem a base para futuras aplicações in vivo e o desenvolvimento de tomografia óptica utilizando o SFDI. No entanto, para que isso ocorra, será necessário aprimorar os códigos para o processamento de imagens que são implementados no MATLAB, a fim de tratar as imagens reduzindo as deformidades e ruídos presentes.

7 OUTROS TRABALHOS DESENVOLVIDOS

I. APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSOS:

CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

Certificamos que o trabalho de autoria(s) **Ana Caroline Moreira Mendes;ADAMO FERREIRA GOMES DO MONTE;Arnaldo Ferreira dos Reis;Luismar Barbosa da Cruz Junior**

Título do trabalho: **Utilização da técnica da imagem no domínio da frequência espacial para o estudo da profundidade de penetração da luz em fantoma óptico que simula o tecido epitelial**

foi apresentado na forma **Apresentação Poster** em **XXIII Congresso Brasileiro de Física Médica, IX Encontro Gaúcho de Física Médica e IV Simpósio Sul Brasileiro de Física Médica** realizado no Centro de Convenções Barra Shopping Sul, Porto Alegre, RS, Brasil de 06 a 08 de setembro de 2018.

Porto Alegre, 08 de setembro de 2018

Comitê Científico
XXIII Congresso Brasileiro de Física Médica
IX Encontro Gaúcho de Física Médica
IV Simpósio Sul Brasileiro de Física Médica

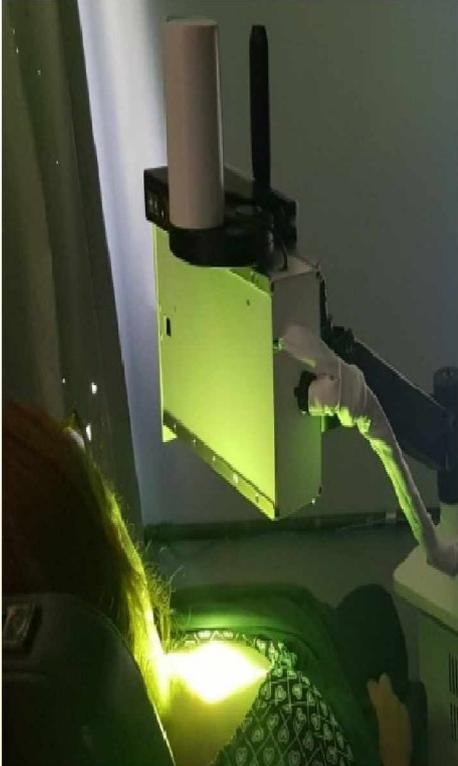
Autenticação: 796661174684178688

A autenticidade deste documento pode ser confirmada em: <http://cred30.siscone.com.br/Comprovantes/ValidaCertificado.aspx?Param=161,5>

II. SEMANA DE PREVENÇÃO AO CÂNCER DE PELE 2018:
DEZEMBRO LARANJA




COMBATE AO
CÂNCER DA PELE
#dezembrolaranja



**Estudo de diagnóstico precoce de
câncer de pele por luz**

Sábado 1º de Dezembro (9:00-17:00h)
Ambulatório de Dermatologia
Hospital de Clínicas de Uberlândia



INSTITUTO DE FÍSICA
Universidade Federal de Uberlândia



FÍSICA MÉDICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



LImF
Laboratório de Imagem e Fotônica



Hospital de Clínicas
de Uberlândia



UFU



Scan me

[https:// www.facebook.com/ groups/ 2338520719556129/](https://www.facebook.com/groups/2338520719556129/)

III. ARTIGOS

- **Mapping and quantification of gold nanoparticles in tissue simulating phantoms using spatial frequency domain imaging**

A. F. G. Monte, A. C. M. Mendes, A. F. Reis, and A. Antunes

Latin America Optics and Photonics Conference, OSA Technical Digest (2018), paper Tu2C.3. <https://doi.org/10.1364/LAOP.2018.Tu2C.3>

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKINS, P. W.; P., J. D. **Atkins' physical chemistry**. 9th. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2010.

BARBOSA DA CRUZ JUNIOR, L. **ANÁLISE DA ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO ÓPTICO EM PHANTOMS DE TECIDO BIOLÓGICO UTILIZANDO A TÉCNICA DE IMAGEM NO DOMÍNIO DE FREQUÊNCIA ESPACIAL**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

BIGIO, I. J.; MOURANT, J. R. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: Fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, n. 5, p. 803–814, 1997. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

BOHREN, CRAIG F. , HUFFMAN, D. R. **Absorption and Scattering by an Arbitrary Particle, Absorption and Scattering of Light by Small Particles**. [s.l: s.n.].

BOULNOIS, J. L. Photophysical processes in recent medical laser developments: A review. **Lasers in Medical Science**, v. 1, n. 1, p. 47–66, 1986. . <https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

CUCCIA, D. J. et al. Quantitation and mapping of tissue optical properties using modulated imaging. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 2, p. 024012, 2009. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>.

DE ANDRADE, A. G. et al. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica Effects of the therapeutic laser on the wound healing of burns: a bibliographic re. **Rev Bras Queimaduras**, v. 9, n. 1, p. 21–30, 2010.

DERGHAM, A. P. Distribuição dos diagnósticos de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de pele no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba * Distribution of diagnosis of neoplastic and pre neoplastic skin lesions at Evangelical Hospital in Curitiba. **Skin Cancer**, v. 79, n. 5, p. 555–559, 2002. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

DÖGNITZ, N.; WAGNIÈRES, G. Determination of tissue optical properties by steady-state spatial frequency-domain reflectometry. **Lasers in Medical Science**, v. 13, n. 1, p.55–65,1998. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

GROSSWEINER, L. I. **The Science of Phototherapy: an introduction**. [s.l.] Springer, 2005.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-Funcional**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2002.

HUNTER, J.; SAVIN, J.; DAHL, M. **Clinical Dermatology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2002.

JACINTO, C ; CATUNDA, T. ; JAQUE, D ; SOLÉ, J. G. **Heat generation with and**

without laser operation (at 1064 and 1340 nm) in Nd:YAG. São Paulo: SBF: 2005.
<https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. In: 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 358–370.

KOLLIAS, N. et al. Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging. **Journal of Investigative Dermatology**, v.111, p.776–780, 1998. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

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. **Applied Optics**, v.54, p.6118–6127, 2015. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

MONTE, A. F. G. et al. Mapping and quantification of gold nanoparticles in tissue simulating phantoms using spatial frequency domain imaging. **Optics InfoBase Conference Papers**, v. Part F123-, p. 3–4, 2018.
<https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

MOREIRA, N. R. P. **Estudo de várias propriedades mecânicas do polidimetilsiloxano (PDMS) usado em dispositivos biomédicos.** [s.l.] Escola Superior de Tecnologia e Gestão, 2013.

NIEMZ, M. H. **Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications.** [s.l.] Springer, 2004.

NORTON, S. J.; VO-DINH, T. Optoacoustic diffraction tomography: analysis of algorithms. **Journal of the Optical Society of America A**, 2003.
<https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. *Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular.* In: **Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 24, 2012.

SAMPAIO, A. P.; CASTRO, R. M.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia Básica.** 2. ed. São Paulo: Artes Médica, 1981.

SHARMA, D. et al. Active and passive control of zinc phthalocyanine photodynamics. **Faraday Discussions**, v. 163, n. July 2015, p. 433–445, 2013.
<https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; DEVORE, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. **Skin Research and Technology**, 2001.
<https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

SKOOG, D.; HOLLER; CROUCH. *Fundamentos de Química Analítica.* In: 8. ed. [s.l.] Editora Thomson, 2006. p. 0–50.

SOKOLIK, I. **Basic radiometric quantities. The Beer-Bouguer-Lambert law. Concepts of extinction (scattering plus absorption) and emission.** [s.l.] Schwarzschild's equation, 2005.

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

aplications. Research Gate, 2016.

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**, p. E42–E54, 2018. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/005>

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/10.1088/0031-9155/42/5/005>

Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>>. Acesso em: 21 jan. 2020.

WANG, L. V.; WU, H. I. **Biomedical optics: principles and imaging.** 1. ed. [s.l.] Wiley-Interscience, 2007.

9 ANEXO I

1) convert_HC1_data.m

```

% This is for converting the image data obtained by the HC1
system into
% ones for SFDI training source code
% AFGM 2018, february 28

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

color = {'457','488', '532', '580', '650'};
s_freq = {'0','100','200','300','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_HC1_data '\ ' name '_ExpTime.txt']);

for i = 1:5 % wavelengths {457, 488, 532, 580, 650}
    for j = 1:5 % spatial frequencies{0, 100, 200, 300, 400}
        for k = 1:3 % phases {0, 120, 240}
            temp = imread([dir_HC1_data '/' char(s_freq(j))
                '/' ...
                    char(color(i)) '_'
                char(phase(k)) '.tif']);
            if(img_size ~= size(temp))
                temp = imresize(temp,img_size,'bilinear');
            end
            HC1_image(:,:,k+3*(j-1)+15*(i-1)) = temp;

        end
    end
end

fid=fopen([dir_HC1_data '_raw'],'w');
fwrite(fid, HC1_image, 'single');
dir_HC1_data = [dir_HC1_data];
save(dir_HC1_data, 'img_size', 'int_time', '-ascii', '-tabs');
fclose(fid);

```

2) 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='lut'; % 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=8; % 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,'RawSFDIDa
ta/*.*');

% 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_HC1(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_HC1(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(LU
Tfreqsidx),n_sample);
else
%
[ave_op]=ave_fit_ops(cal_roi(:,:, :,freq.used),wv,freqs(freq.us
ed),n_sample,process.method,binsize);

```

```

    [op_fit_maps,
ave_op]=fit_ops(cal_roi(:, :, :, freq.used), wv, freqs(freq.used), n
_sample, process.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 5")
[spec_roi,
spec_roi_std, av_chrom, rect]=opticalspectra(op_fit_maps,
chrom_map, cal_roi, wv, binsize);

% average spectra for multiple ROIs... (a.k.a. "figure 6")
[reflec_roi,
reflec_roi_std, av_chrom, rect]=reflec(cal_reflectance,
chrom_map, cal_roi, freqs, binsize);

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

```

10 ANEXO II

Imagens processadas do “*Star Phantom*” para os diversos comprimentos de onda utilizados:

$f_x = 0,07 \text{ mm}^{-1}$

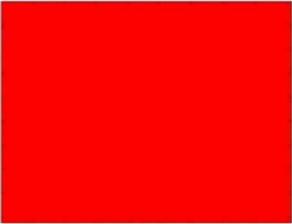
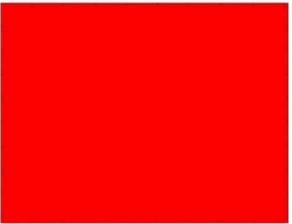
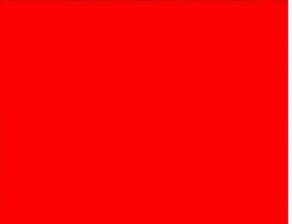
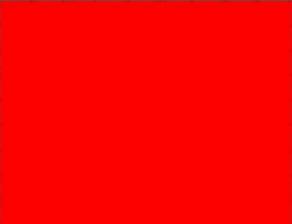
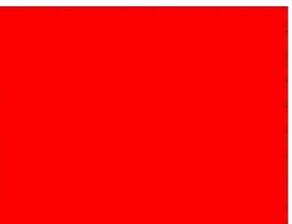
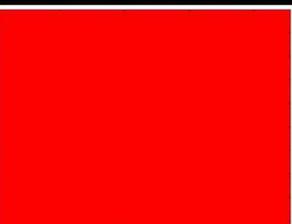
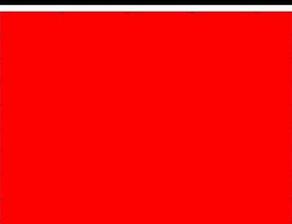
Comprimento de onda (nm)	Absorção	Espalhamento
457		
488		
532		
580		
650		

Figura 10. 1: Imagens do “*Star Phantom*” processadas em MATLAB para os comprimentos de onda de 457 a 650 nm e na frequência espacial de $0,07 \text{ mm}^{-1}$.

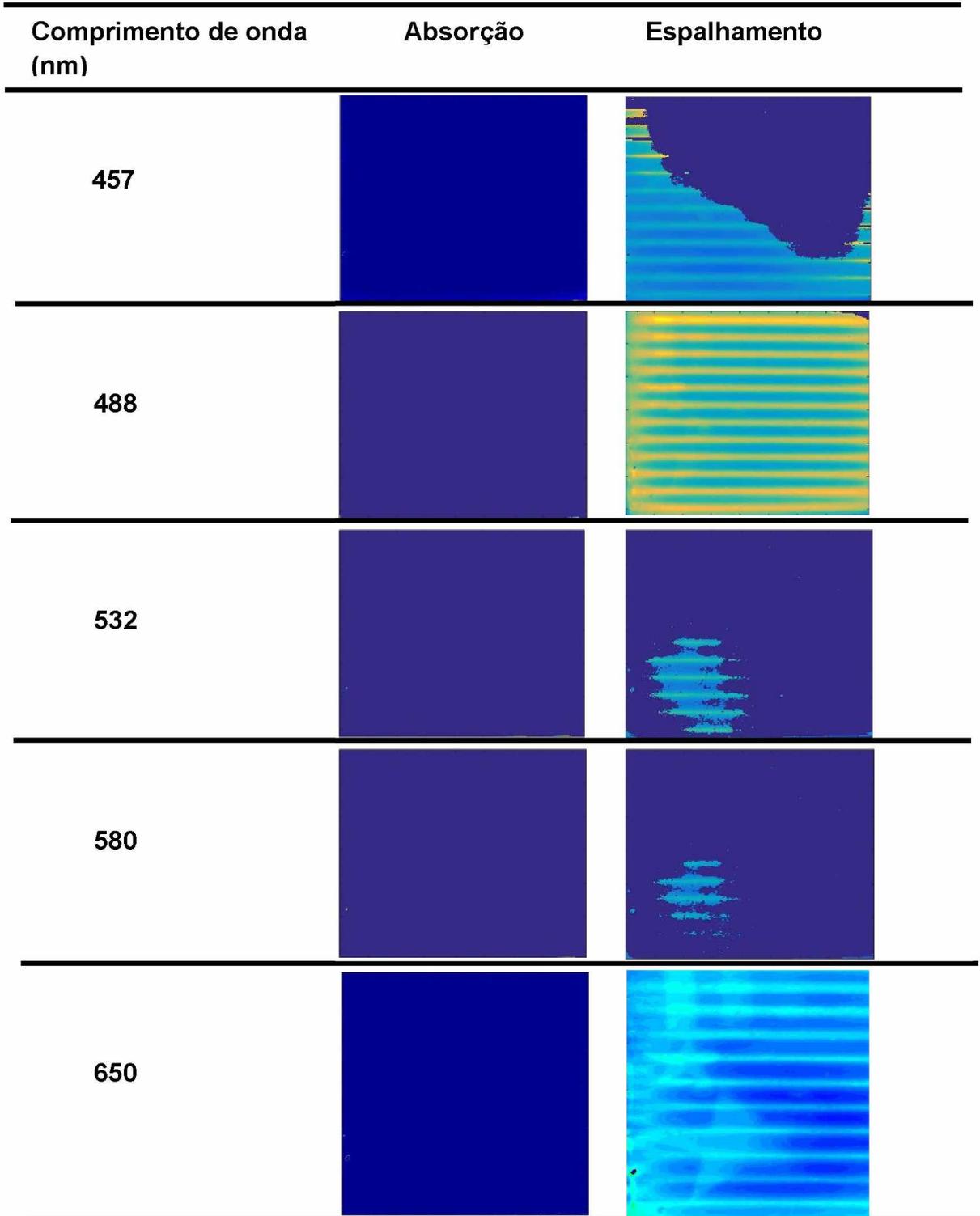
$f_x = 0,1 \text{ mm}^{-1}$ 

Figura 10. 2: Imagens do “Star Phantom” processadas em MATLAB para os comprimentos de onda de 457 a 650 nm e na frequência espacial de $0,1 \text{ mm}^{-1}$.

$f_x = 0,3 \text{ mm}^{-1}$

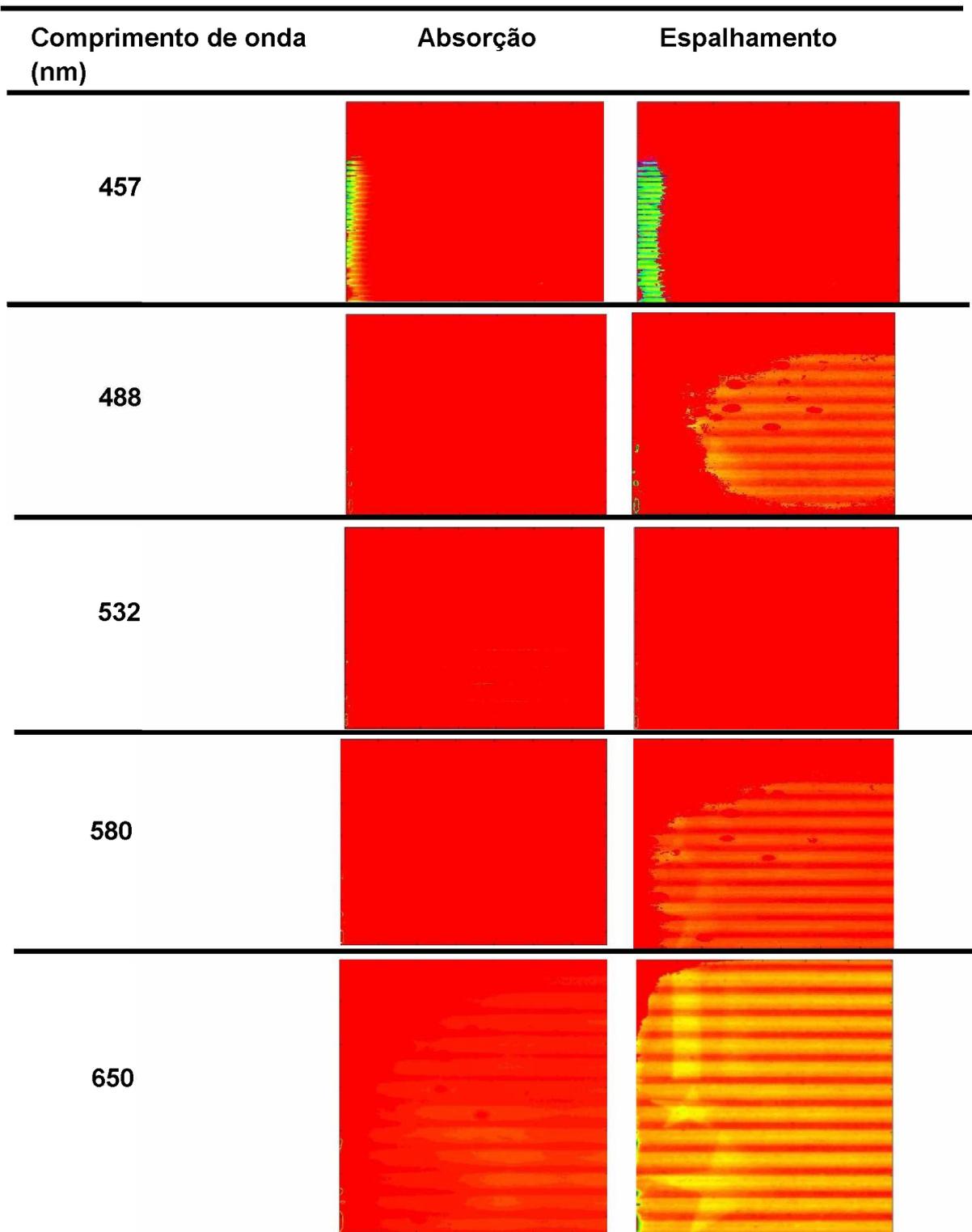


Figura 10. 3: Imagens do “Star Phantom” processadas em MATLAB para os comprimentos de onda de 457 a 650 nm e na frequência espacial de $0,3 \text{ mm}^{-1}$.

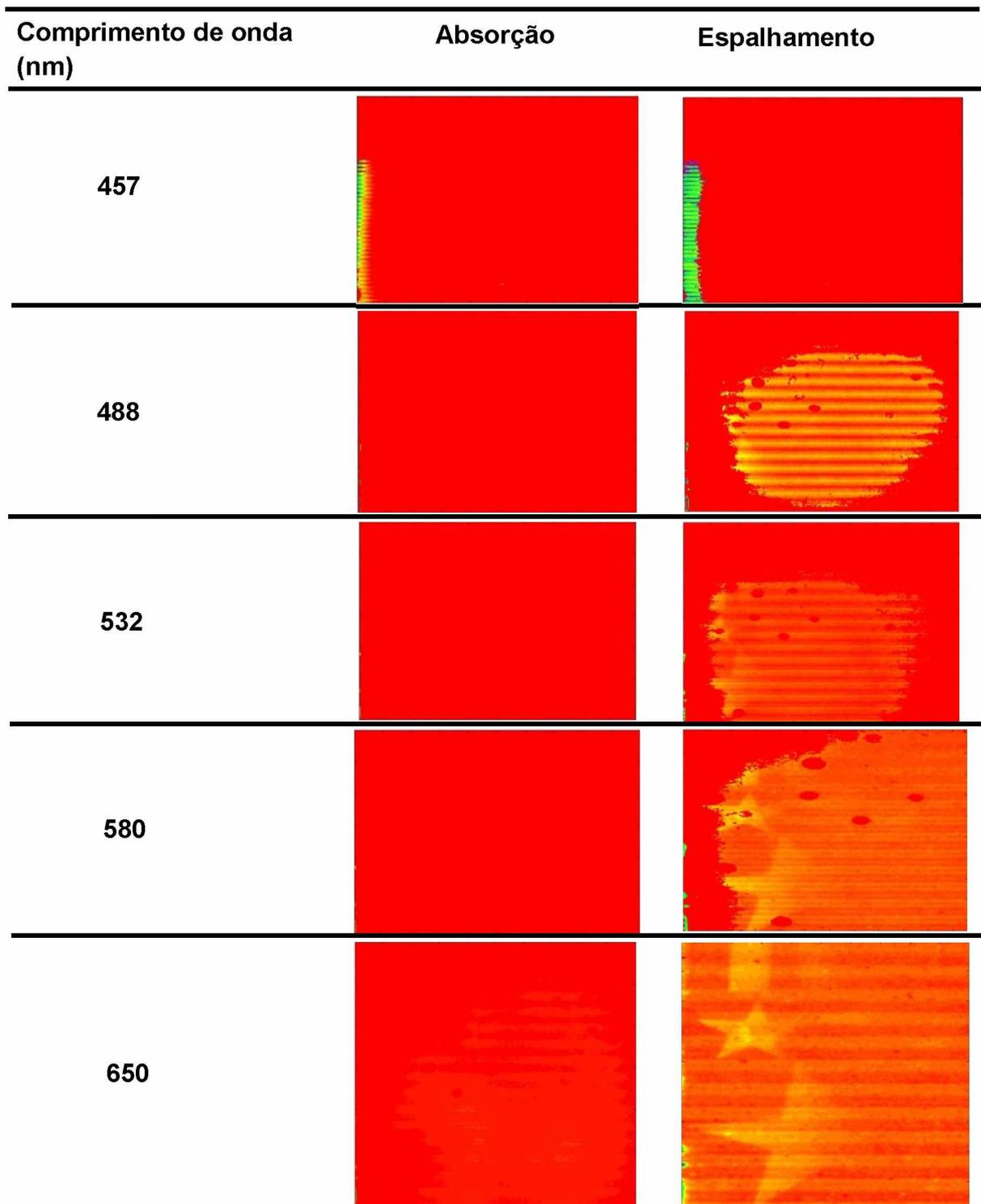
$f_x = 0,4 \text{ mm}^{-1}$


Figura 10. 4: Imagens do “Star Phantom” processadas em MATLAB para os comprimentos de onda de 457 a 650 nm e na frequência espacial de $0,4 \text{ mm}^{-1}$.