

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Arnaldo Ferreira dos Reis

ESTUDO DE FANTOMAS E TECIDOS BIOLÓGICOS POR MEIO DE MAPAS DE
ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO ÓPTICOS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE IMAGEM
NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA ESPACIAL

Uberlândia

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Arnaldo Ferreira dos Reis

**ESTUDO DE FANTOMAS E TECIDOS BIOLÓGICOS POR MEIO DE MAPAS DE
ABSORÇÃO E ESPALHAMENTO ÓPTICOS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE IMAGEM
NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA ESPACIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Física do Instituto de Física da Universidade Federal
de Uberlândia como parte dos requisitos para a
obtenção do título de doutor em Física.

Área de Concentração: Física da Matéria
Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Adamo Ferreira Gomes do
Monte.

Coorientador(a): Prof. Dr. Acácio Aparecido de
Castro Andrade

Uberlândia

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R375 Reis, Arnaldo Ferreira dos, 1985-
2019 Estudo de fantomas e tecidos biológicos por meio de mapas de absorção e espalhamento ópticos obtidos pela técnica de imagem no domínio da frequência espacial [recurso eletrônico] / Arnaldo Ferreira dos Reis. - 2019.

Orientador: Adamo Ferreira Gomes do Monte.

Coorientador: Acácio Aparecido de Castro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Física.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2245>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Física. I. Monte, Adamo Ferreira Gomes do , 1972-, (Orient.).
II. Castro, Acácio Aparecido de , 1970-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Física. IV.
Título.

CDU: 53

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



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

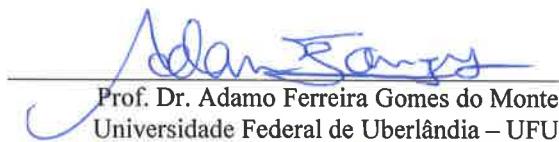


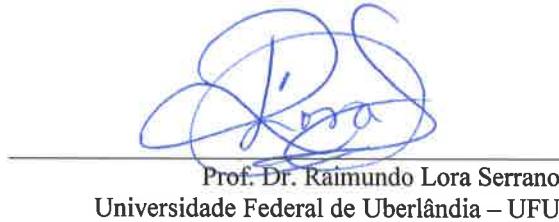
ARNALDO FERREIRA DOS REIS

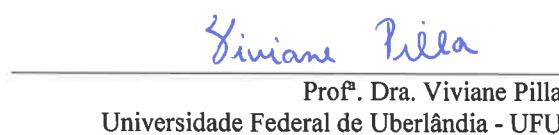
Tese apresentada a coordenação do Programa de Pós-graduação em física, do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Doutor em Física.

Uberlândia, 12 de Julho.

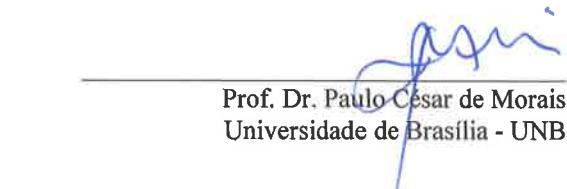
BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Dr. Raimundo Lora Serrano
Universidade Federal de Uberlândia – UFU


Profª. Dra. Viviane Pilla
Universidade Federal de Uberlândia - UFU


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


Prof. Dr. Paulo César de Moraes
Universidade de Brasília - UNB

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS pela força para atravessar os obstáculos todos os dias.

À minha mãe Célia Ferreira dos Reis (*in memorian*) pelo amor, educação e incentivos desde sempre.

À minha namorada Júlia da Costa Oliveira, pelo amor, carinho e compreensão nesta jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adamo Ferreira Gomes do Monte, por todas as oportunidades, apoio e presença assim demonstradas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório pela amizade sincera, companheirismo e solidariedade em todos os momentos.

Ao Instituto de Física pelo espaço físico, equipamentos e materiais necessários para a concretização deste projeto.

À CNPq, à Capes e FAPEMIG quanto à aprovação de projetos de pesquisa e pelo apoio financeiro, o que possibilitou toda a realização deste trabalho.

RESUMO

Quando detectado precocemente, o câncer de pele pode ter grandes chances de cura e uma das formas de diagnóstico atuais realizadas pelo médico dermatologista consiste na biópsia. Durante a realização deste exame, é coletada parte do tecido suspeito e este é encaminhado para um laboratório de anatomia patológica que emitirá o laudo de observação. Contudo, este processo é invasivo e negligencia a evolução da doença. Para contornar esses problemas, a presente pesquisa tem como objetivo propor uma nova metodologia para detecção do câncer de pele utilizando a técnica de imagem no domínio de frequência espacial (SFDI). Na parte teórica, a pesquisa embasou-se nos trabalhos de CUCCIA (2009), TUCHIN (2000), BODENSCHATZ (2015), entre outros. Em relação à técnica SFDI, esta consiste em um método óptico que utiliza geometria de campo largo e que é não invasivo e sem contato. Além disso, esta técnica é capaz de interrogar profundidades da pele de cerca de 1 a 5 mm e quantifica as concentrações de cromóforos clinicamente relevantes como a oxihemoglobina, deoxihemoglobina, lipídios, água e melanina por meio de mapas espaciais dos coeficientes absorção (μ_a) e espalhamento reduzido (μ'_s). Em relação à metodologia da presente pesquisa, o dispositivo SFDI desenvolvido consiste em um microprojetor de luz que é utilizado para projeções de padrões senoidais em diferentes frequências espaciais na superfície da amostra, de modo que a reflexão difusa proveniente é capturada usando uma câmera CCD que possui seis filtros para a seleção do comprimento de onda (530, 650, 680, 750, 780 e 810 nm). A técnica foi aplicada previamente no estudo de fantomas com propriedades ópticas semelhantes à de tecidos biológicos para calibração do equipamento e, posteriormente, na realização de medidas em *ex vivo* e *in vivo*. Os resultados obtidos por meio do SFDI foram comparados aos resultados obtidos de uma esfera integradora e mostraram-se satisfatórios para aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Coeficiente de Absorção; Coeficiente de Espalhamento; Pele humana; Reflexão difusa; SFDI.

ABSTRACT

When detected early, skin cancer can have great chances of cure and one of the current forms of diagnosis performed by dermatologist physicians consists of biopsy. Therefore, during this exam, part of the suspicious tissue is collected and then it is sent to a pathological anatomy laboratory, where the observation report will be issued. However, this process is invasive and neglects the evolution of the disease. In order to overcome these problems, this research aims to propose a new methodology to detect skin cancer using the Spatial Frequency Domain Imaging technique (SFDI). In the theoretical part, the present research was based on CUCCIA (2009), TUCHIN (2000), BODENSCHATZ (2015), and others. In relation to the SFDI technique, it consists in an optical method that uses wide field geometry and which is non-invasive and non-contact. In addition, this technique is capable of interrogate skin depths of about 1 to 5 mm and quantifies the concentrations of clinically relevant chromophores such as oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, lipids, water and melanin by spatial maps of the absorption coefficient (μ_a) and reduced scattering coefficient (μ'_s). Regarding the research methodology, the developed SFDI device consists in a light microprojector which is used for projections of sinusoidal patterns at different spatial frequencies on the sample surface, so that the diffuse reflection that comes is captured using a CCD camera which has six filters for the wave length selection (530, 650, 680, 750, 780 and 810nm). The technique was previously applied in the study of phantoms as optical properties similar to those of the biological tissues for equipment calibration and, subsequently, in the measures in *ex vivo* and *in vivo*. The results obtained by the SFDI were compared to the results obtained from an integrating sphere and were satisfactory for biomedical applications.

Keywords: Absorption Coefficient; Reduced Scattering Coefficient; Human skin; Diffuse reflection; SFDI.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estimativas para o ano de 2018 de casos novos de câncer por 100 mil habitantes, segundo sexo e localização primária (RETROPERITONEAIS, 2018).....	22
Figura 2: Estágio do avanço do câncer de pele tipo melanoma e seu aprofundamento no tecido biológico (WINSLOW, 2008)	23
Figura 3: A pele humana e suas camadas (Adaptado de HOFFMAN, 2014).	26
Figura 4: Esquema ilustrativo da interação da luz com a pele humana (tecido biológico) (Adaptado de UMAPATHY; PREMKISHORE; MITHESH, 2013).	27
Figura 5: (a) como a reflexão e refração na interface ar/tecido e (b) como a reflexão especular e difusa (Adaptado de NIEMZ, 2007)	29
Figura 6: Possíveis processos de transferência de energia intramolecular (Adaptado de LAKOWICZ, 2006).	31
Figura 7: Diminuição da intensidade devido à absorção, conforme especificado pela Lei de Lambert-Beer.....	33
Figura 8: Espectros de absorção da oxihemoglobina (HbO_2), deoxihemoglobina (Hb) e água (H_2O). É possível verificar que a absorção é comparativamente baixa na faixa de comprimento de onda de 650 nm a 950 nm, cuja região é denominada de “janela biológica” (Adaptado de BÖCKLIN, 2014).	35
Figura 9: Regiões espectrais de absorção para cromóforos da pele e do tecido biológico (Adaptado de TUCHIN, 2016).....	36
Figura 10: Coeficiente de extinção da hemoglobina (Adaptado de JACQUES; PRAHL, 1998).	38
Figura 11: Espectro de absorção da água (Adaptado de NACHABÉ, 2012).....	39
Figura 12: Coeficiente de absorção do lipídio (Adaptado de NACHABÉ, 2012).	40

Figura 13: Espectro de absorção da melanina e seus componentes (Adaptado de JACQUES, 2001).....	41
Figura 14: Projeção de luz incidente sobre uma partícula de formato esférico (idealizada), cuja seção de choque geométrica é A e a seção de choque efetiva é representada por σ_s (Adaptado de JACQUES, S. L. ; PRAHL, 2018).....	42
Figura 15: Quando uma radiação incidente atinge uma partícula com tamanho inferior ao comprimento de onda (λ), tem-se a) como exemplificação do espalhamento Rayleigh. Quando o tamanho da partícula é próximo ou maior do λ , há o espalhamento Mie em b). (Adaptado de KIM; CHANG, 2017).....	44
Figura 16: Espalhamento Isotrópico e Anisotrópico.....	45
Figura 17: Exemplo de protótipo de um tecido hepático com sistema vascular, onde um fantoma foi utilizado em uma investigação de contraste experimental por ultrassonografia intravenosa (SANNINO, 2018).....	46
Figura 18: Imagens dos fantomas de um rim feitos de diferentes materiais (frente e verso): (a) elastômero de silicone, (b) gel de agarose, (c) polidimetilsiloxano ou silicone (doravante PDMS) (ADAMS et al., 2017)	47
Figura 19: Estrutura das Ftalocianinas (PRASAD, 2003).....	49
Figura 20: Espectro de absorção e fluorescência do corante Zinco Ftalocianina (ZnPc) no solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) (SHARMA et al., 2013).....	50
Figura 21: Espectro de absorção de nanopartículas de Au nas dimensões de 10, 20 e 50 nm (Adaptado de ABDELHALIM; M. MADY, 2012).....	51
Figura 22: Exemplo do limite da resolução em um alvo circular (STACK, 2010).....	58
Figura 23: Na imagem (a), o contraste consiste na diferença de intensidade entre claro e escuro. Em (b), os pontos no topo da figura podem ser entendidos como visualizados através de uma lente, de modo que se os pontos aproximarem o contraste diminui (Adaptado de STACK, 2010).....	58

Figura 24: A imagem de uma fonte pontual formada por um sistema óptico, onde temos a chamada "Função de espalhamento pontual" (PSF). É importante observar que a imagem é afetada pela difração (Adaptado de GATINEL, 2018).....	59
Figura 25: Técnica de varredura de superfície de microluminescência definida com uma imagem de luminescência da solução de corante Neutral Red e CdSe / ZnS em clorofórmio, obtida por uma câmera CCD (Adaptado de REIS; MONTE; ALVES, 2018).....	60
Figura 26: Alvo de onda senoidal variando em diferentes frequências espaciais (BOREMAN, 2001).....	61
Figura 27: O efeito do aumento da frequência espacial em 20 lp/mm em contraste da imagem em um sistema óptico (Adaptado de SPRING; DAVIDSON, 2018).....	62
Figura 28: O efeito do aumento da frequência espacial em 508 lp/mm em contraste da imagem em um sistema óptico (Adaptado de SPRING; DAVIDSON, 2018).....	62
Figura 29: O efeito do aumento da frequência espacial em 1000 lp/mm em contraste da imagem em um sistema óptico (Adaptado de SPRING; DAVIDSON, 2018).....	63
Figura 30: A qualidade real da imagem está diretamente relacionada à curva MTF integrada entre o número de pl/mm e a resolução limite, o que significa que a riqueza da informação contida na imagem é uma função da área abaixo da curva MTF (Adaptado de HEGGIE; LIDDELL; MAHER, 1997)	64
Figura 31: O transporte da luz pode ser medido temporalmente ou espacialmente, sendo no domínio real ou no domínio da frequência. Dessa forma, é importante ressaltar que o domínio real equivale ao domínio da frequência por meio da transformada de Fourier (Adaptado de CUCCIA et al., 2009).....	65
Figura 32: (a) Uma fonte de luz modulada cria temporalmente um onda de densidade de fótons que sofre atenuação no tecido e em (b), o sinal detectado sofre diminuição na sua amplitude e atraso de fase $A(r, \omega)$ em relação à fonte incidente (Adaptado de O'SULLIVAN et al., 2012).....	66

Figura 33: Exemplificação da propagação dos fótons no interior do tecido, em que S corresponde à fonte, D ao detector e ρ é a distância fonte-detector. A área curva em cinza é a “banana fóton”, atravessada pelas trajetórias dos fótons no tecido biológico (MARTINI; CORVAGLIA, 2018)	67
Figura 34: Esquema da fonte de iluminação projetada apenas na direção x e a taxa de fluência interna modulada resultante com a mesma frequência e fase (Adaptado de CUCCIA et al., 2009).....	69
Figura 35: Esboço da montagem da técnica de imagem no domínio da frequência espacial, utilizada para projeção oblíqua de padrões senoidais (Adaptado de BODENSCHATZ et al., 2015).....	72
Figura 36: Modulação e demodulação da refletância difusa de um fantoma contendo camadas de ouro em diferentes concentrações.....	74
Figura 37: Esquema da refletância modulada (a) e (b), equivalente às amplitudes demoduladas das componentes AC e DC (Adaptado de CUCCIA et al., 2009)	75
Figura 38: <i>Look up table</i> de dois componentes da refletância R_d (AC) e R_d (DC) gerada por meio do modelo de difusão utilizado como exemplo. Nota-se que, para R_{AC} ($f_x = 0.05$) = 0.06 e R_{DC} ($f_x = 0.05$) = 0.55, obtemos, então, $\mu_a \approx 0.03$ e $\mu S' \approx 1.4$ (Adaptado de CUCCIA et al., 2009).....	77
Figura 39: Representação esquemática do equipamento da técnica de SFDI. Em (1) está representado o projetor; em (2) a amostra; em (3) a roda de filtros; e em (4) a câmera de captura das imagens (Adaptado de NADEAU et al., 2013)	78
Figura 40: A caixa contendo todos os componentes ópticos e eletrônicos foi propositalmente fixada a um trilho na direção vertical, pois havia em mente aplicações clínicas para o SFDI. 80	
Figura 41: Vista da face do aparelho SFDI com abertura para projeção de luz. Um pouco acima há a roda de filtros isolada dentro de um sistema automatizado da Thorlabs.....	81

Figura 42: Visão superior da parte principal do equipamento SFDI, onde contém a câmera, o projetor de luz e a roda de filtros. As setas em amarelo representam a incidência de luz enquanto que a cor laranja consiste na reflexão da amostra.....	81
Figura 43: (a) Equipamento completo do SFDI contendo o braço com os instrumentos para aquisição de imagens, acoplado ao carrinho onde as imagens são analisadas e processadas em (b), que é o braço móvel contendo o sistema de projeção e captura de imagens.	82
Figura 44: Captação de imagens da face esquerda de uma pessoa utilizando o aparelho.....	82
Figura 45: (a) Visão frontal do equipamento; (b) Visão da parte de trás e superior do equipamento de forma que é possível identificar a roda de filtros e a câmera CCD de maneira mais nítida que a anterior.....	83
Figura 46: Segundo protótipo desenvolvido para tornar-se fixo para a pesquisa. A seta na cor amarela representa a incidência da luz no fantoma, enquanto que a seta na cor laranja equivale à reflexão.	84
Figura 47: Medidas padrões dos fantomas fabricados em laboratório.	85
Figura 48: Os fantomas expostos na imagem contêm diferentes características, sendo que as propriedades de absorção, espalhamento e profundidade foram variadas propositalmente, cuja intenção era a de simular as propriedades de um tecido biológico.	86
Figura 49: (a) Fantomas PC10 (à esquerda) e NOV10 (à direita). Em (b) é possível visualizar a fina camada que recobre os fantomas anteriores de modo a simular as camadas da pele.	87
Figura 50: Visualização do fantoma STAR: a) visão em perspectiva do fantoma; (b) vista da superfície superior; e (c) momento em que o fantoma é posicionado contra a luz. Os números 1, 2, 3 e 4 indicam a localização de diferentes objetos no fantoma.....	88
Figura 51: Fantomas utilizados como referência nas medidas do SFDI, de forma que suas propriedades ópticas são conhecidas e utilizadas para determinar os parâmetros ópticos de tecidos biológicos e fantomas.....	89

Figura 52: Esfera de integração sem detector, cujas dimensões são de 61 x 61 x 65 mm e seu diâmetro é de 2" (HEAD, 2010).....	90
Figura 53: (a) Vista superior da esfera integradora com indicação das portas A e B utilizadas para posicionar as amostras; (b) Visão da porta A utilizada para medidas de transmitância; e (c) Visão da porta B usada para medidas de refletância.....	91
Figura 54: Vista do aparato experimental, incluindo a mesa óptica e demais instrumentos necessários para a realização das medidas de transmitância e reflexão na esfera integradora.	92
Figura 55: Filtros de interferência passa-banda utilizados durante a pesquisa.....	94
Figura 56: Imagem correspondente ao painel frontal da interface do LabVIEW desenvolvido para a técnica SFDI.....	96
Figura 57: Imagem original e projeção tridimensional do fantoma PC10, que contém pequenas camadas com diferentes concentrações de zinco ftalocianina (ZnPc) depositadas sobre a matriz de PDMS.....	98
Figura 58: Comparação do espectro de absorção óptica do cromóforo zinco Ftalocianina (ZnPc) em três meios diferentes: clorofórmio (CLF), dimetilsulfóxido (DMSO) e polidimetilsiloxano (PDMS).	100
Figura 59: Imagens capturadas a partir do fantoma PC10 pelo programa LabVIEW onde foi selecionado e mantido o comprimento de onda correspondente a $\lambda=500$ nm para todas as frequências espaciais e fases escolhidas.	102
Figura 60: Imagem original e projeção tridimensional do fantoma NOV10, que contém pequenas camadas com diferentes concentrações de nanopartículas (Au) depositadas sobre a matriz de PDMS.	104
Figura 61: Comparação do espectro de absorção óptica do cromóforo ouro (Au) em dois meios diferentes: Solução tampão de fosfato-salino (PBS) e polidimetilsiloxano (PDMS)..	106

Figura 62: Imagens capturadas a partir do fantoma NOV10 pelo programa LabVIEW, onde foi selecionado e mantido o comprimento de onda correspondente a $\lambda=500$ nm para todas as frequências espaciais e fases escolhidas.....	108
Figura 63: Imagem original e projeção tridimensional do fantoma STAR, que contém estruturas internas no formato de estrelas e barras dispostas diagonalmente na matriz de PDMS.....	109
Figura 64: Imagens capturadas a partir do fantoma STAR pelo programa LabVIEW, onde foi selecionado e mantido o comprimento de onda correspondente a $\lambda=500$ nm para todas as frequências espaciais e fases escolhidas.....	111
Figura 65: Esquema de obtenção e processamento de imagens pela técnica SFDI.	112
Figura 66: Mapas de absorção e espalhamento representados em duas colunas distintas e filtrados por diferentes comprimentos de onda (λ), cujo objeto é detectar o cromóforo zinco ftalocianina pelo método da difusão.....	115
Figura 67: Curvas dos coeficientes de absorção e espalhamento reduzido em função do comprimento de onda e medidas em diferentes regiões do fantoma PC10.	116
Figura 68: Mapas de absorção e espalhamento representados em duas colunas distintas e filtrados por diferentes comprimentos de onda (λ), cujo objeto é detectar o cromóforo ouro (Au) pelo método da difusão.	119
Figura 69: Curvas dos coeficientes de absorção e espalhamento reduzido em função do comprimento de onda medidos em diferentes regiões do fantoma NOV10.....	120
Figura 70: Mapas de absorção e espalhamento do fantoma STAR representados em duas colunas distintas, filtrados em diferentes comprimentos de onda (λ) e processados pelo método da difusão, cujo objeto é detectar o cromóforo zinco ftalocianina (ZnPc).....	123
Figura 71: Principais fantomas utilizados neste trabalho: (a) PDMS, (b) PDMS + ZnPc e (c) PDMS + Au. Observação: o fantoma (a) está mais escuro devido à superfície na qual a fotografia foi capturada.	125

Figura 72: Espectros dos coeficientes de absorção em função do comprimento de onda para as camadas do fantoma PC10 na matriz de PDMS com diferentes concentrações de ZnPc.	127
Figura 73: Espectros dos coeficientes de espalhamento reduzido em função do comprimento de onda para as camadas do fantoma PC10.....	128
Figura 74: Comparação entre os espectros de absorção e espalhamentos do fantoma PC10 na camada C1 obtida a partir da esfera integradora.	129
Figura 75: Espectros dos coeficientes de absorção em função do comprimento de onda para as camadas do fantoma NOV10 na matriz de PDMS com diferentes concentrações de Au.	131
Figura 76: Espectros dos coeficientes de espalhamento reduzido em função do comprimento de onda para as camadas do fantoma NOV10.	132
Figura 77: Comparação entre os espectros de absorção e espalhamento do fantoma NOV10 na camada Au2 obtida a partir da esfera integradora.	133
Figura 78: Banner de divulgação da campanha nacional de prevenção ao Câncer da Pele em Uberlândia-MG.....	135
Figura 79: Paciente do sexo masculino de 52 anos, encaminhado com suspeita de carcinoma basocelular (CBC) no lado esquerdo da face e na região esquerda do antebraço.	138
Figura 80: Paciente do sexo masculino de 61 anos, encaminhado com suspeita de um melanoma em diversas regiões do corpo, especificamente na região do peito e das costas. .	138
Figura 81: Paciente do sexo feminino de 46 anos, encaminhada com suspeita de carcinoma espinocelular (CEC) no lado esquerdo da região superior das costas.	139
Figura 82: Paciente do sexo masculino de 68 anos, encaminhado com suspeita de carcinoma basocelular (CBC) no lado direito na região do ombro.....	139
Figura 83: Paciente do sexo feminino de 41 anos, encaminhada com suspeita de um câncer não-melanoma na região esquerda da face.....	140

Figura 84: (a) Foto lateral do pescoço do Paciente X contendo marcas de uma cirurgia de câncer de pele e (b) Região de interesse a ser analisada pelo SFDI onde há uma provável protuberância de aspecto cancerígeno.	141
Figura 85: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo oxihemoglobina.	143
Figura 86: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo deoxihemoglobina.....	144
Figura 87: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo água (H ₂ O).	145
Figura 88: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo lipídeo.	146
Figura 89: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo melanina.	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias usadas para fabricação dos principais fantomas.....	87
Tabela 2: Quantidades utilizadas para a fabricação dos fantomas de referência.....	89
Tabela 3: Quantidade utilizada para a confecção das camadas utilizadas na fabricação do fantoma PC10.....	99
Tabela 4: Quantidades utilizadas para a confecção das camadas utilizadas na fabricação do fantoma Au.....	105
Tabela 5: Quantidades utilizadas para a confecção das camadas utilizadas na fabricação do fantoma STAR.....	110
Tabela 6: Valores dos coeficientes de absorção (mm^{-1}) e espalhamento reduzido (mm^{-1}) obtidos pela técnica de SFDI para o fantoma PC10 em diferentes comprimentos de onda (λ).	117
Tabela 7: Valores de absorção (mm^{-1}) e espalhamento reduzido (mm^{-1}) obtidos pela técnica de SFDI para amostra NOV10.	121
Tabela 8: Valores dos índices de refração para os fantomas anteriormente mencionados....	125
Tabela 9: - Valores de absorção (mm^{-1}) e espalhamento reduzido (mm^{-1}) obtidos pela técnica de SFDI para o fantoma PC10.....	130
Tabela 10: Valores de absorção (mm^{-1}) e espalhamento (mm^{-1}) obtidos pela técnica de SFDI para o fantoma NOV10.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

H_2O	Água
a	Albedo óptico
θ'	Ângulo de incidência
θ	Ângulo de reflexão
l_a	Caminho livre médio de absorção ou comprimento de absorção
l_s	Caminho livre médio de espalhamento
CLF	Clorofórmio
μ_a	Coeficiente de absorção
μ_t	Coeficiente de atenuação total
D	Coeficiente de difusão
μ_s	Coeficiente de espalhamento
μ_s'	Coeficiente de espalhamento reduzido
R_{eff}	Coeficiente de reflexão efetivo
μ_{tr}	Coeficiente de transporte
AC	Componente modulada espacialmente AC
DC	Componente planar
λ	Comprimento de onda
Hb	Deoxihemoglobina
DMSO	Dimetilsulfóxido
TiO_2	Dióxido de titânio
Diff	Equação aproximada da difusão
ETR	Equação de transferência radioativa
τ	Espessura óptica
g	Fator de anisotropia
f_x	Frequência espacial
PSF	Função de espalhamento pontual
s-PSF	Função de espalhamento pontual espacial
t-PSF	Função de espalhamento pontual temporal
MTF	Função de transferência de modulação

s-MTF	Função de transferência de modulação espacial
t-MTF	Função de transferência de modulação temporal
SFDI	Imagen no domínio da frequência espacial
n	Índice de refração
NIR	Infravermelho próximo
Lip	Lipídios
l_t	Livre caminho médio total
Mel	Melanina
IAD	Método <i>Inverse adding-doubling</i>
$m(x)$	Modulação
Au	Ouro (Au)
Al_2O_3	Óxido de Alumínio
HbO_2	Oxihemoglobina
μ	Permeabilidade
ε	Permissividade
PDMS	Polidimetilsiloxano
M_0	Profundidade de modulação
R_d	Refletância difusa
R	Reflexão
UV	Região do ultravioleta
VIS	Região do visível
σ_s	Seção de choque efetiva
A	Seção de choque geométrica
φ	Taxa de fluência
TD	Teoria da difusão
PDT	Terapia fotodinâmica
T	Transmitância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Objetivos.....	25
1.1.1 Objetivos gerais	25
1.1.2 Objetivos específicos.....	25
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
2.1 Propriedades ópticas de tecidos biológicos.....	26
2.2 Reflexão e Refração na interface do tecido biológico	28
2.3 Absorção	31
2.4 Cromóforos	35
2.4.1 Oxihemoglobina (HbO₂) e Deoxihemoglobina (Hb)	37
2.4.2 Água (H₂O)	38
2.4.3 Lipídios (Lip)	39
2.4.4 Melanina (Mel)	40
2.5 Espalhamento.....	41
2.6 Fantomas	46
2.6.1 Nanopartículas de Zinco Ftalocianina (ZnPc)	48
2.6.2 Nanopartículas de ouro (Au)	50
2.7 O transporte da luz em tecidos biológicos	51
2.8 Equação transporte radiativo (ETR)	53
2.9 Aproximação pela equação de Difusão.....	55
3. IMAGEM NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA ESPACIAL (SFDI)	57
3.1 Fatores que influenciam na qualidade da imagem	57
3.2 A função de espalhamento pontual (PSF).....	59
3.3 A função de transferência de modulação (MTF)	60
3.4 Medidas resolvidas temporalmente e espacialmente.....	64
3.5 Aproximação da equação de difusão no domínio da frequência espacial (SFD) ..	68
3.6 A Técnica da imagem no domínio da frequência espacial (SFDI)	71

3.6.1 Projeção, demodulação e obtenção da imagem	73
3.7 Determinação dos parâmetros ópticos.....	76
4. METODOLOGIA.....	78
4.1 Instrumentação do SFDI.....	78
4.1.1 Primeiro equipamento desenvolvido.....	79
4.1.2 Segundo equipamento desenvolvido	83
4.2 Fabricação dos fantomas.....	85
5. TÉCNICAS COMPLEMENTARES ÀS MEDIDAS DO SFDI	90
5.1 A Esfera Integradora (IS)	90
6. RESULTADOS EXPERIMENTAIS COM O SFDI	94
6.1 Obtenção de imagens por meio da técnica SDFI.....	94
6.1.1 Fantoma PC10	97
6.1.2 Fantoma NOV10.....	103
6.1.3 Caso particular - Fantoma Star	109
6.2 Processamento de imagens por meio da técnica SFDI.....	112
6.2.1 Fantoma PC10	113
6.2.2 Fantoma NOV10.....	118
6.2.3 Caso particular - Fantoma Star	122
7. RESULTADOS COM TÉCNICAS COMPLEMENTARES AO SFDI	124
7.1 Determinação dos índices de refração dos fantomas utilizados	124
7.2 Medidas realizadas na Esfera Integradora (IS)	126
7.2.1 Fantoma PC10	127
7.2.2 Fantoma NOV10.....	130

8. APLICAÇÃO DA TÉCNICA SFDI NA ÁREA MÉDICA	135
9. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	149
10. ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE A PESQUISA.....	151
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
12. ANEXO.....	162

1. INTRODUÇÃO

De um modo geral, o câncer de pele se constitui como um dos tumores mais frequente no Brasil, existindo tanto na forma de melanoma quanto não melanoma (carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma espinocelular (CEC)), segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer). Dessa forma, em 2016 houve ocorrência de 3 mil novos casos de melanoma em homens e em mulheres, predominando os estados da região sul do Brasil; entre esses estados, Rio Grande do sul (RS) e Santa Catarina (SC) são líderes na incidência do câncer de pele melanoma (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

Estimou-se que para o biênio 2018-2019 haveria 85.170 casos novos de câncer de pele não melanoma entre homens e 80.410 nas mulheres. Para o caso do câncer tipo melanoma, o qual possui baixa incidência, foram estimados 2.920 casos masculinos e 3.340 casos femininos. Esses dados podem ser visualizados na figura 1 a seguir, a qual demonstra a incidência de diferentes tipos de câncer nas regiões do Brasil (RETROPERITONEAIS, 2018).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Colon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

Figura 1: Estimativas para o ano de 2018 de casos novos de câncer por 100 mil habitantes, segundo sexo e localização primária (RETROPERITONEAIS, 2018).

Entre as principais causas que ocasionam o aparecimento do câncer de pele estão a incidência da radiação ultravioleta (UV), que avaria as células superficiais da pele; a exposição solar constante e fatores influenciadores, tais como a cor da pele, olhos e cabelos claros; o histórico de câncer familiar; indivíduos com sistema imunológico enfraquecido; entre outros.

Sendo assim, quando há uma detecção precoce de lesões pré-malignas, pode-se obter resultados positivos no tratamento com maior possibilidade de cura e os traumas estéticos provenientes de uma intervenção cirúrgica serão mínimos. Na imagem abaixo, é possível observar o avanço do tumor de pele no estágio I-A desde a primeira camada até o estágio mais avançado da doença II-C na região mais profunda da pele:

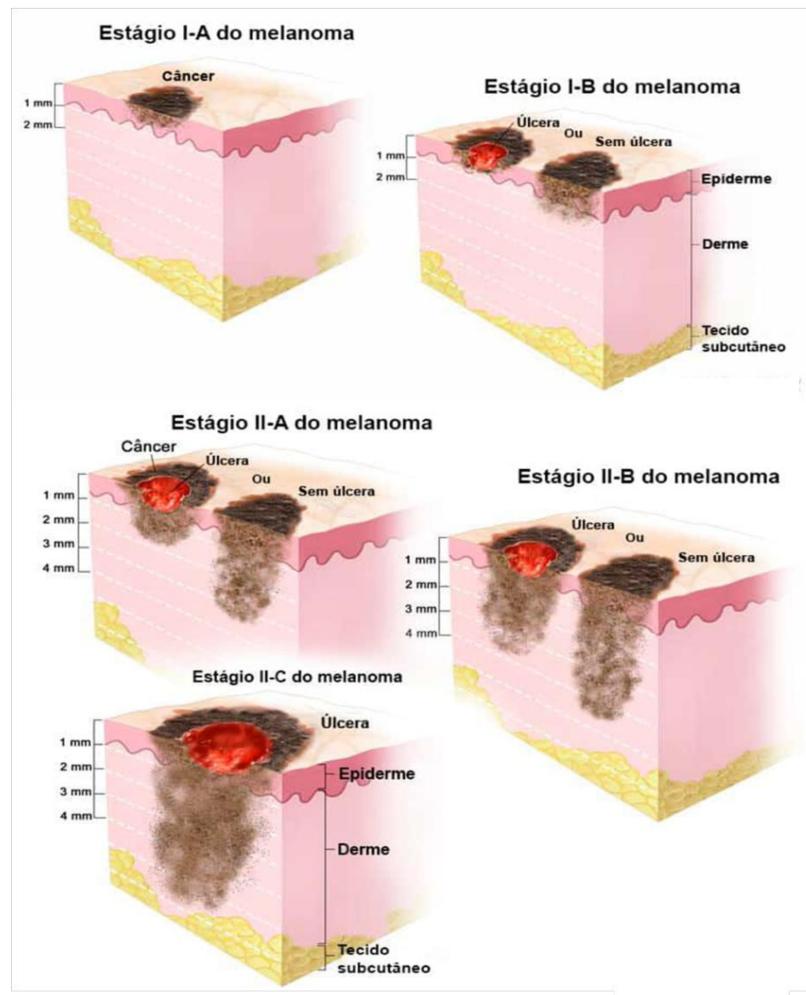


Figura 2: Estágio do avanço do câncer de pele tipo melanoma e seu aprofundamento no tecido biológico (WINSLOW, 2008).

A partir disso, uma das formas de obtenção do diagnóstico de câncer pele é por meio da realização de uma biópsia, a qual consiste em exame invasivo em que o tecido biológico é coletado e encaminhado a um laboratório de anatomia patológica e ainda assim pode haver dúvidas quanto à qualidade e precisão das informações (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

A partir da análise e elaboração de formas de contornar os processos invasivos para o diagnóstico precoce do câncer de pele e que trazem desconforto ao paciente, esta pesquisa teve como objetivo a utilização de uma técnica conhecida como imagem no domínio da frequência espacial (SFDI) (*Spatial Frequency Domain Imaging* em inglês), em que utilizando a modulação espacial da luz é possível controlar a propagação da mesma a fim de obter quantitativamente as propriedades de absorção óptica e espalhamento de um meio tórrido de maneira não invasiva e sem contato.

Assim, com a técnica SFDI é possível separar e quantificar as propriedades ópticas de absorção e espalhamento por meio da reflexão difusa da luz na superfície, permitindo ainda criar mapas espaciais referentes à concentração de biocromóforos do tecido biológico. Além disso, também é possível visualizar estruturas e, inclusive, determinar suas funções moleculares na escala espacial de poucos mícrons a centímetros em fantomas e tecidos biológicos (GIOUX et al., 2011). Dessa forma, ao invés de usar luz pulsada, a técnica de SFDI utiliza luz modulada com amplitude a centenas de MHz. Logo, nesta pesquisa foram desenvolvidos dois equipamentos: um que foi levado para testes clínicos por meio da realização de medidas *in vivo* (experimento realizado dentro ou no tecido de um organismo vivo) e outro que permaneceu fixo para trabalhos acadêmicos.

Na montagem da técnica SFDI, a unidade de projeção é composta por uma fonte de luz halógena que se acopla a uma guia de luz flexível para seleção de comprimento de onda subsequente usando uma roda de filtro. Na medida em que o padrão de iluminação se propaga para dentro do tecido, este torna-se atenuado devido aos eventos de absorção e espalhamento. Em seguida, as informações são processadas em MATLAB a partir das imagens obtidas em LabVIEW, fornecendo ao usuário da técnica SFDI a possibilidade de escolher a região de interesse na figura de reflexão, de modo em que duas informações importantes sobre a amostra são obtidas: o coeficiente de absorção (μ_a) e o espalhamento reduzido (μ'_s).

A fim de testar e calibrar o equipamento para o desenvolvimento da pesquisa, foram confeccionados fantomas com propriedades ópticas similares a de tecidos biológicos e

também houve o uso de uma esfera integradora para comparação e validação de resultados com o SFDI.

Por fim, o método utilizado neste trabalho para obter imagens por luz difusa mostrou-se relativamente de baixo custo e portátil, tornando-se uma plataforma flexível para determinar a estrutura de tecidos e a composição molecular *in vivo*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos gerais

A presente pesquisa tem como objetivos principais desenvolver uma metodologia que utilize a técnica de “imagem no domínio da frequência espacial” (SFDI) para a criação de mapas espaciais de absorção e de espalhamento de tecidos biológicos, em particular a pele, e quantificar estas variáveis por meio da captura da reflexão difusa na superfície da amostra sem contato. Tal como mencionado anteriormente, estes objetivos foram elaborados a partir da análise sobre como criar meios que aperfeiçoem o diagnóstico precoce do câncer de pele, tornando o processo mais prático e indolor para os pacientes.

1.1.2 Objetivos específicos

No intuito de alcançar os objetivos gerais da presente pesquisa, foram delimitados os seguintes objetivos específicos:

- a) Realizar um estudo sistemático das propriedades ópticas da pele humana;
- b) Realizar um estudo sobre os conceitos de absorção e espalhamento em tecidos biológicos;
- c) Realizar medidas da reflexão difusa da luz em diferentes superfícies;
- d) Desenvolver o equipamento para detecção precoce de câncer de pele com base nos estudos e medidas realizados.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Propriedades ópticas de tecidos biológicos

Em tese, podemos considerar que os tecidos biológicos são agregados de células similares que, morfologicamente, podem ser agrupados em quatro tipos: epitélio, que tem como função revestir partes do organismo; tecido conjuntivo, cuja função é preencher espaços no organismo; tecido muscular, cuja função é a de contrair e alongar-se; e o tecido nervoso, o qual tem a função de receber estímulos e conduzir informação para outras células.

Como foco da pesquisa, temos a pele humana, a qual é composta pelo tecido epitelial e que, por sua vez, é considerada o maior órgão do corpo humano e responsável por conter a perda de água, além de proporcionar proteção contra radiação UV, fricção e impactos, regulação da temperatura corporal, entre outros, levando em consideração que este órgão é constituído por três camadas (da camada mais externa para a mais interna): epiderme, derme e hipoderme (TUCHIN, 2015).

Na figura 3 abaixo é demonstrada a pele humana constituída por três camadas que a compõe: a epiderme (camada mais externa), a derme (camada intermediária) e a hipoderme (camada mais profunda), bem como alguns componentes presentes neste tecido.

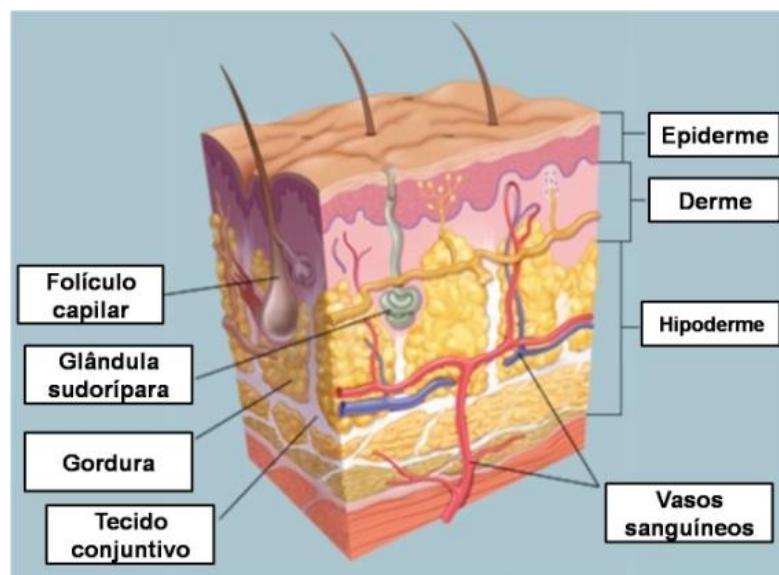


Figura 3: A pele humana e suas camadas (Adaptado de HOFFMAN, 2014).

Dessa forma, compreender como a luz interage com a matéria é de extrema importância, uma vez que a utilização de radiação eletromagnética em aplicações biomédicas tem sido explorada em diversas áreas. Entre elas podemos citar a terapia fotodinâmica (PDT) (LEANDRO et al., 2017), as cirurgias a laser (NEUKAM; STELZLE, 2010), os tratamentos dermatológicos e estéticos (TANZI; LUPTON; ALSTER, 2003), a terapia fototérmica (ZUBAREV; ISKAKOVA; ABU-BAKR, 2017) e o diagnóstico óptico (YUN; KWOK, 2017).

No que tange à proposta de uma visão da natureza das interações entre luz e tecidos biológicos, existem alguns processos fotofísicos que influenciam na propagação de luz na pele, sendo estes a reflexão, a refração, a absorção e o espalhamento (VO-DINH; MASTERS, 2004). Estes diferentes processos fotofísicos são ilustrados na figura 4 a seguir, que mostra os efeitos quando um feixe de luz incide na pele humana. Além disso, a figura ilustra que em distintos comprimentos de onda (λ) a radiação eletromagnética pode penetrar diferentes camadas dela.

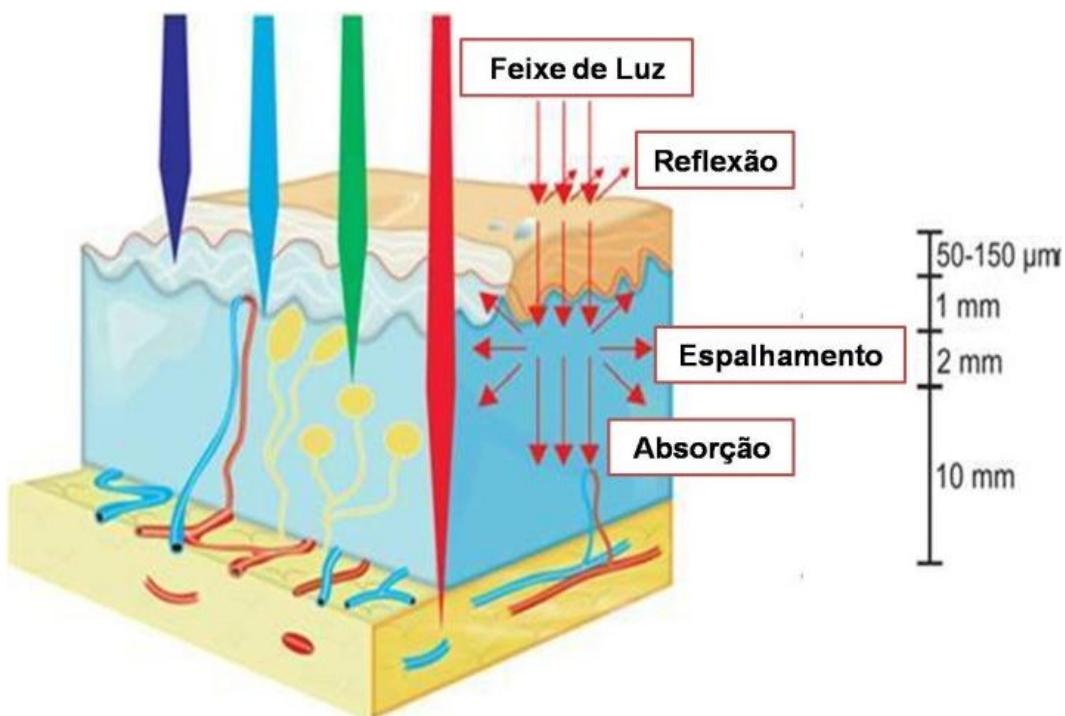


Figura 4: Esquema ilustrativo da interação da luz com a pele humana (tecido biológico) (Adaptado de UMAPATHY; PREMKISHORE; MITHESH, 2013).

Quando medidas espectroscópicas são realizadas na pele, estas envolvem a incidência da luz nestas amostras e a coleta da reflexão ou da fluorescência emitida pelo tecido. Sendo assim, o espectro da luz incidente ou refletida geralmente encontra-se dentro da faixa de radiação UVA (320-400nm) ou da região do visível (400-750nm). A partir disso, é importante afirmar que tanto o fenômeno de reflexão quanto o da fluorescência são afetados pelos cromóforos que compõem o tecido biológico, sendo componentes como hemoglobina, deoxihemoglobina, água, lipídeos, melanina, entre outros (BODENSCHATZ et al., 2015).

Destarte, a investigação tanto da absorção quanto do espalhamento de luz no tecido biológico podem mostrar valorosas informações sobre o metabolismo e a estrutura do tecido. Especificamente, as técnicas de óptica difusa são capazes de medir com precisão a oxigenação tecidual, bem como diferenciar tecidos em relação aos seus estados físicos. Todas essas informações podem ser estimadas e acessadas por meio das medidas dos coeficientes de absorção (μ_α) e de espalhamento reduzido (μ'_S) (BODENSCHATZ et al., 2015).

2.2 Reflexão e Refração na interface do tecido biológico

De um modo geral, pode-se considerar a pele como um meio dielétrico, uma vez que ela é descrita por apresentar uma alta permissividade elétrica (ϵ) e também uma baixa condutividade em razão da presença de íons alcalinos, moléculas de água e proteínas contendo membranas lipídicas que são utilizadas para recobrir células e organelas (FOSTER; SCHWAN, 1995).

Sendo assim, a presença de diferentes constituintes celulares que compõem o tecido biológico com individuais índices de refração (n) permite estimar que o índice de refração médio deste sistema é maior do que o do ar. Dessa forma, quando a luz se encontra em interação com o tecido biológico, ela tem a capacidade de sofrer reflexão parcial na interface ar/tecido (reflexão), enquanto que a parte restante penetra no tecido (processo de refração) (TUCHIN, 2016).

Logo, pela lei de Fresnel que rege a reflexão para uma interface ar/tecido demonstra-se que o feixe de radiação incidente, o feixe refletido e o plano normal à superfície refletora devem estar contidos no plano de incidência. Além disso, deve-se ressaltar que a lei também demonstra que o ângulo de incidência (θ') equivale ao ângulo de reflexão (θ), ou seja, $\theta' = \theta$, e estes ângulos são obtidos entre a superfície normal ao plano e os feixes incidente e refletido.

Se assumirmos que a superfície na qual a luz incide é suave, porém contendo irregularidades menores do que o comprimento de onda (λ) da radiação incidente, haverá como resultado uma reflexão especular. Entretanto, se a rugosidade desta superfície é equivalente ou maior do que o comprimento de onda (λ) da radiação incidente resultará então, em uma reflexão difusa. Esta última é comum em tecidos biológicos, visto que eles não possuem superfícies polidas em comparação à superfície de espelhos. Contudo, quando a superfície do tecido encontra-se úmida, a reflexão especular poderá sobrepor-se à reflexão difusa (NIEMZ, 2007). A representação da reflexão e da refração na interface do ar/tecido e a diferenciação entre a reflexão especular e difusa podem ser visualizadas na figura 5 abaixo:

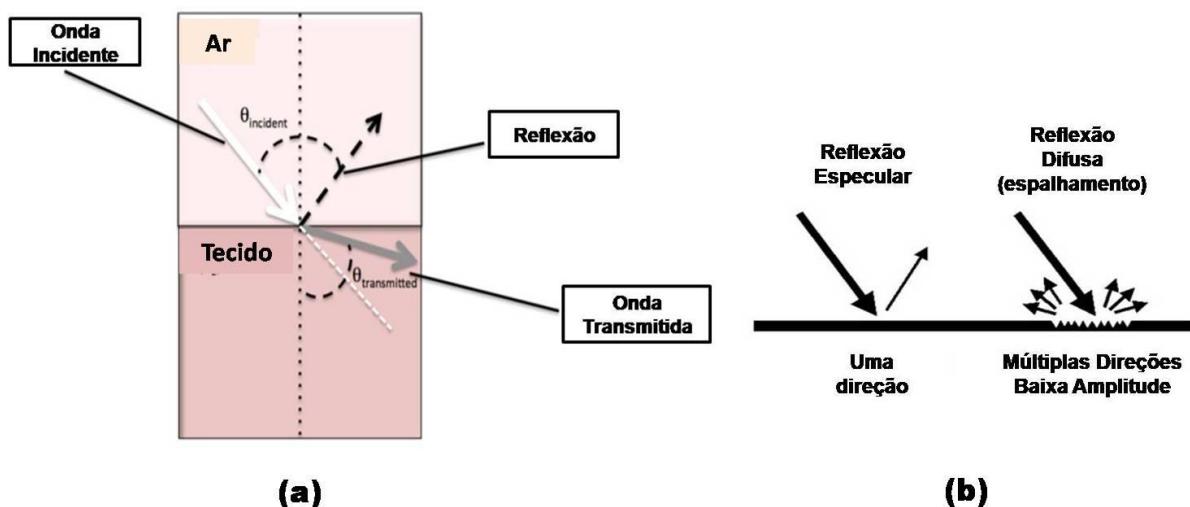


Figura 5: (a) como a reflexão e refração na interface ar/tecido e (b) como a reflexão especular e difusa (Adaptado de NIEMZ, 2007)

Dessa forma, outra situação que podemos apontar é quando parte da radiação incidente penetra a interface ar/ tecido, havendo, assim, uma mudança na direção da onda eletromagnética e da velocidade resultando no fenômeno da refração (NIEMZ, 2007). Ainda, para uma onda eletromagnética sendo propagada no vácuo com permissividade ϵ_0 e permeabilidade μ_0 , teremos a velocidade desta corresponde a c , tal que:

$$c = \sqrt{\frac{1}{\mu_0 \epsilon_0}} \quad (1)$$

Porém, quando a onda eletromagnética passa para o meio dielétrico a velocidade da mesma se altera. Logo, junto a isso há uma nova permissividade, denominada ϵ , e permeabilidade, denominada μ , de modo que podemos considerar a velocidade da onda eletromagnética (v) como:

$$v = \sqrt{\frac{1}{\mu\epsilon}} \quad (2)$$

Relacionando a equação (1) com (2) expostas acima, obtemos:

$$\frac{c}{v} = \sqrt{\frac{\mu\epsilon}{\mu_0\epsilon_0}} \quad (3)$$

A partir da razão, dada por $\frac{c}{v}$, obtemos o fator n , o qual corresponde ao índice de refração do material. Dessa forma, este corresponde a um número real maior ou igual a 1, cuja indicação mostra que uma onda eletromagnética altera sua velocidade quando muda de meio na interface ar/tecido (MACHADO, 2000). A equação abaixo demonstra uma continuação da equação (3), expressando o índice de refração(n) como:

$$n = \sqrt{\frac{\mu\epsilon}{\mu_0\epsilon_0}} \quad (4)$$

Sendo assim, quando a luz se propaga em um material com um índice de refração n_1 e encontra um limite no qual há um segundo material com distinto índice de refração correspondendo à n_2 , a onda eletromagnética será transmitida; porém, o caminho que a luz percorria anteriormente sofrerá uma alteração.

Deste modo, utilizando as ideias antes mencionadas, a Lei de Snell se define como a relação entre o ângulo de incidência (θ') e o ângulo de refração da onda transmitida (θ'') e pode ser expressa da seguinte forma:

$$n_1 \cdot \sin \theta' = n_2 \cdot \sin \theta'' \quad (5)$$

Assim, utilizando esta equação (5), a quantia de luz refletida e refratada (transmitida) por meio da região limite dependerá do índice de refração dos dois materiais (ar/tecido), do ângulo de incidência e da polarização da onda incidente na interface (VO-DINH, 2003).

2.3 Absorção

De um modo geral, o processo da absorção refere-se à extração de energia proveniente da luz por uma espécie molecular de modo que esta consiga deslocar-se entre níveis de energia por meio de transições. Sendo assim, para que ocorra a transição de um nível de energia mais baixo para um nível superior, há a necessidade de excitar a espécie molecular de forma que esta absorva uma quantidade de energia correspondente a $h\nu$ proveniente dos fótons da radiação eletromagnética, que, por sua vez, é equivalente à diferença de energia, denominada ΔE , entre os níveis (VO-DINH; MASTERS, 2004).

$$h\nu = \Delta E \quad (6)$$

Na figura 6, é representada esquematicamente a transição de uma partícula que absorve energia proveniente de um fóton necessário para a transição do estado fundamental para estados excitados:

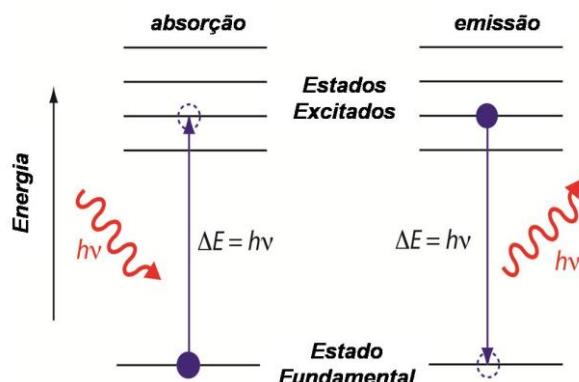


Figura 6: Possíveis processos de transferência de energia intramolecular (Adaptado de LAKOWICZ, 2006).

Entretanto, a capacidade de um meio para absorver a energia de uma radiação eletromagnética depende de fatores, tais como o arranjo de átomos e moléculas, o comprimento de onda da radiação incidente e a espessura do material, bem como os parâmetros internos do meio, como por exemplo a temperatura e a concentração de seus agentes absorvedores. No intuito de descrever a absorção através de parâmetros como a espessura e a concentração, duas leis são recorridas: a Lei de Lambert e a Lei de Beer (NIEMZ, 2007). Logo, ambas as leis de Lambert (eq. 7) e Beer (eq. 8) podem ser escritas como:

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_\alpha z} \quad (7)$$

$$I(z) = I_0 e^{-k' C z} \quad , \quad (8)$$

de modo que $I(z)$ é a mudança da intensidade de um feixe de luz após atravessar uma região de caminho óptico denominada Z [cm] de um meio homogêneo, cujo coeficiente de absorção do meio é μ_α [cm⁻¹]. Temos ainda que I_0 é a intensidade da radiação eletromagnética incidente, k' [cm². mol⁻¹] é o coeficiente de extinção molar e C [mol. cm⁻³] corresponde à concentração molar dos agentes absorvedores (VO-DINH; MASTERS, 2004).

Também é importante explicitar que ambas as expressões (7) e (8) descrevem comportamentos idênticos da absorção para um meio; assim, a união das duas equações é conhecida como Lei de Lambert - Beer. Aplicando o logaritmo na expressão (7), obtém-se:

$$Z = \frac{1}{\mu_\alpha} \ln \frac{I_0}{I(z)} \quad (9)$$

A Lei de Lambert-Beer relata como a luz é atenuada em função da concentração de agentes absorvedores e da dimensão do caminho realizado pelo feixe incidente, ou seja, quanto maior a extensão percorrida, mais centros absorvedores serão encontrados pela radiação eletromagnética. Dessa forma, a atenuação da luz será maior e isso pode ser visto na figura 7 a seguir, quando um feixe de luz incidente I_0 tem sua intensidade reduzida para I ao ultrapassar um material de espessura (d) com partículas absorvedoras:

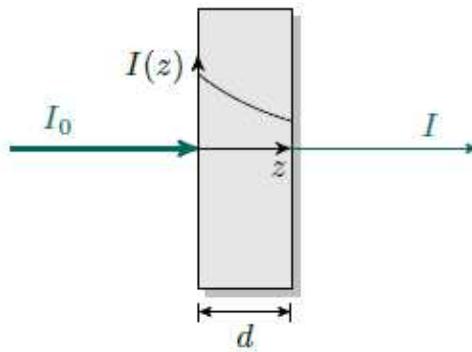


Figura 7: Diminuição da intensidade devido à absorção, conforme especificado pela Lei de Lambert-Beer.

Na situação em que um feixe de luz ultrapassa uma região de caminho óptico Z [cm] com uma solução contendo agentes absorvedores na concentração C [mol/L], a potência do feixe descresse de P_0 a P , sendo que esta atenuação é conhecida como transmitância (T) e é dada pela equação (10):

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (10)$$

Ainda, outro parâmetro utilizado para estudar o processo de absorção é a absorbância (\mathcal{A}), que está vinculada a Transmitância (T) por uma expressão logarítmica. Assim, quando a transmitância aumenta, a absorbância diminui em uma solução líquida. Dessa forma, (\mathcal{A}) é representada pela equação abaixo:

$$\mathcal{A} = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \quad (11)$$

Na lei de Lambert-Beer, a absorbância possui uma relação proporcional e direta em relação à concentração (C) do agente absorvedor, ao caminho óptico (z) percorrido pela luz na solução e a constante de absorvidade molar (ε), também denominada de coeficiente de extinção molar. Sendo assim, esta última corresponde à característica da espécie que absorve a luz na solução. Tal relação por ser expressa pela seguinte equação (SKOOG et al., 2008):

$$\mathcal{A} = \varepsilon \cdot z \cdot C \quad (12)$$

A taxa de energia perdida quando um feixe de luz de intensidade I_0 penetra um meio com caminho óptico (z) está relacionado ao coeficiente de absorção (μ_α), o qual corresponde à distância em que os fótons viajam no material antes de serem absorvidos e sua unidade é o inverso da distância [cm^{-1} ou mm^{-1}].

Ainda, é importante considerar que o inverso do coeficiente de absorção (μ_α) é denominado caminho livre médio de absorção ou comprimento de absorção (l_a), cuja função é medir a distância na qual a intensidade $I(z)$ decai para $\frac{1}{e}$ do valor de I_0 (NIEMZ, 2007).

Desta maneira, tem-se que:

$$l_a = \frac{1}{\mu_\alpha} \quad (13)$$

O espectro de absorção obtido das transições entre níveis de energia permite estimar a identidade de espécies moleculares que absorvem luz classificadas como cromóforos, uma vez que a transição de um cromóforo específico gera uma absorção em frequência única ou faixas de frequências, expressas em (ν). Deste modo, a capacidade da luz em penetrar tecidos biológicos tem forte dependência do quanto um tecido é absorvedor de luz.

Sendo assim, para cromóforos em geral, o coeficiente de absorção (μ_α) pode ser expresso segundo a equação abaixo, isso em função de um comprimento de onda (λ) específico:

$$\mu_\alpha(\lambda_i) = \sum_{n=1}^N \varepsilon_n(\lambda_i) \cdot c_n, \quad (14)$$

onde μ_α corresponde ao coeficiente de absorção, $\varepsilon_n(\lambda_i)$ é o coeficiente de extinção molar em um comprimento de onda específico, c_n é a concentração de cromóforos presentes e N equivale ao número moléculas absorvedoras (MAZHAR et al., 2012).

Logo, existe uma região espectral denominada de “janela óptica terapêutica” ou “janela biológica”, ilustrada na figura 8, em que grande parte dos tecidos possui uma fraca absorção, o que permite que a luz possa penetrar razoavelmente neles. Esta extensão espectral compreende uma faixa entre 600nm a 1300nm e está localizada na região entre o espectro visível (VIS) e o infravermelho próximo (NIR) (PRASAD, 2003).

É importante destacar que na literatura outros autores afirmam que a região da janela óptica terapêutica encontra-se mais próxima da região do espectro visível (VIS). Entre os autores que expressam essa ideia, temos MOSHELL (1983), que afirma que a abrangência da janela óptica terapêutica se estende entre 320 nm a 800 nm enquanto que BÖCKLIN (2014) aponta que a absorção é comparativamente baixa na região de 650 nm a 950 nm. Logo, essa é uma informação relevante que pode evitar interpretações equivocadas na presente pesquisa, visto que foi considerada uma região de 400 à 1000 nm e é algo que está em consonância com a bibliografia científica.

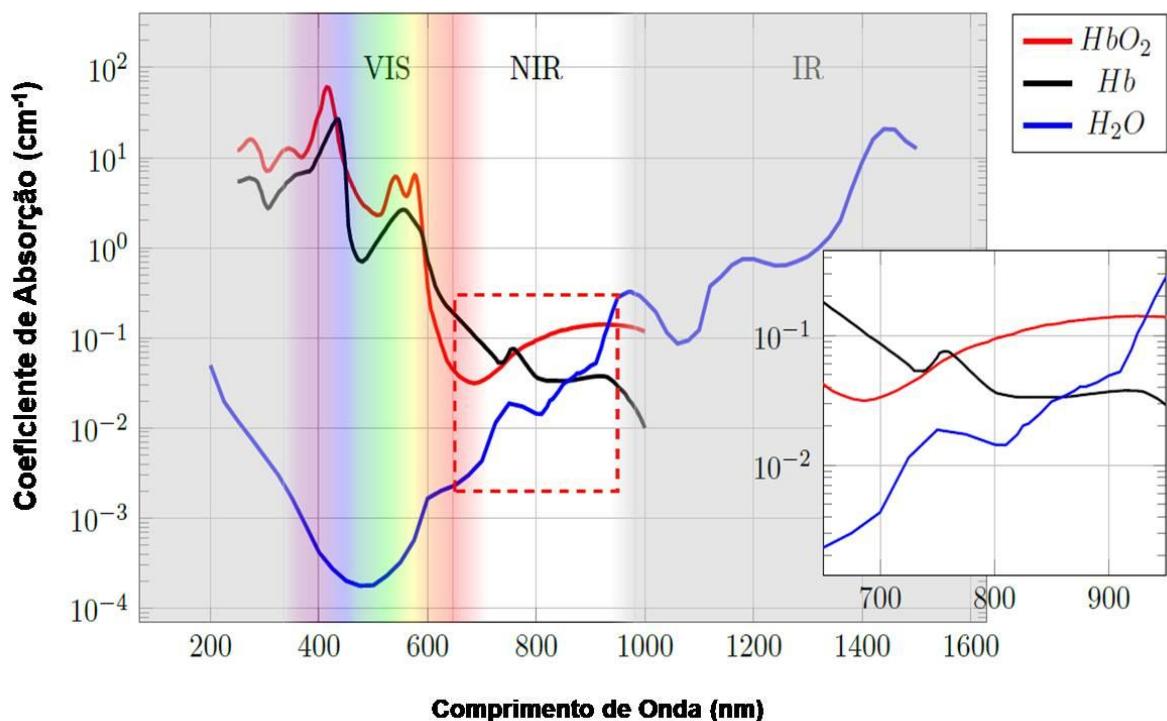


Figura 8: Espectros de absorção da oxihemoglobina (HbO_2), deoxihemoglobina (Hb) e água (H_2O). É possível verificar que a absorção é comparativamente baixa na faixa de comprimento de onda de 650 nm a 950 nm, cuja região é denominada de “janela biológica” (Adaptado de BÖCKLIN, 2014).

2.4 Cromóforos

Primeiramente, os coeficientes de absorção (μ_α) de tecidos biológicos possuem uma grande variação no espectro visível e o fator responsável por esta oscilação é a presença de cromóforos (SANDELL; ZHU, 2011). Assim, pode-se afirmar que o cromóforo corresponde a um grupo de átomos ou moléculas responsáveis pela absorção de luz na região UV/VIS com

característica espectral padrão. No tecido biológico, pode-se evidenciar a presença de vários tipos de cromóforos, uma vez que muitos deles determinam uma absorção óptica específica para cada camada de tecido (TUCHIN, 2016).

Os cromóforos pertencem a grupos covalentes insaturados e possuem as seguintes representações químicas: C=C, C≡C, C=O, C≡N, N=N, NO₂, entre várias outras, e ainda são responsáveis pelo aparecimento da cor em compostos quando absorvem radiação eletromagnética na região de 400-800nm (VIS).

Na situação em que ocorre a absorção de luz nas regiões UV/VIS por um cromóforo, consequentemente isto provocará uma excitação eletrônica, de modo a fazer com que o elétron se desloque do nível de menor energia para o de maior energia e o cromóforo apenas poderá conceder cor dependendo da ocorrência de absorção no VIS ou UV. (GÜRSİS et al., 2016).

O foco da presente pesquisa são cromóforos de caráter biológico presentes na pele. Sendo assim, muitos deles absorvem radiação eletromagnética em comprimentos de onda (λ) particulares e na região da janela biológica. Na figura 9 a seguir há um exemplo de alguns destes cromóforos:

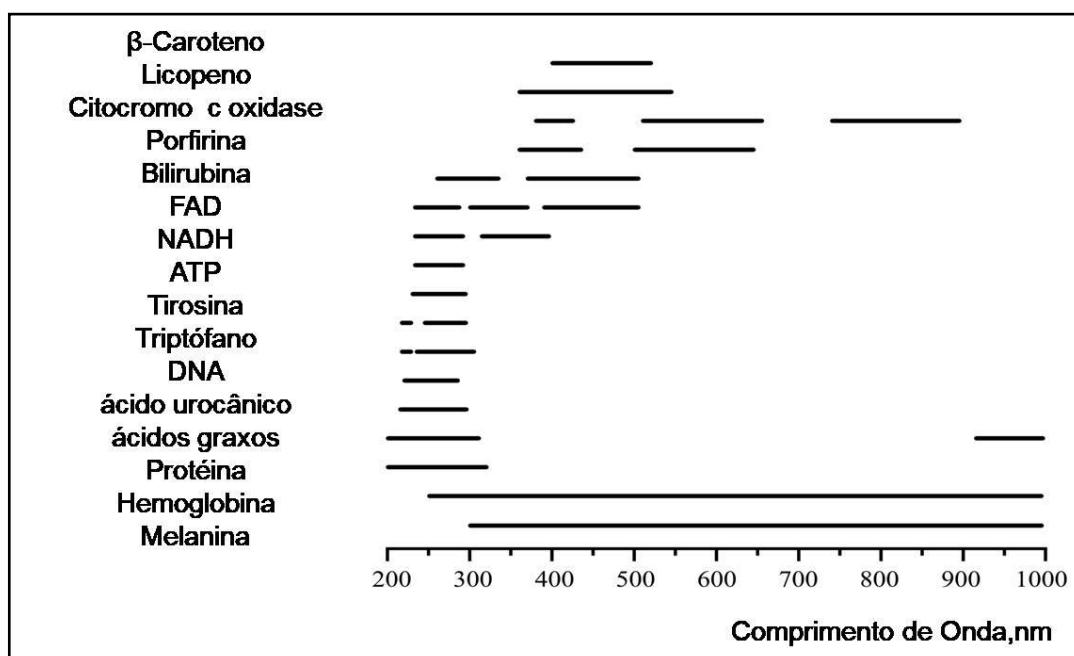


Figura 9: Regiões espectrais de absorção para cromóforos da pele e do tecido biológico (Adaptado de TUCHIN, 2016).

Como citado anteriormente, há uma região entre 320-800nm denominada “janela óptica terapêutica”, na qual há a possibilidade da energia do fóton ser suficiente para ativar ou desativar os cromóforos presentes. Esta região espectral corresponde à faixa na qual há uma grande penetração nas camadas internas da pele, sangue e órgãos internos, isto devido à associação com a diversidade de cromóforos presentes nos tecidos, o que permite escolher os comprimentos de ondas (λ) adequados para atingir determinada profundidade do tecido (MOSHELL, 1983).

Em suma, entre os cromóforos apresentados nesta pesquisa, os principais a serem abordados serão a hemoglobina, a água, os lipídios e a melanina, de modo que não se estenderá aos demais devido aos objetivos já mencionados, os quais consistem na criação de mapas espaciais de absorção do espalhamento.

2.4.1 Oxihemoglobina (HbO_2) e Deoxihemoglobina (Hb)

De um modo geral, o sangue é especificado como um fluído dinâmico presente em vasos e artérias, bombeado pelo coração, cujo objetivo é promover a irrigação de tecidos, transportar oxigênio, hormônios e metabolitos, bem como regular a temperatura corporal (TUCHIN, 2015).

A composição sanguínea é formada pelo arranjo de plasma ($\cong 54\%$), células vermelhas ($\cong 45\%$), células brancas e plaquetas, as quais representam menos que 1% do fluído sanguíneo. O hematócito corresponde à fração de células vermelhas presentes no sangue, de modo que a composição destas células corresponde particularmente à hemoglobina (97%).

Sendo assim, a principal função da hemoglobina é o transporte do oxigênio e é importante afirmar que entre todos os cromóforos presentes no tecido biológico, a hemoglobina é a que possui maior impacto quando há pesquisas com imagem óptica. Logo, esta pode ser dividida em dois estados: oxihemoglobina (HbO_2) e deoxihemoglobina (Hb) (LORENZO, 2013).

Tanto a oxihemoglobina (HbO_2) quanto a deoxihemoglobina(Hb) representam os principais cromóforos da derme da pele. A figura 10 a seguir expressa que a oxihemoglobina possui uma forte banda de absorção em 415nm bem como duas bandas de absorção secundárias em 542nm e 577nm. Com relação à deoxihemoglobina, esta contém uma banda

primária de absorção em 430 nm e uma banda secundária em 555 nm. Observa-se que as hemoglobinas mostram uma baixa absorção para comprimentos de onda (λ) acima de 620 nm (TUCHIN, 2016).

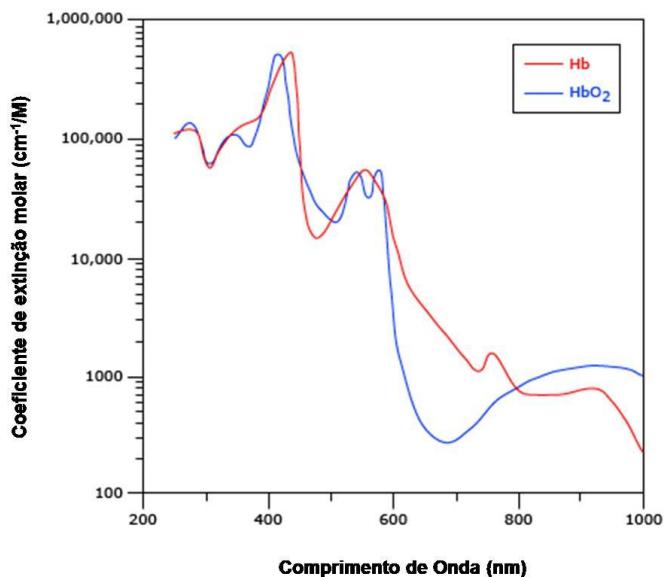


Figura 10: Coeficiente de extinção da hemoglobina (Adaptado de JACQUES; PRAHL, 1998).

2.4.2 Água (H_2O)

A água é o principal cromóforo presente na maioria dos tecidos biológicos, sendo que seu coeficiente de absorção (μ_a) tem predominância sobre o coeficiente de absorção total do tecido dentro de um intervalo restrito de comprimento de onda (λ), em particular na região do infravermelho (IR) (TUCHIN, 2016).

A absorção da água compreende a região do espectro, o qual abrange de 500 nm a 1000 nm. A partir disso, deve-se ressaltar que, mesmo dentro de uma região UV de 930 nm, a absorção deste cromóforo é relativamente baixa em relação a outros cromóforos biológicos presentes na pele (este comportamento pode ser visualizado na figura 11). Entretanto, a água por possuir grande concentração nos tecidos opera de forma a atenuar o coeficiente de absorção (μ_a) do tecido biológico (VO-DINH, 2003).

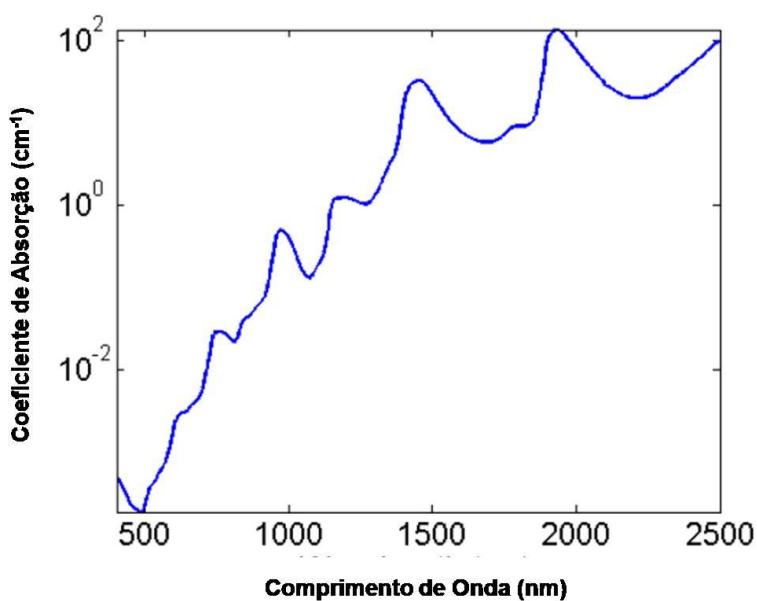


Figura 11: Espectro de absorção da água (Adaptado de NACHABÉ, 2012).

2.4.3 Lipídios (Lip)

O lipídio é um cromóforo que pertence ao grupo de compostos em sistemas vivos que são solúveis e apolares. Sendo assim, dentre os lipídios o Trigicerol é o mais apolar e que é especificado como uma gordura. Este é mantido no tecido biológico e é utilizado como reservatório de energia do corpo, para que, em momentos de gasto de energia, ele seja, então, metabolizado (PRASAD, 2003).

Os lipídios podem ser vistos no tecido adiposo em camadas de gordura subcutânea bem como no revestimento de órgãos internos. Além disso, eles são os principais componentes de membranas celulares presente em todo corpo, de modo que a concentração de lipídios no organismo de uma pessoa adulta corresponde entre 60 % a 87 %.

O espectro de absorção deste biocromóforo, mostrado na figura 12, aponta que as medidas do coeficiente de absorção de lipídios foram iniciadas a partir de 400 nm, em que pode-se observar a abrangência de fracos picos de absorção em até 800 nm. Porém, percebe-se que acima de 800nm e até 2200 nm há picos adicionais de absorção. Esta variação de picos de absorção pode ser apontada em função da composição do tipo de gordura que, no caso dos lipídios, teremos as gorduras saturada, monoinsaturada e poli-insaturada (NACHABÉ, 2012).

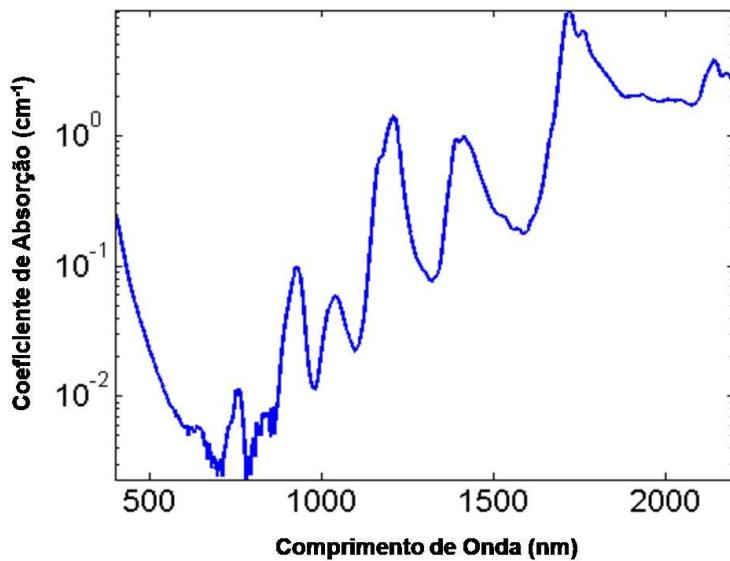


Figura 12: Coeficiente de absorção do lipídio (Adaptado de NACHABÉ, 2012).

2.4.4 Melanina (Mel)

A melanina é um cromóforo que corresponde a um grupo de polímeros, os quais são responsáveis pela pigmentação e equivale a maior parte dos cromóforos presentes na pele, de modo que para muitas pessoas a absorção da camada epiderme da pele é geralmente dominada pela absorção de melanina. Sua composição é constituída pela concentração das moléculas de Tirosina (aminoácidos), de forma que estas possuem uma forte absorção para curtos comprimentos de onda (λ) (VO-DINH, 2003).

A melanina presente na epiderme da pele cumpre com um papel de extrema importância na delimitação da profundidade de penetração da luz na pele. Dessa forma, este cromóforo absorve luz de maneira mais efetiva dentro de uma faixa de comprimentos de onda (λ) entre 300 nm a 1000 nm, de modo que para curtos comprimentos de onda (λ) próximos da região UV do espectro haverá uma absorção mais acentuada (TUCHIN, 2016). Esse comportamento pode ser visualizado na figura 13.

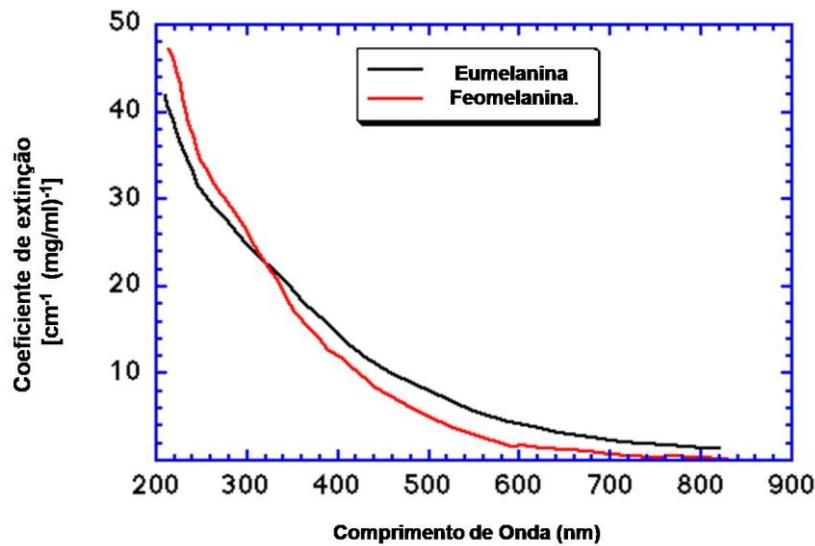


Figura 13: Espectro de absorção da melanina e seus componentes (Adaptado de JACQUES, 2001).

2.5 Espalhamento

O evento físico denominado espalhamento pode ser considerado um processo no qual a luz interage com um material e sua direção de propagação se altera. Entretanto, em grande parte deste evento o comprimento de onda (λ) da luz incidente não se modifica (WELCH; VAN GEMERT, 2011).

A princípio, se a frequência de uma onda eletromagnética incidente corresponde à frequência natural de vibração de uma molécula, o fenômeno de absorção poderá acontecer. Porém, se essas frequências não são correspondentes, então o espalhamento será o evento dominante (NIEMZ, 2007).

Com relação aos tecidos biológicos, estes são estruturas heterogêneas constituindo-se de diferentes níveis de organização celular, organelas, entre outras estruturas, de modo que há uma grande diversidade de sistemas complexos e a maior parte dos tecidos possui em sua composição estruturas cujos tamanhos são distintos, assim podendo ser representados por um sistema discreto de partículas espalhadoras (TUCHIN, 2015).

Como resultado desta heterogeneidade, o espalhamento em tecidos tem origem na incompatibilidade dos índices de refração (n) pertencentes às heteroestruturas celulares, as quais compõem o meio biológico irradiado. Deste modo, a luz incidente é espalhada em ângulos variados relativos à partícula espalhadora (VO-DINH; MASTERS, 2004). Na figura

14, é possível visualizar o processo ilustrativo do espalhamento quando a luz incide em uma partícula:

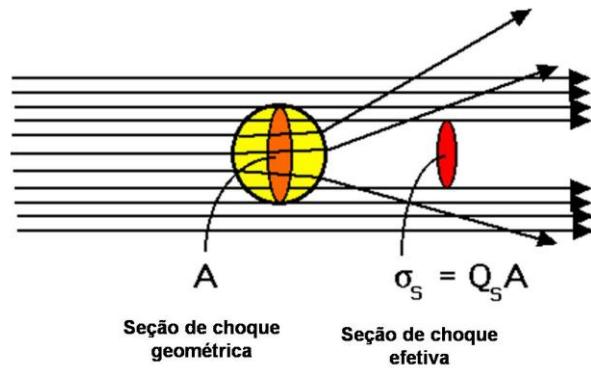


Figura 14: Projeção de luz incidente sobre uma partícula de formato esférico (idealizada), cuja seção de choque geométrica é A e a seção de choque efetiva é representada por σ_s (Adaptado de JACQUES, S. L.; PRAHL, 2018).

Na figura mostrada acima é idealizada uma partícula espalhadora no formato esférico, de modo que a luz incidente que a atinge é redirecionada em novas direções, impedindo que os fótons sejam transmitidos diretamente pela partícula e promovendo a formação de uma sombra. Logo, todo este processo é denominado espalhamento.

Além disso, duas seções de choque são descritas para explicar o fenômeno do espalhamento: a seção de choque geométrica representada por A [cm^2], e a efetiva sendo representada por σ_s [cm^2]. A primeira seção equivale ao espaço ocupado pela partícula enquanto que a segunda descreve o tamanho da sombra resultante do espalhamento devido à interação com os fótons. Aqui é importante ressaltar que o tamanho da sombra (σ_s) poderá ser menor ou maior que o parâmetro A . Ambas as variáveis estão relacionadas da seguinte forma:

$$\sigma_s = Q_s \cdot A, \quad (15)$$

em que Q_s corresponde a uma constante de proporcionalidade adimensional denominada eficiência de espalhamento.

Logo, quando há um meio com múltiplas partículas espalhadoras cuja concentração é relacionada pela densidade de volume ρ_s [cm^{-3}], pode-se definir, então, o coeficiente de espalhamento (μ_s). Para descrevê-lo, utiliza-se a relação:

$$\mu_s = \rho_s \cdot \sigma_s \quad (16)$$

cuja respectiva unidade μ_s corresponde ao inverso da distância [em cm^{-1} ou mm^{-1}]. Com esta relação, pode-se ainda definir o caminho livre médio de espalhamento (l_s), dado pela relação:

$$l_s = \frac{1}{\mu_s} \quad (17)$$

em que o significado físico representa a distância média que um fóton percorre antes de sofrer espalhamento (JACQUES, S. L. ; PRAHL, 2018).

Ainda, deve-se observar que, caso parte da energia do fóton incidente for alterada no processo de espalhamento, este poderá ser classificado como elástico ou inelástico. Considerando eventos de espalhamento com caráter elástico, tem-se que tanto o fóton incidente quanto o espalhado possuem a mesma energia e para o caso inelástico observa-se que esta relação não existe.

Assim, considerando-se apenas espalhamentos elásticos para o caso da interação da luz com tecidos biológicos, existem dois tipos específicos de espalhamento: o Rayleigh e o Mie (NIEMZ, 2007).

Sendo assim, para que ocorra o regime de espalhamento Rayleigh, as estruturas que compõem o tecido devem ser muito menores que o comprimento de onda (λ) dos fótons incidentes. Como exemplo destas estruturas, há componentes celulares e extracelulares, tais como membranas, colágeno, entre outros.

Analizando o espalhamento Mie, verifica-se que as estruturas espalhadoras para este regime possuem tamanhos na ordem de centenas de nanômetros a poucos mícrons, como é o caso da mitocôndria e o núcleo celular, os quais possuem dimensões comparáveis aos dos comprimentos de onda (λ) de fótons utilizados cientificamente na área biomédica (0,5 a 1 μm). É importante ressaltar que o regime Mie é aplicado para partículas esféricas idealizadas, embora as estruturas presentes em tecidos não sejam no formato mencionado; contudo, o comportamento de espalhamento pode ser modelado pela teoria Mie (VO-DINH; MASTERS, 2004). Os exemplos de espalhamento Rayleigh e Mie podem ser vistos na figura 15:

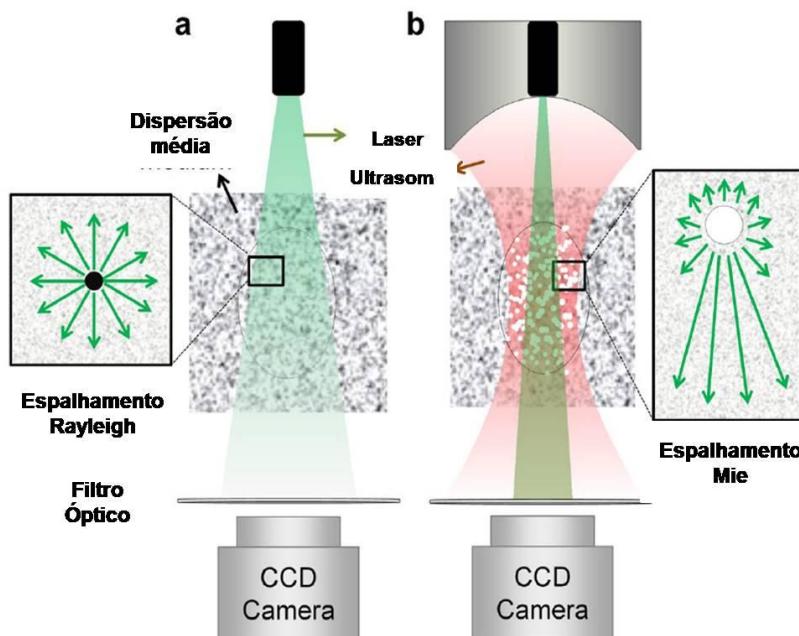


Figura 15: Quando uma radiação incidente atinge uma partícula com tamanho inferior ao comprimento de onda (λ), tem-se a) como exemplificação do espalhamento Rayleigh. Quando o tamanho da partícula é próximo ou maior do λ , há o espalhamento Mie em b). (Adaptado de KIM; CHANG, 2017).

Além das informações mencionadas, há outras duas diferenças entre os espalhamentos Rayleigh e Mie. Primeiramente, em relação à intensidade de luz espalhada (I_s), o regime Mie tem uma fraca dependência considerando o comprimento de onda ($\sim \lambda^{-x}$ com $0,4 < x < 0,5$), enquanto que o regime Rayleigh tem dependência em λ^{-4} . A segunda diferença se refere ao fato de que o espalhamento de fótons no regime Mie é realizado preferencialmente para frente, e no Rayleigh há uma dependência em relação a $1 + \cos(\theta)^2$, de modo que o espalhamento ocorra tanto para frente quanto para trás e com a mesma intensidade.

Ainda, de acordo com NIEMZ (2007), quando os fótons atingem a pele, estes sofrem o espalhamento preferencialmente para frente, evento o qual não pode ser descrito pelo espalhamento Rayleigh. Porém, há uma dependência da intensidade em relação ao comprimento de onda (λ), que é maior do que é prenunciado pelo espalhamento Mie.

O grau de espalhamento pode ser descrito pelo coeficiente de espalhamento (μ_s), uma vez que se pressupõe que os fótons são espalhados na direção do feixe incidente ou em direções diversas. Dessa forma, é necessário definir a função $p(\theta)$, que é a probabilidade de um fóton ser espalhado em determinada direção θ , o qual é possível ser obtido experimentalmente. Contudo, se $p(\theta)$ tiver dependência de θ , este se classifica, então, como

um espalhamento isotrópico (neste caso, os fótons tem a mesma probabilidade de ir para qualquer direção), do contrário será classificado como espalhamento anisotrópico. Estes eventos de espalhamento podem ser visualizados na figura 16:

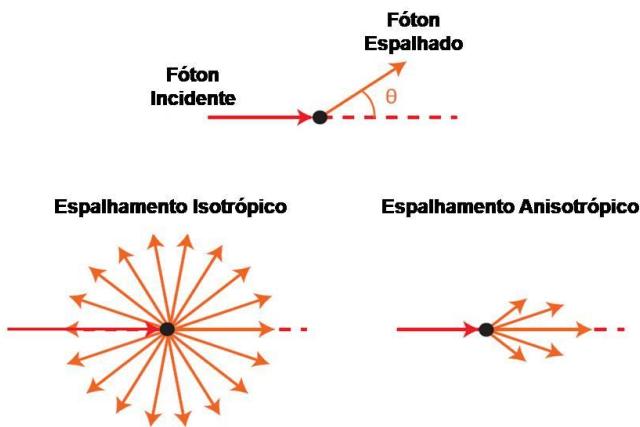


Figura 16: Espalhamento Isotrópico e Anisotrópico.

Para o caso da anisotropia de um determinado meio, esta pode ser quantificada por meio do coeficiente de anisotropia (g), uma variável que é caracterizada pelo valor médio do cosseno do ângulo de espalhamento, tal como está mostrada na equação abaixo:

$$g \equiv \langle \cos\theta \rangle = \int_0^\pi p(\theta) \cdot \cos\theta \cdot 2\pi \sin\theta d\theta \quad (18)$$

Os valores que o parâmetro g assume estão dentro do intervalo de -1 a $+1$. Assim, se $g = 0$, haverá um espalhamento isotrópico (Rayleigh) e se $g = -1$, ocorrerá um espalhamento direcionado para trás. No entanto, se $g = +1$, isso resultará em um espalhamento direcionado para frente (tanto para -1 e $+1$ prevalece o espalhamento Mie). Em tecidos biológicos, os valores para g variam de $0,7$ a $0,99$.

Outro parâmetro muito importante também listado na literatura é o coeficiente de espalhamento reduzido (μ_s'), uma variável que relaciona o coeficiente de espalhamento (μ_s) e anisotropia (g) e que é expressa pela seguinte equação:

$$\mu_s' = (1 - g) \cdot \mu_s \quad (19)$$

em que μ_s' representa a probabilidade de um fóton ser espalhado durante o caminho percorrido quando o espalhamento é especificado em um meio isotrópico (DONTU, 2007).

2.6 Fantomas

De um modo geral, o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico por imagem e as intervenções terapêuticas físicas requerem o uso de objetos simuladores para representar as propriedades de um tecido biológico. Dessa forma, a fim de imitar as propriedades ópticas deste material, foram desenvolvidos os fantomas, também conhecidos como mimetizadores ou simuladores.

Estes objetos são confeccionados e empregados com o objetivo de calibrar e simular a distribuição da luz no tecido biológico, além de servir como medida de comparação de referência em relação a um dispositivo óptico (LAMOUCHE et al., 2012). O exemplo de um fantoma utilizado em pesquisa biomédica simulando o comportamento de um fígado humano para obtenção de imagens médicas é apresentado na figura 17 abaixo:

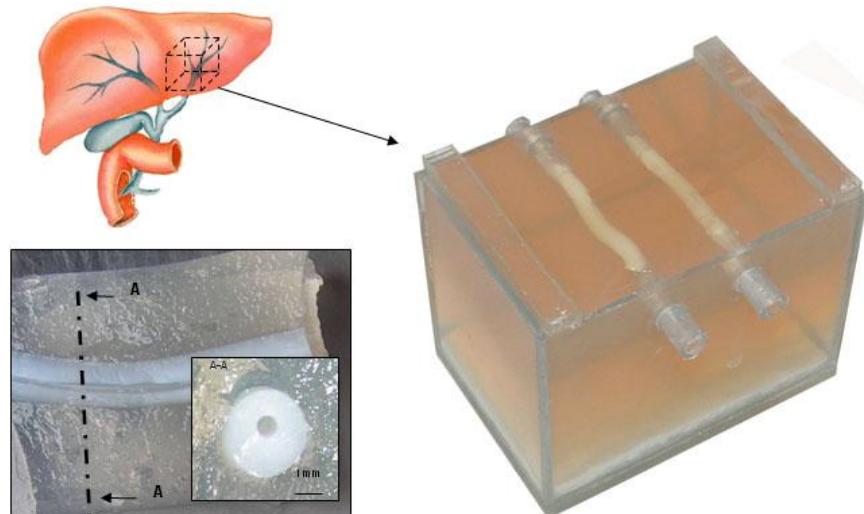


Figura 17: Exemplo de protótipo de um tecido hepático com sistema vascular, onde um fantoma foi utilizado em uma investigação de contraste experimental por ultrassonografia intravenosa (SANNINO, 2018).

Diversos tipos de fantomas são descritos na literatura como objetos que tem a capacidade de simular as propriedades ópticas de tecidos biológicos. Como exemplos, entre os fantomas mais empregados há o leite homogeneizado, as ceras, as suspensões de óleos, as

gorduras em solução aquosa e os materiais simuladores, considerados fantomas líquidos. Entretanto, há dificuldade na criação de um único fantoma com camadas feitas de diferentes materiais.

Outro tipo de simulador usado frequentemente são os fantomas sólidos, tal como o ágar, agarose, poliacrilamida, entre outros. Estes materiais podem ser cortados e moldados, bem como sofrer adição de corantes ou tintas a prova d'água de modo que permitam heterogeneidades. Contudo, os fantomas desenvolvidos a partir dos materiais citados possuem tempo de vida limitado.

Como alternativa para melhorar resistência de fantomas, há o uso de borrachas ou plásticos devido ao fato de que a estabilidade óptica desses simuladores se mantém por maior tempo e eles possuem grande flexibilidade no processo de moldagem. Em relação às composições que podem ser citadas deste grupo, estas incluem o silicone, o poliéster, o poliuretano e a resina epóxi. A escolha do material é feita observando as características do absorvedor e da estabilidade do meio (MOFFITT; CHEN; PRAHL, 2006). Na figura 18 são apresentados os fantomas de um rim confeccionados com diferentes materiais (elastômero de silicone, gel de agarose e polidimetilsiloxano) a fim de recriar as propriedades ópticas desse órgão.

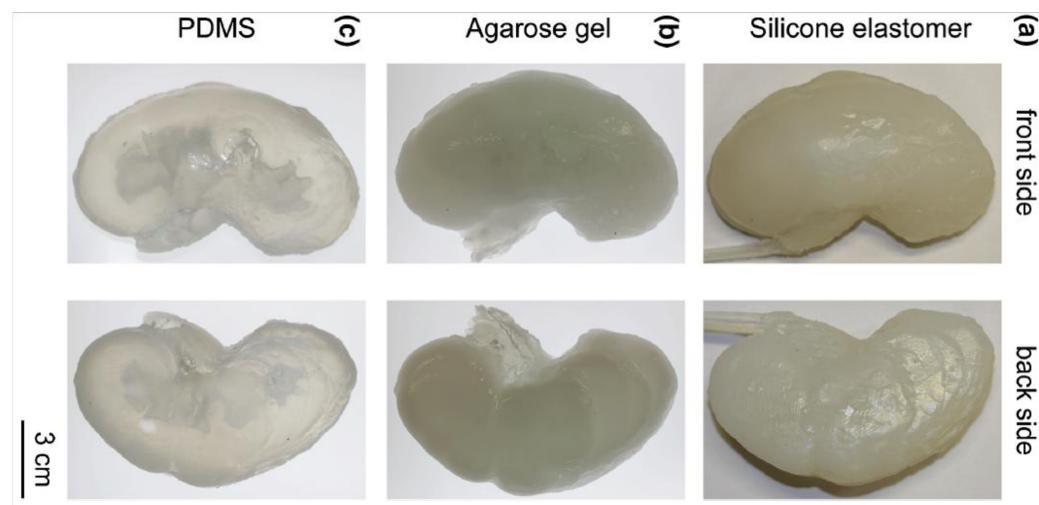


Figura 18: Imagens dos fantomas de um rim feitos de diferentes materiais (frente e verso): (a) elastômero de silicone, (b) gel de agarose, (c) polidimetilsiloxano ou silicone (doravante PDMS) (ADAMS et al., 2017)

Da mesma forma que materiais absorvedores são adicionados à matriz do fantoma óptico, também são acrescentados materiais espalhadores na tentativa de recriar as

propriedades de espalhamento quando a luz é distribuída em tecidos biológicos. Entre os agentes espalhadores melhores descritos na literatura estão o dióxido de titânio (TiO_2), o óxido de Alumínio (Al_2O_3), o dióxido de silicone e as microesferas de vidro ou látex (AKARÇAY et al., 2012).

Muitos dos estudos com fantomas se baseiam no desenvolvimento de objetos regulares para simular os coeficientes de absorção (μ_a) e de espalhamento reduzido (μ_s') de tecidos biológicos em determinados comprimentos de onda (λ). Dessa forma, há um interesse específico no desenvolvimento de simuladores que sejam bioquimicamente e biologicamente compatíveis com as propriedades particulares de tecidos e que contenham importantes moléculas biológicas como hemoglobina, melanina, entre outras.

Por fim, outra possibilidade para o desenvolvimento de simuladores específicos são os fantomas híbridos, cujas características combinam informações morfológicas dos tecidos biológicos, sendo propriedades elásticas, bioquímicas, elétricas, térmicas e magnéticas, junto com as propriedades ópticas e as informações sobre concentrações de água e lipídeo. Assim, estas informações poderão ser abordadas por métodos de aquisição de imagens em momentos diferentes (POGUE; PATTERSON, 2006).

2.6.1 Nanopartículas de Zinco Ftalocianina (ZnPc)

Primeiramente, as metal-ftalocianinas são substâncias cromóforas que participam da classe de componentes aromáticos e são usualmente empregadas como corantes. Sendo assim, suas propriedades incluem uma intensa absorção na região do visível (VIS) e diversas aplicações destas moléculas podem ser observadas, seja na terapia fotodinâmica (PDT) como também em matérias funcionais para células solares, sensores, entre outros (UENO; MACHADO; MACHADO, 2009).

Grande parte da atenção sobre as metal-ftalocianinas é voltada ao seu uso terapêutico na terapia fotodinâmica (doravante PDT – *photodynamic therapy*) porque há o coeficiente de absorção na região do visível de 650-680 nm dentro da faixa espectral da janela óptica terapêutica, a qual permite uma maior penetração da luz no tecido. Ainda, deve-se considerar que as propriedades fotofísicas das metal-ftalocianinas são fortemente governadas pelo íon metálico central presente nas moléculas (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004). A estrutura química das metal-ftalocianinas pode ser visualizada na figura 19 a seguir:

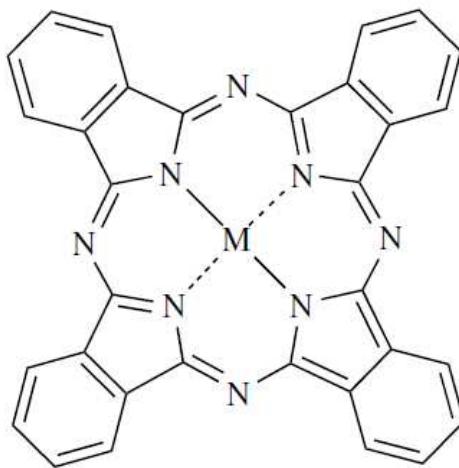


Figura 19: Estrutura das Ftalocianinas (PRASAD, 2003)

A introdução do íon metal central, seja por meio do Zinco (Zn) ou do Alumínio (Al), no anel central da molécula produz o efeito de estado tripleto de vida mais longa da molécula, o que é uma condição para eficiência da fotosensibilização na PDT. Ainda, com relação a estes cromóforos, quimicamente estes possuem baixa solubilidade e caráter hidrofóbico (PRASAD, 2003).

Na presente pesquisa, foi utilizado o corante Zinco Ftalocianina (ZnPc) como um cromóforo e sua escolha foi feita levando em consideração as propriedades ópticas únicas deste fotosensibilizador. Especificamente, quando esta molécula planar aromática está imersa no solvente Dimetilsulfóxido (DMSO), pode-se observar no seu espectro de absorção característica um pico máximo de 672 nm. Já na região do espectro visível, observa-se um ombro (pequena elevação) em 645 nm, bem como uma banda fraca de 606 nm. Além disso, na região característica do ultravioleta (UV) há a presença da absorção da ZnPc com uma região com pico máximo em 345 nm. Outra informação relevante é a respeito de sua fluorescência; quando a molécula está imersa no solvente citado, ocorre um pico máximo em 680 nm (SHARMA et al., 2013).

Todas as informações mencionadas anteriormente a respeito dos picos de absorção da molécula Zinco Ftalocianina podem ser observadas na figura 20 a seguir:

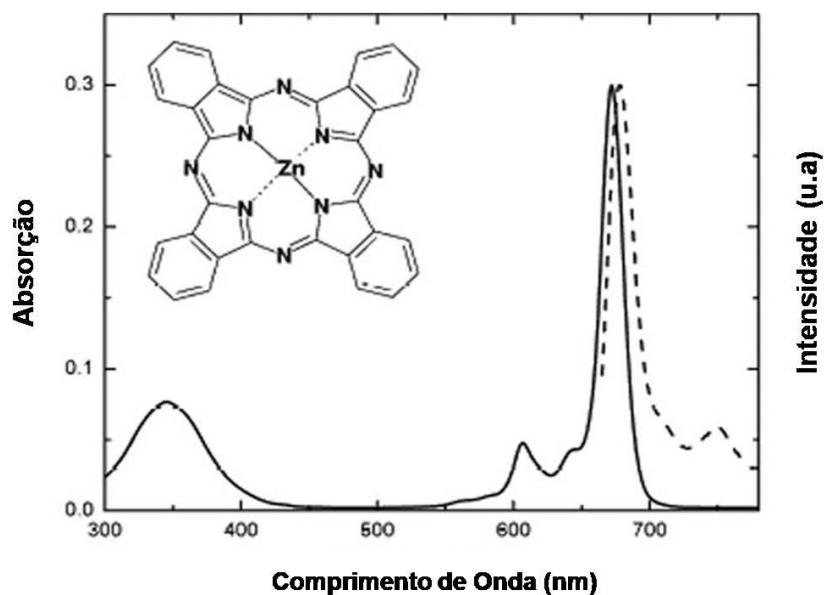


Figura 20: Espectro de absorção e fluorescência do corante Zinco Ftalocianina (ZnPc) no solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) (SHARMA et al., 2013).

2.6.2 Nanopartículas de ouro (Au)

Em geral, as nanopartículas de Ouro (Au) são alvos de estudos em aplicações biomédicas devido à possibilidade de funcionalizar essas estruturas por meio do controle geométrico e de suas propriedades ópticas, de modo que são empregadas em terapia gênica; biosensores; fototerapia a laser para células e tumores cancerígenos; bioimagem óptica; monitoramento de células e tecidos biológicos; entre outras aplicações (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2011).

Dessa forma, o tamanho das nanopartículas, sendo < 100 nm, proporciona as propriedades físico-químicas distintas da forma *bulk*, um material de origem ou um sólido estendido, o que fornece às nanopartículas de Au um reforço na agregação de demais partículas e melhoramento na fotoemissão, bem como uma alta condutividade térmica e elétrica.

Assim, existe uma forte absorção óptica na região do visível, resultado das oscilações de *plasmons* na superfície de elétrons livres, ou seja, a nuvem de elétrons pode oscilar na superfície da partícula e absorver radiação eletromagnética em uma energia específica.

As bandas de absorção das nanopartículas de Au são apresentadas em função da dimensão e do raio das nanopartículas metálicas, de modo que uma solução coloidal para o Au se apresenta tendendo para a cor vermelha. Logo, pode-se inferir que as mudanças no

tamanho nas nanopartículas podem resultar em alterações no espectro de absorção do UV-VIS (ABDELHALIM; M. MADY, 2012).

Na figura 21 a seguir, é possível observar a variação do espectro de absorção das nanopartículas de Ouro quando o diâmetro delas é de 10, 20 e 50 nm:

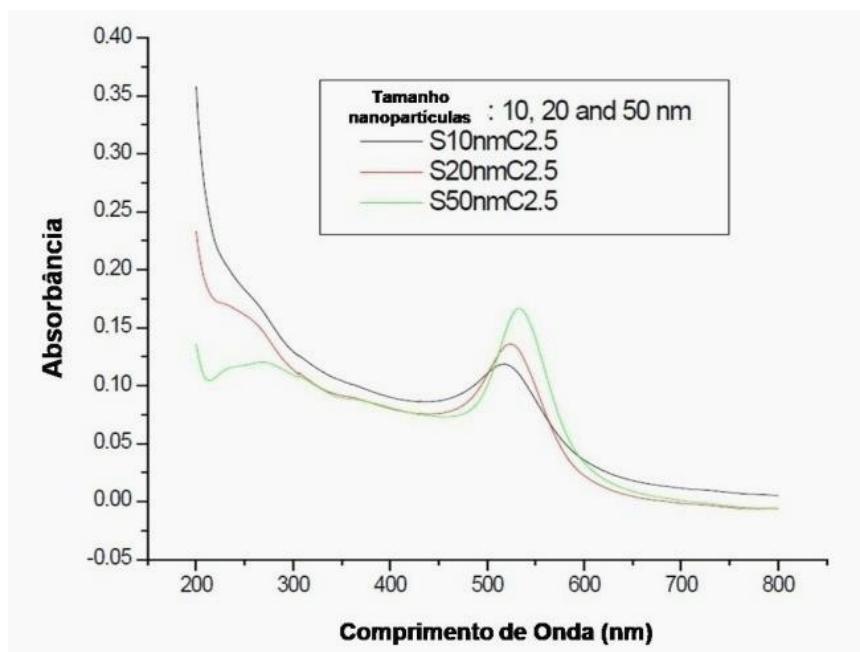


Figura 21: Espectro de absorção de nanopartículas de Au nas dimensões de 10, 20 e 50 nm (Adaptado de ABDELHALIM; M. MADY, 2012).

2.7 O transporte da luz em tecidos biológicos

Sendo ambientes de propagação e distribuição de luz, a maioria dos tecidos biológicos pode ser vista como meios turbinados, considerando que estes são compostos por estruturas heterogêneas que produzem diferenças em suas propriedades ópticas, incluindo o coeficiente de absorção (μ_a), o coeficiente de espalhamento (μ_s), o índice de refração (n) e o fator de anisotropia (g) (FUKUTOMI; ISHII; AWAZU, 2016).

Especificamente, quando a luz penetra na pele, tanto o fenômeno de absorção quanto o de espalhamento podem ocorrer simultaneamente, de modo que a combinação de ambos dá origem ao coeficiente de transporte (μ_{tr}), o qual corresponde ao decréscimo da energia por unidade de área da luz incidente e que pode ser expresso pela equação:

$$\mu_{tr} = \mu_a + \mu_s \quad (20)$$

A partir da relação (20), também é possível obter o livre caminho médio total (l_t) dos fótons incidentes (VO-DINH; MASTERS, 2004), representado pela equação:

$$l_t = \frac{1}{\mu_{tr}} = \frac{1}{\mu_a + \mu_s} \quad (21)$$

Outro critério importante utilizado para descrever as características de um meio turbido e que está relacionado aos parâmetros ópticos anteriormente citados acima é o Albedo óptico (a). Esta variável é definida pela razão entre o coeficiente de espalhamento (μ_s) e o coeficiente de transporte (μ_{tr}):

$$a = \frac{\mu_s}{\mu_a + \mu_s} \quad (22)$$

Dessa forma, quando $a = 0$, a atenuação corresponde apenas ao evento de absorção, enquanto que, no caso de $a = 1$, o evento de espalhamento prevalece. No entanto, se $a = \frac{1}{2}$, então há igualdade de magnitude entre os coeficientes de absorção e espalhamento, tal que $\mu_a = \mu_s$.

Quando há pesquisa científica com meios turbidos, a profundidade também se torna um importante parâmetro, o qual pode ser definido como

$$d = \int_0^S \mu_s \, ds' \quad (23)$$

em que ds' corresponde a um segmento de caminho óptico e S é o comprimento total do caminho óptico (NIEMZ, 2007).

No estudo da interação dos fótons com tecidos biológicos, um dos pontos principais é a compreensão da propagação da luz no meio turbido por meio de simulações e uso de diversos modelos teóricos, de modo que parâmetros ópticos, tais como o coeficiente de absorção e espalhamento, o índice de refração e a anisotropia sejam utilizados como

informações de entrada e possibilitem a compreensão e a determinação da distribuição de luz no tecido biológico.

Entre os métodos mais usados para moldar soluções de problemas envolvendo a interação da luz com tecidos biológicos estão a equação de transferência radioativa (ETR), o método de *Monte Carlo* (MC) e a teoria da difusão (TD). No primeiro caso, a equação de transferência radioativa (ETR) é complexa para a obtenção de uma solução analítica, de modo que é simplificada pela aproximação da difusão e resolvida por elementos finitos. No caso da técnica de *Monte Carlo*, este simula a migração de fótons a partir de um tratamento computacional estatístico, sendo, então, um processo preciso, porém lento. Por último, na teoria da difusão (TD), tem-se um método rápido, mas impreciso para a análise da distribuição de luz próximo de sua fonte (WANG; LIANG, 1999).

2.8 Equação transporte radiativo (ETR)

Em um meio turbido como o tecido biológico, a luz sofre eventos de espalhamento e absorção causados pela composição heterogênea, de modo que uma caracterização matemática apropriada para esta situação pode ser obtida por meio de duas possibilidades: a teoria analítica ou a teoria de transporte radiativo.

No primeiro caso, a teoria analítica para explicar a propagação da luz em uma região turbida faz uso das equações de Maxwell, utilizadas para descrever fenômenos do eletromagnetismo. Entretanto, as complexidades matemáticas envolvidas neste método tornam a sua utilização limitada, principalmente na obtenção de soluções analíticas (ISHIMARU, 1989).

Sendo assim, uma segunda opção é utilizar a equação de transporte radiativo, também denominada equação de transporte de Boltzmann, a qual modela a propagação da luz em um meio turbido, considerando que os fótons possam ser tratados como partículas que se propagam neste meio (FANTINI, S. FRANCESCHINI, 2002).

Dentro da teoria de transporte radiativo, uma das principais grandezas é a radiância $J(\vec{r}, \vec{s})$, cujas unidades são $[Wm^{-2}sr^{-1}]$ e representa a quantidade que descreve a propagação da energia dos fótons (densidade de fluxo) na posição \vec{r} em uma direção específica \vec{s} dentro de um ângulo sólido unitário $d\omega$. Ao longo de um intervalo de tempo dt , na medida em que os fótons se propagam no espaço, estes perdem energia devido aos eventos de absorção e

espalhamento fora da direção \vec{s} ; porém eles ganham energia da luz espalhada provindas de outras direções e da fonte de luz localizada em \vec{r} .

Assim, a expressão diferencial obtida a partir da radiância é a equação de transporte radiativo (ETR), que é escrita como (NIEMZ, 2007):

$$\frac{d}{ds} J(\vec{r}, \vec{s}) = -\mu_t J(\vec{r}, \vec{s}) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} P(\vec{s}, \vec{s}') J(\vec{r}, \vec{s}') d\omega' \quad (24)$$

em que $P(\vec{s}, \vec{s}')$ representa a função de fase do fóton espalhado da direção \vec{s} para \vec{s}' e ds corresponde ao comprimento infinitesimal do percurso e $d\omega'$ ao elemento de ângulo sólido sobre a direção \vec{s}' .

Outro termo derivado da radiância é a intensidade $I(\vec{r})$, a qual é obtida a partir da integração sobre o ângulo sólido e é representada pela equação:

$$I(\vec{r}) = \int_{4\pi} J(\vec{r}, \vec{s}) d\omega' \quad (25)$$

De outro modo, a radiância pode ser expressa em função da intensidade da seguinte forma:

$$J(\vec{r}, \vec{s}) = I(\vec{r}) \delta(\omega - \omega_s) \quad (26)$$

em que $\delta(\omega - \omega_s)$ corresponde à função de delta do ângulo sólido na direção \vec{s} .

Logo, quando um feixe de luz incide em um meio tóxico como é o caso dos tecidos biológicos, a radiância no interior do meio pode ser coerente (J_C) ou difusa (J_d), tal que:

$$J = J_C + J_d \quad (27)$$

Entretanto, quando se utiliza a equação de transporte radiativo, a componente difusa da radiância torna-se um problema, visto que os fótons que sofreram espalhamento não possuem caminho óptico determinado. Desse modo, são necessárias oportunas aproximações e abordagens estatísticas, de modo que deve-se observar tanto o valor do albedo (α) como também saber se o processo de atenuação se refere à absorção ou ao espalhamento. Sendo assim, cada método leva em consideração condições de contorno apropriadas para individuais

problemas, sendo que a precisão de resposta está relacionada ao tempo de cálculo necessário (NIEMZ, 2007).

2.9 Aproximação pela equação de Difusão

Geralmente, um modelo amplamente aceito para o estudo da propagação da luz em tecidos biológicos consiste na equação de transferência radiativa (ETR). Contudo, esta equação não demonstra soluções analíticas voltadas para geometrias arbitrárias e as soluções numéricas, muitas vezes densas, tornam-se problemas computacionais de elevado custo para processamento (TARVAINEN; VAUHKONEN; ARRIDGE, 2006).

Uma alternativa para contornar este problema é utilizar o método de aproximação por meio da equação da difusão (FISHKIN; GRATTON, 1993), cuja aplicação é limitada para um meio em que o coeficiente de espalhamento reduzido deve ser muito maior do que o coeficiente de absorção ($\mu_s' \gg \mu_a$). Tal condição é observada em tecidos biológicos na região de 600 nm a 900 nm e para grandes distâncias de separação entre fonte e detector ($\rho \gg 1/\mu_s'$), ou seja, para distâncias muito maiores do que o caminho livre médio de espalhamento. Deste modo, os fôtons que adentram o volume de tecido extraem suas propriedades ópticas e geram valores médios correspondentes da parte sondada (REIF; A'AMAR; BIGIO, 2007).

Assim, para fôtons que estão sendo propagados em um meio turvo como os tecidos biológicos, a aproximação pela equação da difusão pode ser escrita classicamente como (PROFIO, 1988)

$$\frac{\partial \varphi(r, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \varphi(r, t) - \nu \mu_a \varphi(r, t) + \nu S_0(r, t) \quad (28)$$

em que φ é a taxa de fluência e D é o coeficiente de difusão que, por sua vez, é dado por

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu_s')} \quad (29)$$

de modo que, se $\mu_s' \gg \mu_a$, então podemos reescrever a equação (29) como :

$$D \approx \frac{1}{3\mu_s} \quad (30)$$

Ainda, retomando os termos anteriores da equação (28), temos que ∇^2 é operador laplaciano, v é a velocidade da luz no meio e S_0 corresponde ao termo da fonte isotrópica. Maiores detalhes serão explorados em outros tópicos.

3. IMAGEM NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA ESPACIAL (SFDI)

3.1 Fatores que influenciam na qualidade da imagem

Primeiramente, o estudo de imagens na área biomédica possui grande relevância, visto que é um dos diversos caminhos responsáveis pela detecção, diagnóstico e tratamento de doenças, além do planejamento de terapias específicas para cada moléstia.

Um fator imprescindível quando se trabalha com imagens é sua qualidade, uma vez que decisões clínicas serão tomadas a partir apenas das informações visualizadas (GRAFF; SIDKY, 2015).

Dessa forma, um dos métodos para precisar a qualidade de um sistema de imagens é por meio de variáveis físicas como a resolução e o contraste. A resolução é a medida da habilidade que um sistema de imagens possui para reproduzir os detalhes de um objeto. Como exemplo, se dois quadrados pretos estiverem posicionados muito próximos em um fundo branco e forem imaginados como dois pixels vizinhos, estes terão a aparência de um retângulo preto. Porém, para que haja diferenciação entre eles, é necessário estabelecer um espaço. Assim, encontrar uma distância mínima para conseguir observar os dois quadrados distintamente é o que determina a resolução do sistema.

A alternância entre a parte preta e a branca pode ser expressa como pares de linha por milímetro (pl/mm). Este parâmetro também corresponde à frequência, de forma que seu inverso dá origem ao espaçamento resolvido entre duas linhas em milímetros (mm). Quando há a possibilidade de observar dois objetos como apenas um, o sistema de imagens é declarado como de baixa resolução, enquanto que se houver a possibilidade da distinção de ambas as estruturas anteriores, então o sistema é considerado de alta resolução (BALLRICK et al., 2008; STACK, 2010).

O efeito da resolução pode ser exemplificado pela figura 22, de modo que o espaçamento entre a linha preta e a parte branca diminui à medida que caminhamos para o centro da figura, ou seja, a resolução diminui das bordas para o centro do desenho:

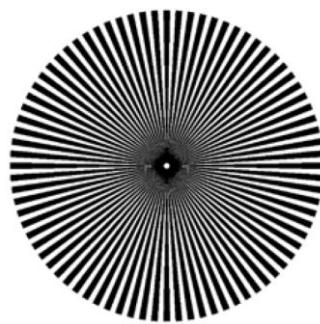


Figura 22: Exemplo do limite da resolução em um alvo circular (STACK, 2010).

No caso do contraste, este se refere à diferença com que as áreas de contorno da imagem são reproduzidas com relação entre si e pode ser expresso em termos da escala de cinza, que é exemplificada na figura 23(a). Para uma imagem que possui boa definição, detalhes por exemplo em pretos deverão ser pretos e os detalhes brancos deverão permanecer brancos; assim, quanto mais houver diferença entre a intensidade de uma linha escura e outra branca, melhor será o contraste da imagem. Na figura 23(b), é mostrado que à medida que dois pontos circulares em vermelho se aproximam, o contraste da imagem resultante diminui.

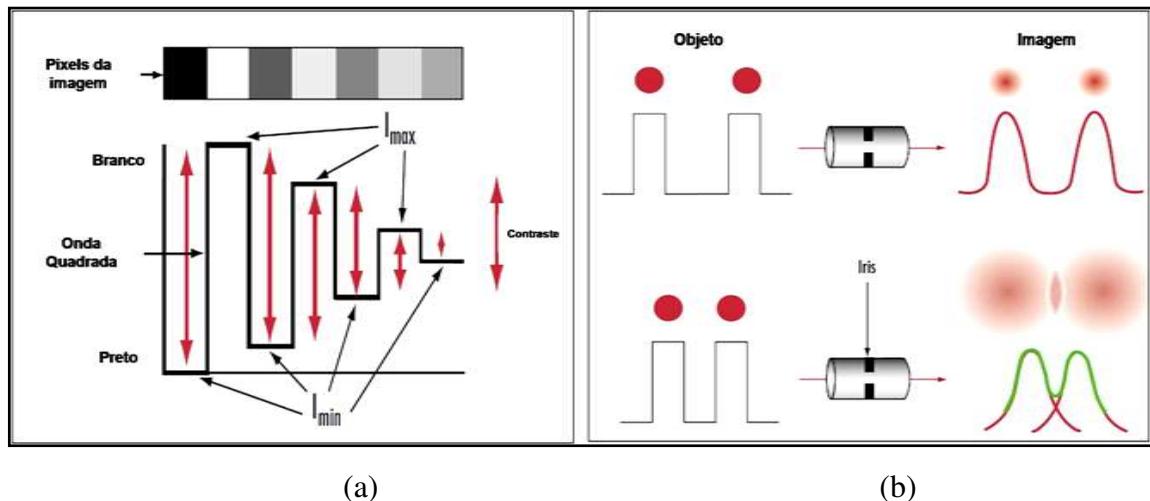


Figura 23: Na imagem (a), o contraste consiste na diferença de intensidade entre claro e escuro. Em (b), os pontos no topo da figura podem ser entendidos como visualizados através de uma lente, de modo que se os pontos aproximarem o contraste diminui (Adaptado de STACK, 2010).

Por fim, tais conceitos são individuais tanto para a resolução quanto para o contraste; contudo, eles são muito próximos, visto que o contraste tem uma dependência em relação à frequência de resolução. Observando o contexto da figura (b) acima, se os pontos forem fixados distantes entre si (baixa frequência espacial), a imagem formada de ambos os objetos

poderá ser visualizada mais nitidamente. Entretanto, se os dois pontos distintos são colocados próximos um ao outro (alta frequência espacial), a imagem formada pelo sistema de lentes fornece uma figura que representa os detalhes do objeto em contraste e, caso as lentes trabalhem no limite da difração, o contorno dos objetos torna-se desfocado. Ainda, em relação à figura (b), se os pontos forem fixados distantes entre si (baixa frequência espacial), a imagem formada de ambos os objetos poderá ser visualizada mais nitidamente.

3.2 A função de espalhamento pontual (PSF)

Uma das diversas formas de verificar o desempenho de um sistema de imagem é por meio da função de espalhamento pontual (PSF), a qual corresponde à resposta do sistema a um estímulo pontual e está vinculada à resolução espacial da imagem.

Sendo assim, a PSF representa a distribuição espacial da intensidade de luz na imagem provinda de um ponto objeto infinitesimal, o qual pode ser estabelecido como uma função bidimensional. Contudo, uma das adversidades na obtenção da PSF é o fato dela não reproduzir fielmente a imagem do ponto objeto (MANSON et al., 2017). A imagem resultante de uma fonte pontual formada por um sistema óptico pode ser observada na figura 24 a seguir:

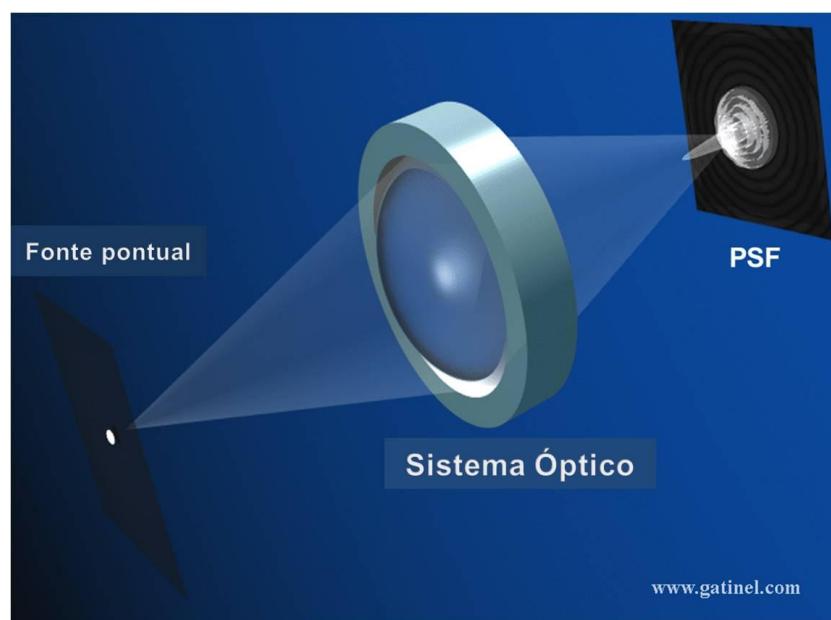


Figura 24: A imagem de uma fonte pontual formada por um sistema óptico, onde temos a chamada "Função de espalhamento pontual" (PSF). É importante observar que a imagem é afetada pela difração (Adaptado de GATINEL, 2018).

Mesmo utilizando um sistema de lentes adequadas, a imagem do ponto objeto não se assemelha a um ponto perfeito, mas sim a um ponto concentrado cercado por bandas anelares (padrões de Airy). Este efeito tem como causa a difração, de modo que a imagem obtida tenha esses padrões (ROY et al., 2014).

Por fim, na figura 25 é possível observar os padrões de Airy, visto que há uma medida pontual de maneira que o foco do laser gera uma região luminescente em torno da amostra contendo nanopartículas fluorescentes de CdSe/Zns e corante (REIS; MONTE; ALVES, 2018).

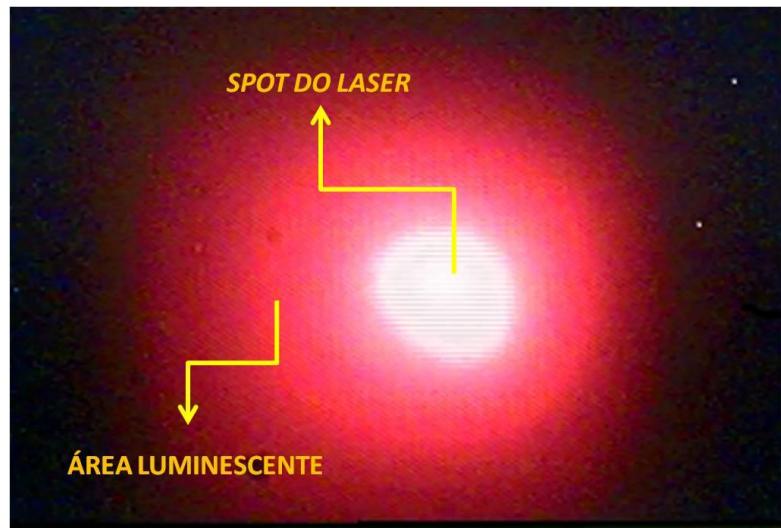


Figura 25: Técnica de varredura de superfície de microluminescência definida com uma imagem de luminescência da solução de corante Neutral Red e CdSe / ZnS em clorofórmio, obtida por uma câmera CCD (Adaptado de REIS; MONTE; ALVES, 2018).

3.3 A função de transferência de modulação (MTF)

Em geral, outro artifício utilizado para avaliar o desempenho de um sistema de imagens é a função de transferência de modulação (MTF). Esta função está associada à caracterização da resolução espacial de um sistema de imagens e pode ser encontrada indiretamente por meio da denominada transformada de Fourier da PSF (MANSON et al., 2017).

Especificamente, a MTF é uma ferramenta utilizada para estimar a qualidade de imagens obtidas por um sistema óptico por meio da transferência de frequências espaciais relacionadas ao objeto. A função pode ser estimada com alvos periódicos em forma de linhas

ou pontos que são projetados. Posteriormente, as imagens são obtidas e gravadas para diferentes posições dos alvos no objeto; estas são processadas pelo método da transformada de Fourier na PSF para obter a MTF do objeto (PRIMOT; CHAMBON, 1997).

Entre os alvos utilizados para serem projetados no objeto estão o alvo de borda inclinada, o alvo de onda senoidal e o padrão de barra (barra / quadrado). O alvo de borda inclinada utiliza pouca análise computacional comparada com os outros métodos e necessita apenas de uma imagem para análise.

No caso do alvo em onda senoidal, exemplificado na figura 26, este corresponde a um conjunto de ondas senoidais que utiliza reflexão e transmissão em diferentes padrões de frequências. Particularmente, para cada frequência de padrão de onda senoidal, a modulação é mensurada e a imagem é gravada. Uma questão importante é que a qualidade do alvo projetado é essencial para a precisão dos resultados.

Por último, há o alvo como padrão de barra, o qual utiliza linhas cruzadas ortogonais que podem ser classificados como padrões quadrados ou barras e são mais fáceis de gerar comparados ao método anterior. Contudo, a aquisição da MTF para esta situação não é razoável como o de padrões senoidais (ZHANG et al., 2012).

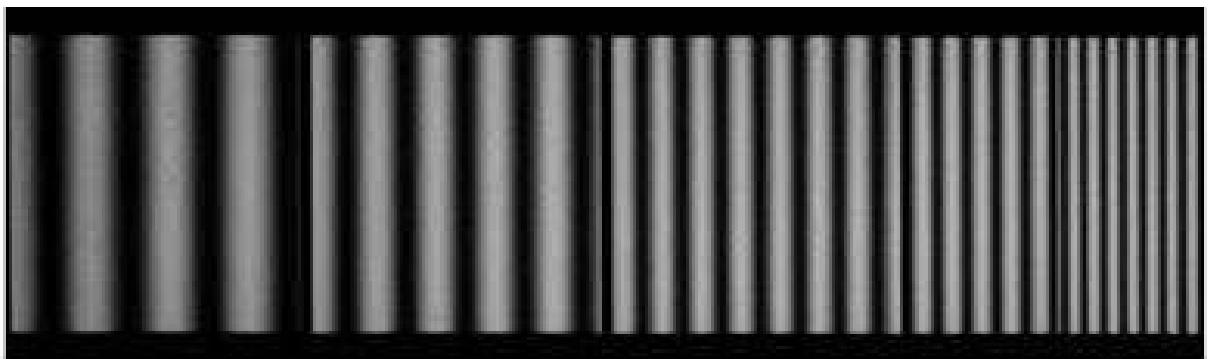


Figura 26: Alvo de onda senoidal variando em diferentes frequências espaciais (BOREMAN, 2001).

A MTF é a resposta do comportamento de um sistema óptico de imagem a entrada de ondas senoidais em distintas frequências espaciais do objeto. Deste modo, a resposta da imagem ao sistema é um deslocamento nos vales e a redução da amplitude da onda senoidal na imagem em relação ao objeto (BOREMAN, 2001).

Nas figuras 27, 28 e 29 existem três sistemas em que a frequência espacial foi aumentada de forma crescente em 20, 508 e 1000 lp/mm, respectivamente. Percebe-se

nitidamente que na medida em que a frequência espacial aumenta, a imagem resultante tende à escala de cinza, reduzindo o contraste e a resolução.

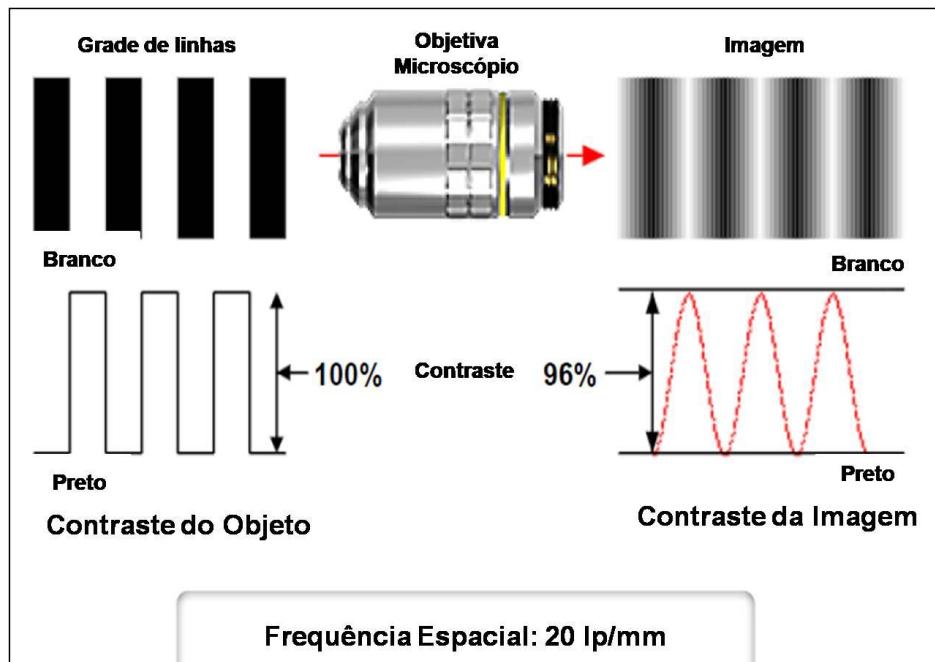


Figura 27: O efeito do aumento da frequência espacial em 20 lp/mm em contraste da imagem em um sistema óptico (Adaptado de SPRING; DAVIDSON, 2018).

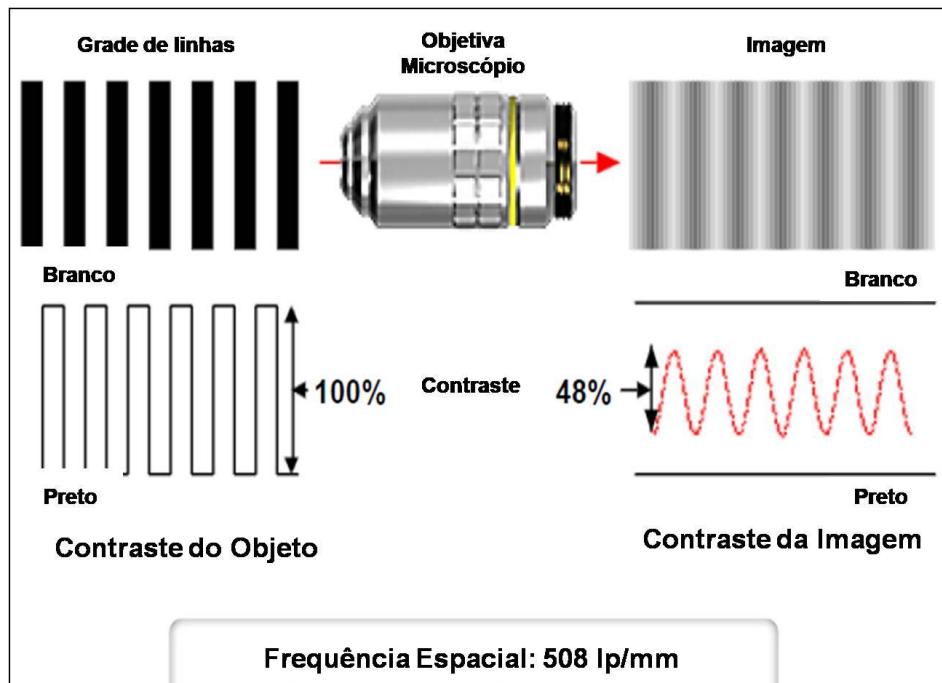


Figura 28: O efeito do aumento da frequência espacial em 508 lp/mm em contraste da imagem em um sistema óptico (Adaptado de SPRING; DAVIDSON, 2018).

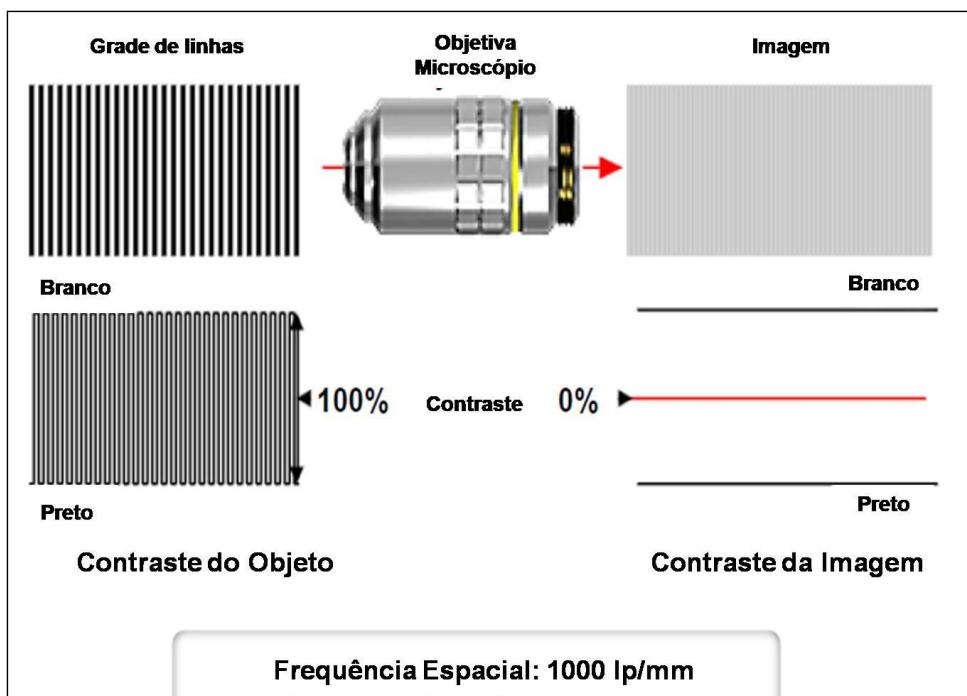


Figura 29: O efeito do aumento da frequência espacial em 1000 lp/mm em contraste da imagem em um sistema óptico (Adaptado de SPRING; DAVIDSON, 2018).

No domínio das frequências espaciais, padrões senoidais são utilizados em distintas frequências espaciais para capturar o maior número de detalhes do objeto em estudo. Contudo, a resolução espacial prejudica na modulação em relação ao objeto devido sua delimitação, isso quando o trabalho é feito em altas frequências e os detalhes são suprimidos consequentemente.

Assim, uma expressão pode ser definida para a modulação, a qual corresponde à razão entre a modulação da imagem (sinal de saída) e a do objeto (sinal de entrada), ou seja, (BOREMAN, 2001):

$$MTF = \frac{\text{Modulação da Imagem (MI)}}{\text{Modulação do Objeto (MO)}} \quad (31)$$

Considerando que há um aumento crescente na frequência entre linhas claras e escuras espaçadas de um alvo, de modo que isso afeta o contraste diminuindo-o ou aumentando-o quando há uma variação da frequência espacial, é possível traçar uma curva caracterizando a MTF tendo como variáveis a razão entre os contrastes da imagem e do objeto, bem como as frequências espaciais.

Na figura 30 é possível observar que, para uma situação em que há um alto contraste em baixas frequências, verifica-se que é possível exibir perfeitos detalhes de objetos e imagens, enquanto que para casos em que a frequência espacial cresce, os níveis de detalhes tendem a ser reduzidos (HEGGIE; LIDDELL; MAHER, 1997).

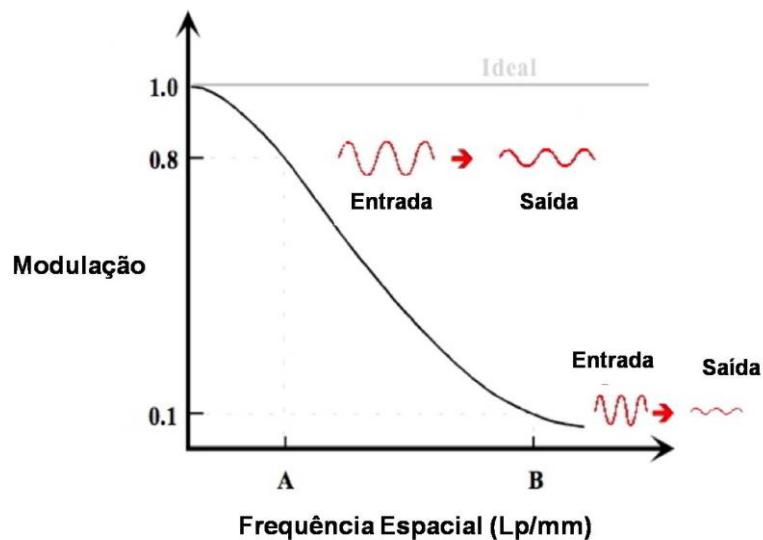


Figura 30: A qualidade real da imagem está diretamente relacionada à curva MTF integrada entre o número de pl/mm e a resolução limite, o que significa que a riqueza da informação contida na imagem é uma função da área abaixo da curva MTF (Adaptado de HEGGIE; LIDDELL; MAHER, 1997).

3.4 Medidas resolvidas temporalmente e espacialmente

A investigação das propriedades ópticas de tecidos biológicos *in vivo* tem sido alvo de intensas pesquisas, de modo que a obtenção dos parâmetros ópticos, como o coeficiente de absorção (μ_a) e de espalhamento (μ_s) pode auxiliar na compreensão da distribuição de luz no tecido. Em razão disso, o conhecimento a respeito do coeficiente de absorção (μ_a) possibilita estimar alterações na oxigenação e no volume de sangue nos tecidos, enquanto que o coeficiente espalhamento (μ_s) permite obter informações sobre a estrutura celular.

No entanto, a maioria das técnicas ópticas permite estimar apenas o coeficiente de atenuação total (μ_t), não conseguindo determinar individualmente os efeitos de absorção e espalhamento no tecido. Além disso, há a possibilidade de obter separadamente μ_a e μ_s por meio de medidas em *ex vivo*; porém, os métodos utilizados para este fim não são práticos

quando há necessidade de aferir as propriedades ópticas *in vivo* e estes clinicamente não são viáveis (DIMOFTE; FINLAY; ZHU, 2005).

Para quantificar os parâmetros ópticos de absorção e espalhamento pela reemissão ou transmissão da luz do tecido, dois métodos de medidas quantitativas são propostos: as medidas resolvidas no tempo e as resolvidas espacialmente (CUCCIA et al., 2005), as quais podem ser observadas na figura 31:

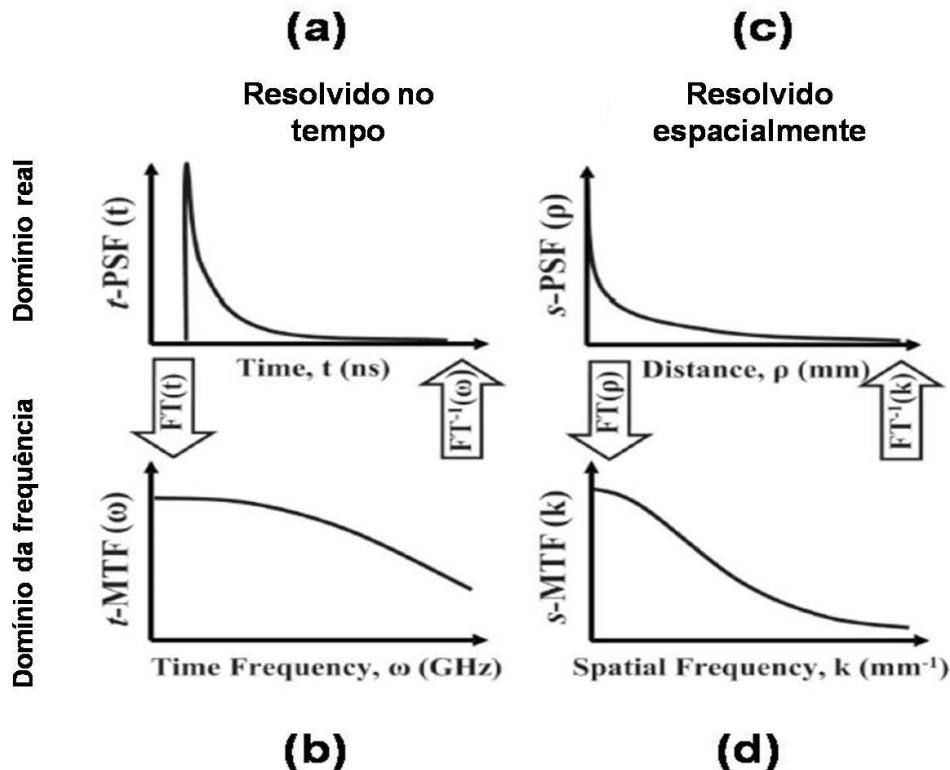


Figura 31: O transporte da luz pode ser medido temporalmente ou espacialmente, sendo no domínio real ou no domínio da frequência. Dessa forma, é importante ressaltar que o domínio real equivale ao domínio da frequência por meio da transformada de Fourier (Adaptado de CUCCIA et al., 2009).

No primeiro caso, mostrado na figura 31, para as medidas resolvidas no tempo, elas podem ser segmentadas no domínio real ou no domínio da frequência. Sendo assim, na figura 31(a), nestas medidas o tempo de propagação da luz através do tecido é mensurado, sendo que a fonte incidente e o detector são colocados em posições fixas e um pulso curto de luz (~ 1 ps), o qual é emitido no tecido, sendo que o sinal reemitido pode ser aproximado para uma função de espalhamento pontual temporal ($t\text{-PSF}$) no domínio real que é medido no detector. Assim, tem-se que a variável $t\text{-PSF}$ é plotada em função do tempo (nanosegundos) e observa-

se uma lacuna antes do surgimento de um súbito pico de fótons, seguido de um decaimento exponencial.

Ainda, além das medidas resolvidas no tempo, outro modo é o domínio da frequência correspondente à figura 31(b), a qual possui como variável experimental a função de transferência de modulação temporal (t-MTF) e sua unidade de medida é a frequência (GHz). Deste modo, a atenuação e o atraso de fase de uma onda de densidade de fótons que varia periodicamente são mensurados e se assemelham a uma curva exponencial inversa. É importante ressaltar também que a t-MTF corresponde à transformada de Fourier da função t-PSF (CUCCIA et al., 2009b).

Na figura 32(a) há mais informações sobre a t-MTF quando uma fonte de luz modulada cria temporalmente um fluxo de fótons no tecido biológico e em (b) a característica do sinal detectado após a atenuação no tecido.

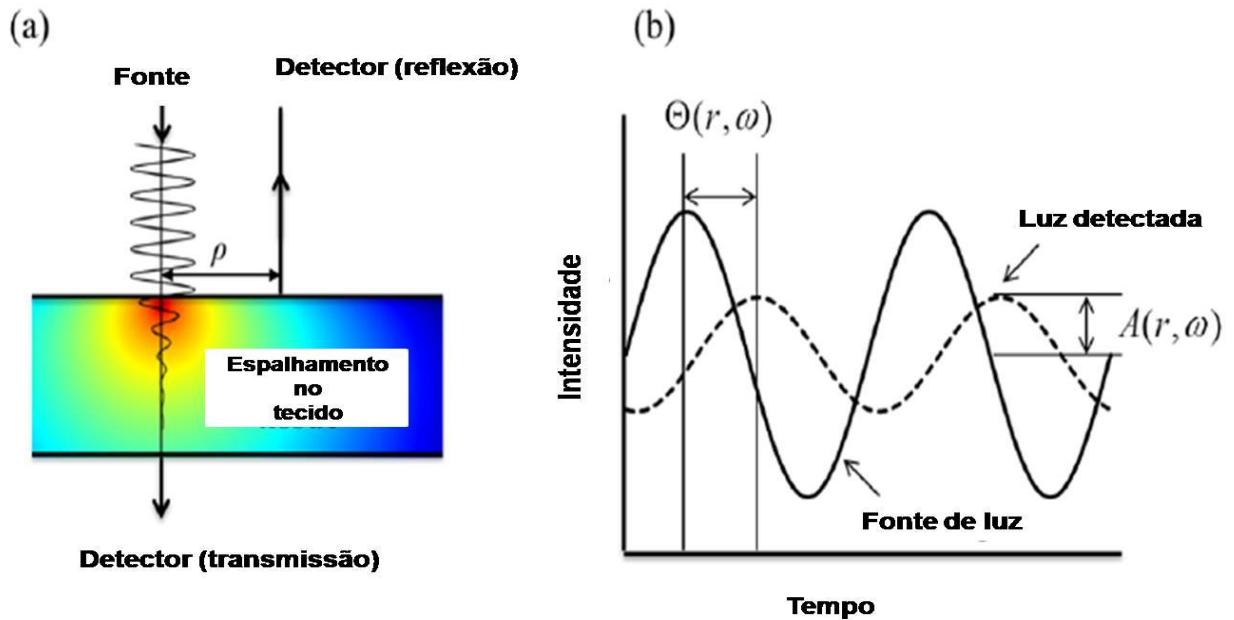


Figura 32: (a) Uma fonte de luz modulada cria temporalmente um onda de densidade de fótons que sofre atenuação no tecido e em (b), o sinal detectado sofre diminuição na sua amplitude e atraso de fase $A(r, \omega)$ em relação à fonte incidente (Adaptado de O'SULLIVAN et al., 2012).

Uma segunda alternativa para a obtenção individual dos coeficientes de absorção (μ_a) e espalhamento (μ_s) são as medidas resolvidas espacialmente, limitadas ao domínio real mostrada na figura 31(c) e ao domínio da frequência, expressa na figura 31(d). Neste sistema, a refletância é medida em múltiplas distâncias ρ em relação à posição da fonte incidente e a

curva de decaimento da refletância como função da distância ρ da fonte permite estimar os coeficientes de absorção e espalhamento.

A detecção do sinal pode ser realizada por meio de diversos pares fonte-detectores, sendo que o par é capaz de interrogar um volume de tecido e cuja ocorrência é um “banana fóton”, como é apresentado na figura 33, onde os detectores mais distantes da fonte encontram fótons e há a possibilidade de explorar volumes mais profundos na pele.

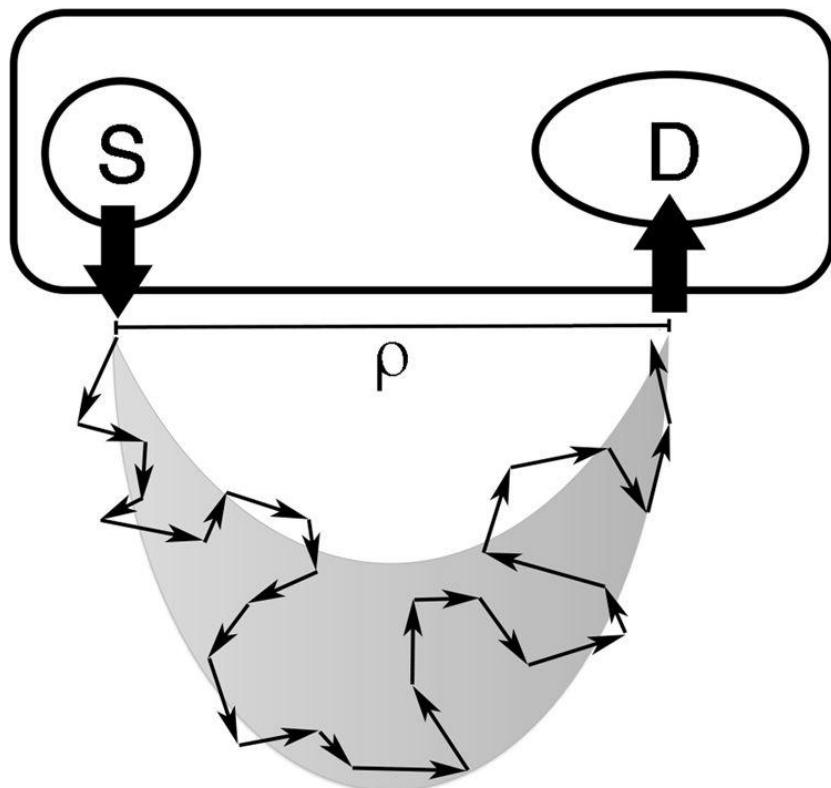


Figura 33: Exemplificação da propagação dos fótons no interior do tecido, em que S corresponde à fonte, D ao detector e ρ é a distância fonte-detector. A área curva em cinza é a “banana fóton”, atravessada pelas trajetórias dos fótons no tecido biológico (MARTINI; CORVAGLIA, 2018).

As medidas resolvidas espacialmente são semelhantes às resolvidas no tempo; contudo, a função de espalhamento pontual, a qual antes era temporal, agora será espacial e teremos, assim, a função de espalhamento pontual espacial (s-PSF), anteriormente apresentada na figura 31(c). Esta função é uma variável devido à distância de separação da fonte incidente, frequentemente medida em mm, e da curva plotada, que, por sua vez, é acompanhada de um decaimento exponencial (CUCCIA et al., 2009b).

Ainda, dentro das medidas resolvidas espacialmente, também há a medida no domínio da frequência espacial (SFD), caracterizada na figura 31(d), representada por uma função de

transferência de modulação espacial (s-MTF) e que equivale à transformada de Fourier da s-PSF, considerando que esta curva plotada que representa a s-MTF tem um formato de curva sigmoidal (CUCCIA et al., 2009b).

3.5 Aproximação da equação de difusão no domínio da frequência espacial (SFD)

Com o objetivo de quantificar as propriedades ópticas individuais de uma amostra por meio da técnica SFDI, é necessário utilizar as derivações propostas por CUCCIA et al. (2009), que estabelecem um modelo analítico para equação de difusão em meios turbidos.

Inicialmente, a equação de difusão (28) para um meio homogêneo infinito pode ser reescrita na forma independente do tempo, tal como

$$\nabla^2 \varphi - \mu_{eff}^2 \varphi = -3\mu_{tr} q \quad (32)$$

cuja variável φ representa a taxa de fluência, q é o termo da fonte, $\mu_{tr} = (\mu_a + \mu_s')$ é o coeficiente de transporte e $\mu_{eff} = (3\mu_a\mu_{tr})^{1/2}$ é o coeficiente de atenuação.

Em relação à fonte, pode-se afirmar que esta consiste em um conjunto de ondas planas periódicas, considerando uma geometria semi-infinita. Dessa forma, a equação que a representa é

$$q = q_0(z) \cos(k_x x + \alpha) \quad (33)$$

em que α é o deslocamento de fase espacial que se estende infinitamente e tangencialmente na direção x e possui dependência facultativa em relação à profundidade z e k_x representa a frequência espacial ($k_x = 2\pi f_x$). Uma representação do evento das ondas periódicas pode ser vista na figura adiante:

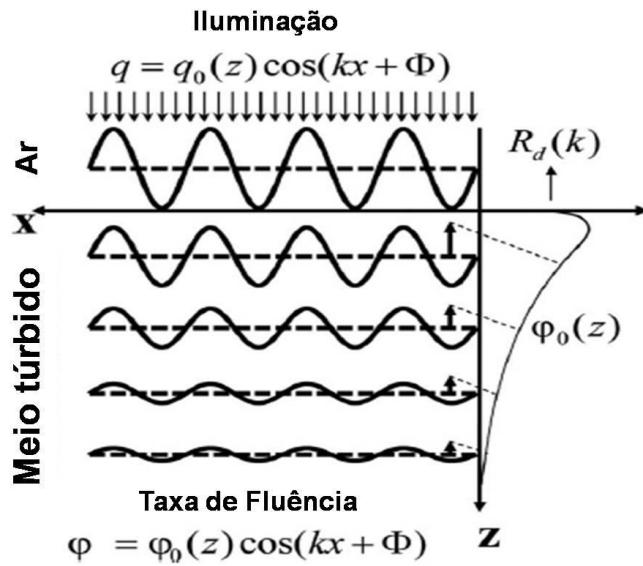


Figura 34: Esquema da fonte de iluminação projetada apenas na direção x e a taxa de fluência interna modulada resultante com a mesma frequência e fase (Adaptado de CUCCIA et al., 2009).

Considerando um meio linear, de modo que a resposta do meio é proporcional à intensidade de entrada, a fonte senoidal dá origem à taxa de refletância difusa com frequências e fases iguais. Assim, tem-se que a fonte de luz modulada será:

$$\varphi = \varphi_0(z) \cos(k_x x + \alpha) \quad (34)$$

Aplicando a equação (33) e (34) na equação (32), ou seja, estabelecendo uma relação entre a equação de difusão e a fonte de luz modulada, chega-se a uma equação diferencial parcial de segunda ordem para o caso 1-D, de forma que a taxa de fluência estará em função da profundidade z. A relação obtida será a equação a seguir

$$\frac{d^2 \varphi_0(z)}{dz^2} - \mu_{eff}^2 \varphi_0(z) = -3\mu_{tr} q_0, \quad (35)$$

tal que

$$\mu_{eff} = \sqrt{\mu_{eff}^2 + k_x^2} \equiv \frac{1}{\delta'_{eff}} \quad (36)$$

Sobre a equação (36), a variável μ'_{eff} representa a profundidade de penetração efetiva, sendo que esta equivale à fonte de iluminação planar na situação em que a frequência espacial é zero ($k = 0$). É importante ressaltar que tanto μ'_{eff} quanto δ'_{eff} são funções das propriedades ópticas e da frequência espacial de iluminação.

Ainda, de acordo com CUCCIA et al. (2009), a forma 1-D da equação (35) indica que a amplitude da onda periódica $\varphi_0(z)$ independe da dimensão espacial tangencial em x , como também aponta que a mesma equação é similar à equação de difusão para iluminação planar, o que envolve a possibilidade do uso de soluções geométricas planares substituindo μ_{eff} por um novo termo μ'_{eff} .

Quando a luz incide na pele, somente uma fração retorna como reflexão proveniente da superfície, visto que uma grande parcela da onda de densidade de fótons penetra uma determinada profundidade antes de serem absorvidos e espalhados. Assim, é possível obter informações da superfície a partir da refletância e parâmetros em uma determinada profundidade (SVAASAND et al., 1999). Ainda, a técnica SFDI tem por objetivo conseguir imagens a partir da avaliação da refletância difusa proveniente da amostra seguindo as derivações de CUCCIA et al. (2009). Logo, a refletância difusa (R_d) pode ser expressa como

$$R_d(k) = \frac{3Aa'}{\left(\frac{\mu'_{eff}}{\mu_{tr}} + 1\right)\left(\frac{\mu'_{eff}}{\mu_{tr}} + 1\right)}, \quad (37)$$

onde A é uma constante de proporcionalidade e a' é o albedo reduzido, tal que :

$$a' = \frac{\mu'_s}{\mu_{tr}} \quad (38)$$

e

$$A = \frac{1 - R_{eff}}{2(1 + R_{eff})} \quad (39)$$

Dessa forma, a variável R_{eff} corresponde ao coeficiente de reflexão efetivo e pode ser desenvolvido como:

$$R_{eff} \approx 0,0636n + 0,668 + \frac{0,710}{n} - \frac{1440}{n^2} \quad (40)$$

cuja variável n corresponde ao índice de refração do tecido biológico ou a amostra em estudo.

Por fim, em relação à equação (37), o termo $R_d(k)$ representa a função de transferência de modulação espacial difusa do meio, considerando que o padrão de iluminação em 1-D é senoidal e modelado por meio da superposição de senoides (CUCCIA et al., 2009).

3.6 A Técnica da imagem no domínio da frequência espacial (SFDI)

A imagem no domínio da frequência espacial (SFDI) corresponde a um método baseado na refletância, o qual possibilita estimar e mapear os coeficientes de absorção (μ_a) e de espalhamento (μ_s) no tecido pixel a pixel. O SFDI utiliza de iluminação estruturada em padrões senoidais, sendo que estes são projetados na superfície do tecido biológico.

Sendo assim, a pele funciona como um filtro espacial que modifica os padrões senoidais, de modo que a projeção de padrões em distintas frequências espaciais permite determinar uma função de transferência de modulação, possibilitando, por fim, encontrar os coeficientes de absorção (μ_a) e de espalhamento (μ_s) no tecido. Logo, a filtragem da luz reemittida da amostra passa por diferentes filtros do tipo passa-banda, que caracterizam cromóforos específicos do tecido biológico (LIN et al., 2013). Esta técnica é não invasiva, o que permite uma rápida determinação das propriedades ópticas de tecidos biológicos em um largo campo de visão. Além disso, a quantificação destes parâmetros ópticos é essencial para diagnosticar, classificar e detectar o estágio de patologias malignas ou benignas em doenças, especificamente o câncer (NANDY et al., 2016).

Os precursores do método SFDI foram DÖGNITZ; WAGNIÈRES (1998), que introduziram uma abordagem para separação da absorção e do espalhamento e, posteriormente, CUCCIA et al. (2005), que desenvolveram um método quantitativo para determinação de parâmetros ópticos em meios turbidos.

Basicamente, como pode ser observado na figura 35, o SFDI faz uso de um projetor digital de luz de onda contínua, contendo um demodulador digital (DMD) que cria padrões senoidais (iluminação estruturada ou imagem modulada), os quais, por sua vez, são projetados na superfície da pele.

Em relação à fonte de iluminação, esta deve ser monocromática, visto que há uma dependência do comprimento de onda (λ) em relação às propriedades ópticas e à recuperação dos cromóforos. Dessa forma, polarizadores cruzados podem ser adicionados à face da fonte e do detector para evitar a reflexão especular proveniente da superfície da amostra.

Existe também o uso de filtros ópticos na fonte ou no detector que selecionam o padrão de iluminação em diferentes comprimentos de onda (λ). Estes são limitados pelo tempo de projeção de três fases em uma única frequência espacial escolhida.

As imagens de refletância, então provindas do tecido, são recolhidas por uma câmera CCD externa sem contato com a amostra para obter a função s-MTF, a qual determina a resolução de construção das propriedades ópticas na medida em que o tecido altera os padrões de luz incidente. As informações provenientes de cada pixel das imagens de refletância são processadas individualmente em um prévio modelo de propagação de fôtons (O'SULLIVAN et al., 2012).

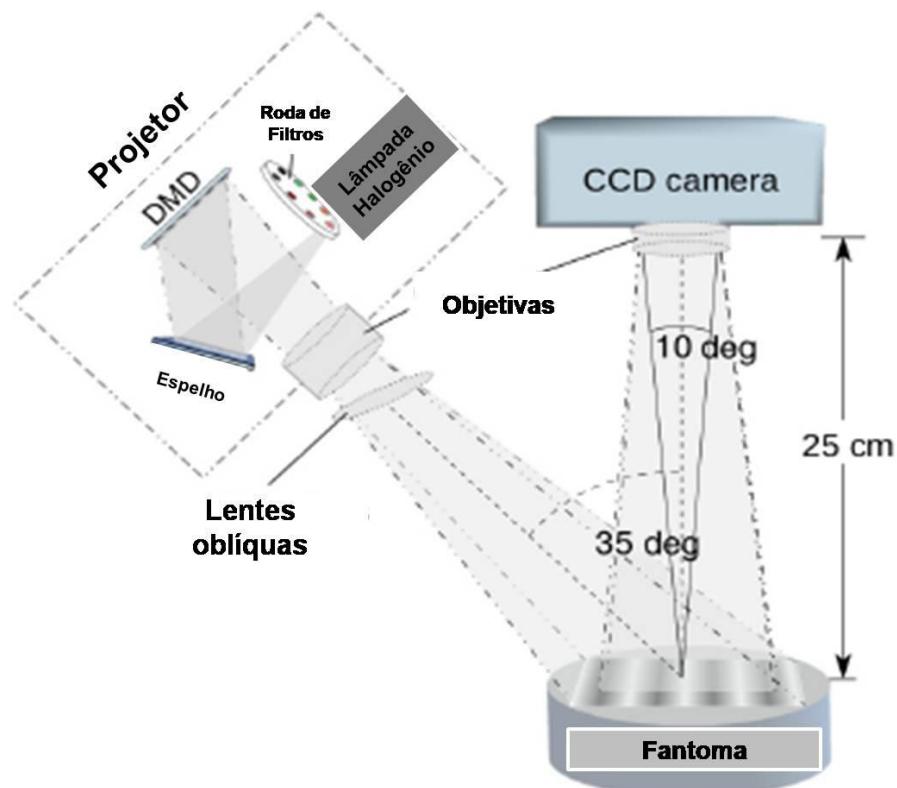


Figura 35: Esboço da montagem da técnica de imagem no domínio da frequência espacial, utilizada para projeção oblíqua de padrões senoidais (Adaptado de BODENSCHATZ et al., 2015).

3.6.1 Projeção, demodulação e obtenção da imagem

Tanto na situação de transmissão ou reflexão, a MTF pode ser obtida para um sistema turbido, pois a iluminação projetada no tecido biológico nada mais é do que uma superposição entre a componente AC (modulada espacialmente) e a DC (componente planar).

Sendo assim, a modulação $m(x)$ de uma simples onda senoidal propagando-se no eixo x e com frequência espacial f_x pode ser expressa como:

$$m(x) = M_0 \cos(2\pi f_x x + \alpha), \quad (41)$$

em que M_0 é a profundidade de modulação e α é o deslocamento de fase na equação; porém, não é possível modular a componente AC com intensidade escalar negativa. Assim, contornando o problema e iluminando o objeto em estudo com um padrão espacial constante e na direção y ortogonal, tem-se que:

$$S = \frac{S_0}{2} [1 + M_0 \cos(2\pi f_x x + \alpha)], \quad (42)$$

em que S_0 corresponde à intensidade da fonte de iluminação (CUCCIA et al., 2009).

Na condição de reflexão, a intensidade da reflexão difusa (I) consiste na soma das intensidades dos componentes de modulação AC e DC, tal que I é

$$I = I_{AC} + I_{DC} \quad (43)$$

de maneira que I_{AC} pode ser escrita como:

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

A variável $M_{AC}(x, f_x)$ desempenha a função de amplitude de uma onda de densidade de fótons refletida (intensidade modulada) em uma determinada frequência f_x .

Para contornar a condição de modulação, uma alternativa simples é utilizar a iluminação padrão senoidal com deslocamento de fase em três diferentes valores, como exibido na figura 36, sendo $\alpha = 0, 2\pi/3$ e $4\pi/3$, e na mesma frequência espacial, de modo que o $M_{AC}(x, f_x)$ pode ser recuperado e escrito como:

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

cujos valores I_1, I_2 e I_3 correspondem aos valores das intensidades das imagens refletidas com diferentes deslocamentos de fase (CUCCIA et al., 2009).

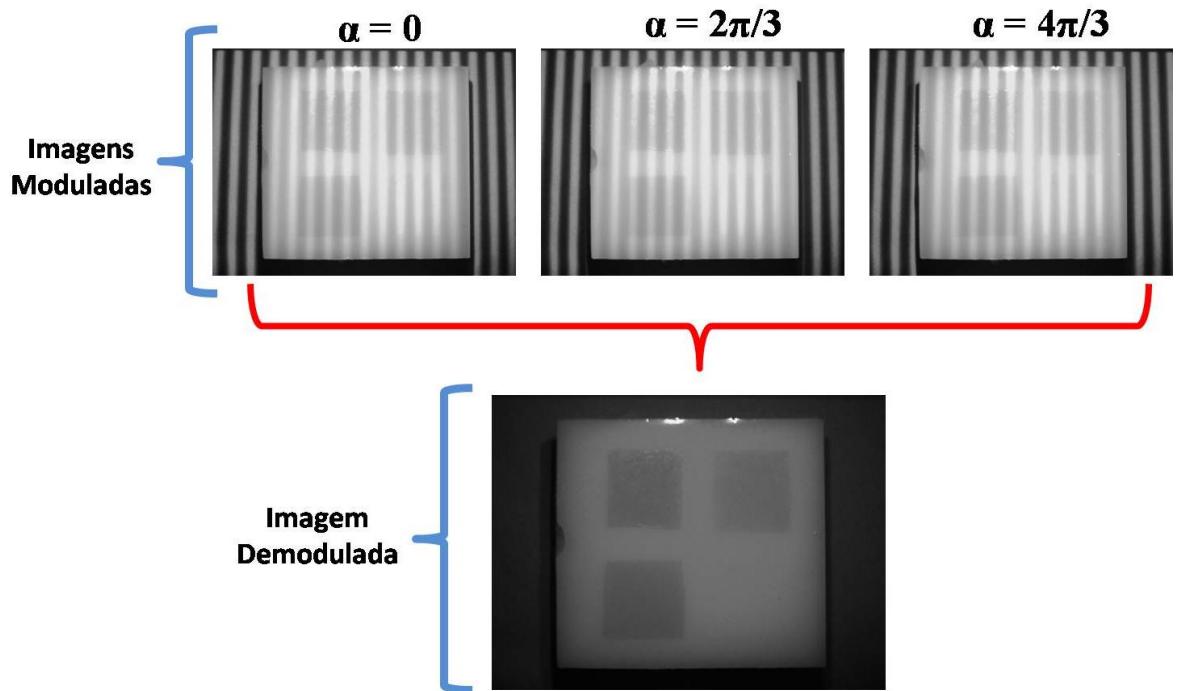


Figura 36: Modulação e demodulação da refletância difusa de um fantoma contendo camadas de ouro em diferentes concentrações.

No caso da amplitude da componente DC, que é a M_{DC} , pode ser escrita como:

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

Na figura 37, é possível observar duas situações importantes: uma que demonstra a refletância modulada espacialmente e outra que apresenta as componentes AC e DC demoduladas separadamente.

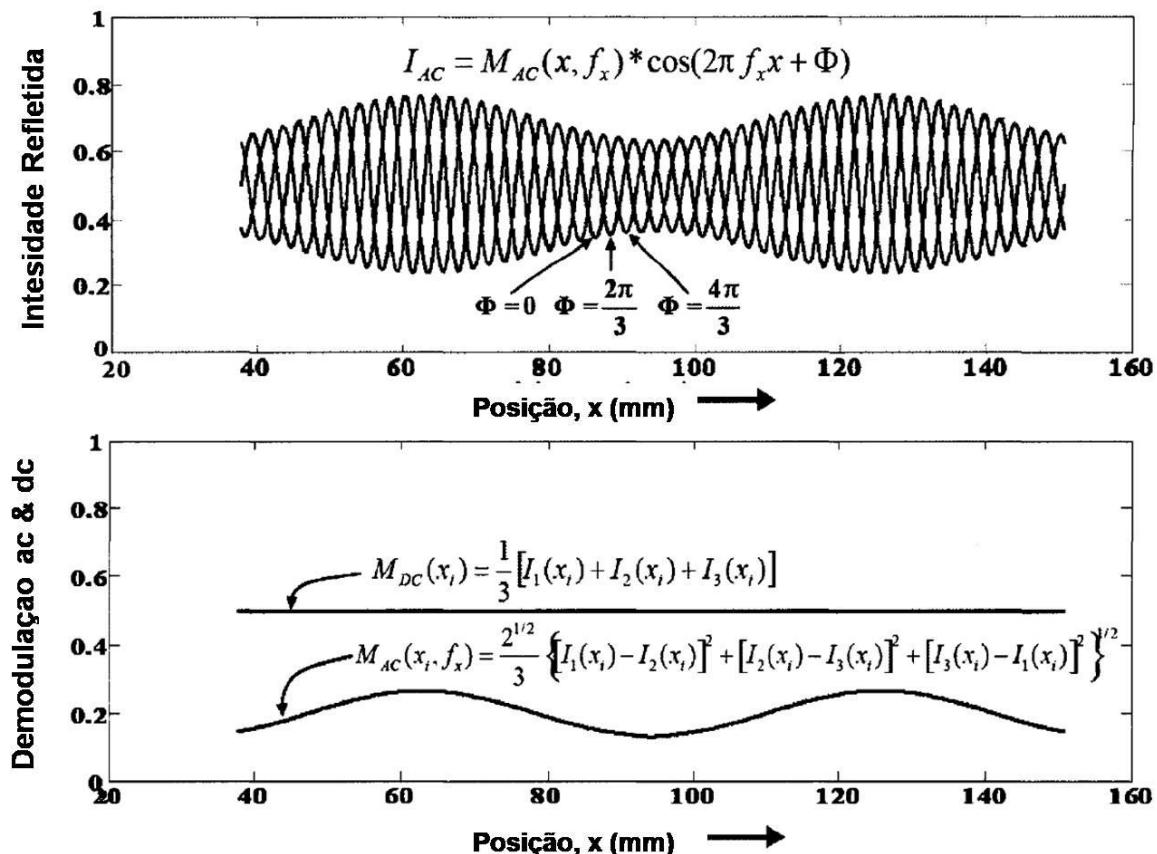


Figura 37: Esquema da refletância modulada (a) e (b), equivalente às amplitudes demoduladas das componentes AC e DC (Adaptado de CUCCIA et al., 2009).

Quando um estudo no domínio da frequência é realizado, o componente M_{AC} pode ser expresso também em termos da intensidade da fonte (I_0), da MTF do sistema óptico e da refletância difusa proveniente do meio turvo (R_d). Sendo assim, a relação entre estas variáveis pode ser escrita como:

$$M_{AC}(x, f_x) = I_0 \cdot MTF(x, f_x) \cdot R_d(x, f_x) \quad (47)$$

Paralelamente, pode-se calibrar tanto a intensidade da fonte (I_0) quanto a da MTF do sistema óptico promovendo uma medida de referência $M_{AC,ref}(x, f_x)$ em fantoma com

propriedades ópticas já anteriormente conhecidas. Assim, utilizando-se desses resultados para desenvolver uma possível previsão para a refletância difusa do fantoma, pode-se obter a seguinte forma:

$$R_d(x, f_x) = \frac{M_{AC}(x, f_x)}{M_{AC,ref}(x, f_x)} \cdot R_{d,ref}(f_x) \quad (48)$$

sendo que, na equação (48), a variável $M_{AC,ref}$ corresponde à amplitude da intensidade modulada de refletância de referência e $R_{d,ref}$ é a refletância difusa de referência (CUCCIA et al., 2009).

3.7 Determinação dos parâmetros ópticos

Segundo CUCCIA et al. (2009), os parâmetros ópticos (μ_a e μ_s') da amostra podem ser obtidos a partir da refletância difusa $R_d(x, f_x)$, desde que haja uma medida de referência já conhecida, tal como foi exposto pela equação (48). Ainda, de acordo com os trabalhos desses autores, duas frequências espaciais são suficientes para quantificar e separar o coeficiente de absorção e espalhamento.

Na equação (48), tanto o $M_{AC}(x, f_x)$ quanto o $M_{AC,ref}(x, f_x)$ podem ser alcançados por medidas experimentais. No entanto, a $R_{d,ref}$ (refletância difusa de referência) é um parâmetro desconhecido. Para encontrar esta variável, CUCCIA et al. (2009) sugere utilizar dois métodos: o de aproximação pela equação da difusão ou o de Monte Carlo.

Ambos os caminhos poderão medir com precisão o valor de $R_{d,ref}$ em cada frequência. Apesar disso, o método de Monte Carlo utiliza um extensivo trabalho computacional, o que clinicamente tornaria inviável um trabalho prático. Logo, esse problema pode ser contornado pelo uso de uma tabela de referência *look up table*, apresentada na figura 38.

A *look up table* é resultado das medidas de refletância difusa modulada $R_d(AC)$ para $f_x \neq 0$ e da refletância difusa não modulada $R_d(DC)$ quando $f_x = 0$. As linhas em cinza e preto correspondem respectivamente aos coeficientes de absorção (μ_a) e de espalhamento reduzido (μ_s'), de maneira que a correlação perpendicular entre estas variáveis demonstram a

habilidade de separação. Assim, tanto as medidas das componentes AC e DC podem ser obtidas com três fases de projeção em uma única frequência (CUCCIA et al., 2009).

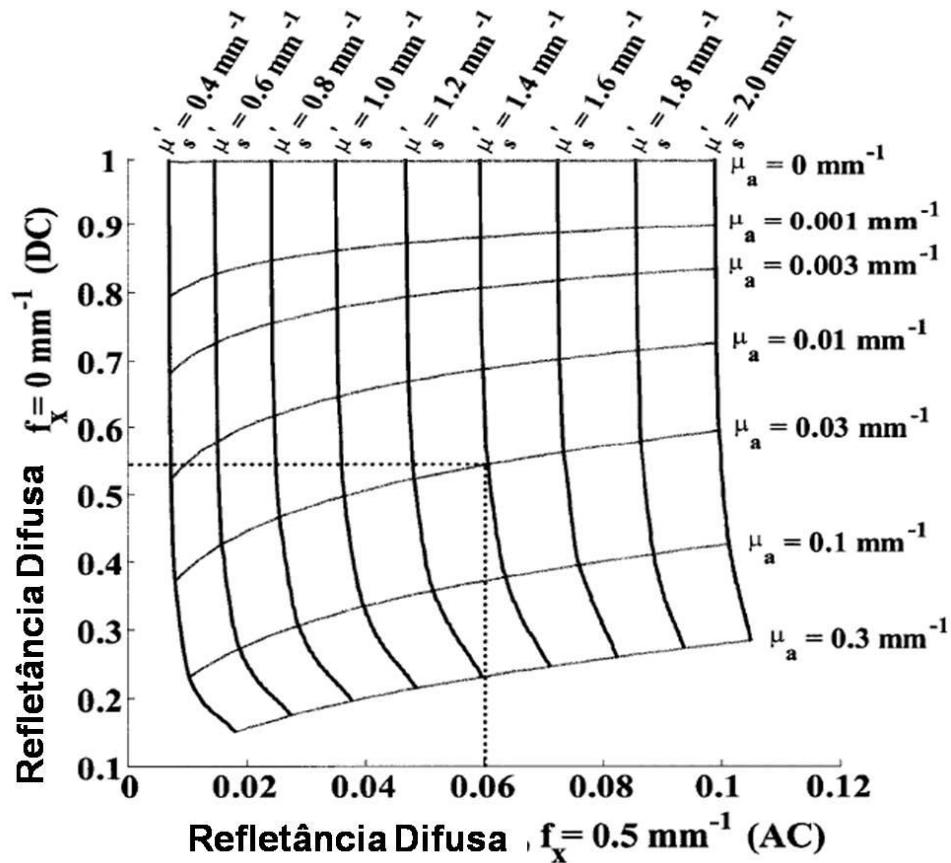


Figura 38: *Look up table* de dois componentes da refletância R_d (AC) e R_d (DC) gerada por meio do modelo de difusão utilizado como exemplo. Nota-se que, para R_{AC} ($f_x = 0.05$) = 0.06 e R_{DC} ($f_x = 0.05$) = 0.55, obtemos, então, $\mu_a \approx 0.03$ e $\mu'_s \approx 1.4$ (Adaptado de CUCCIA et al., 2009).

4. METODOLOGIA

4.1 Instrumentação do SFDI

A técnica SFDI consiste no emprego de múltiplas frequências espaciais de iluminação para obter mapas bidimensionais contendo informações sobre as propriedades ópticas de tecidos biológicos, especificamente os coeficientes de absorção e espalhamento reduzido e também a concentração de cromóforos (MAZHAR et al., 2012).

Neste trabalho, foram desenvolvidos dois protótipos de equipamentos SFDI; um com objetivo de ser utilizado na prática da clínica médica e outro para uso no meio acadêmico em pesquisas, apesar de que ambos possuem aparatos instrumentais diferentes e realizam a mesma função.

Na construção dos aparelhos, as instrumentações utilizadas em comum foram: os projetores de luz, câmeras CCD, filtros ópticos, computadores e os softwares Matlab e LabVIEW. Um diagrama esquemático da montagem e da instrumentação do SFDI que orientou a montagem dos equipamentos pode ser visto na figura 39:

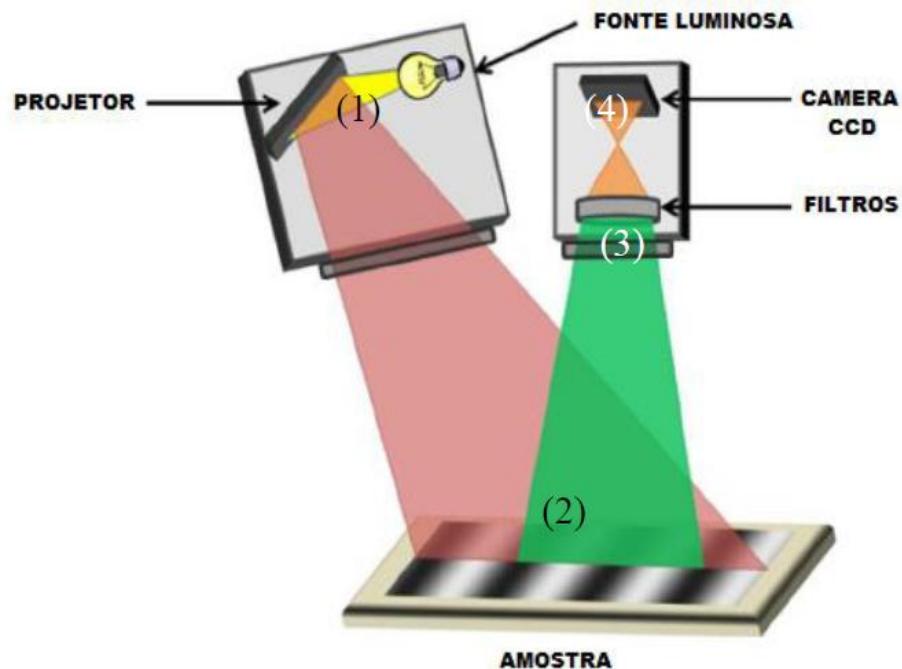


Figura 39: Representação esquemática do equipamento da técnica de SFDI. Em (1) está representado o projetor; em (2) a amostra; em (3) a roda de filtros; e em (4) a câmera de captura das imagens (Adaptado de NADEAU et al., 2013).

A fim de desenvolver os equipamentos, primeiramente foi empregado um projetor que incide luz com intensidade modulada espacialmente em padrões senoidais utilizando uma apresentação automatizada em Microsoft Power Point. Dessa forma, isso foi feito de modo que o projetor se tornasse ativo 5 minutos antes das medidas para que a fonte consiga ficar estável após este período.

O segundo passo refere-se ao uso de uma câmera, cuja função é capturar o sinal da refletância difusa proveniente da amostra. Contudo, antes que a informação alcançasse o dispositivo óptico de captura, a luz da reflexão difusa passaria por um disco de filtros contendo comprimentos de onda (λ) selecionados para, posteriormente, ser recolhida pela câmera.

A área de iluminação do projetor é de 90 mm x 70 mm, enquanto que a área capturada pela câmera é de 65 mm x 65 mm, gerando imagens de 1024 x 1024 pixels de tamanho. Um ponto importante e que prejudica a qualidade da imagem é a reflexão especular da amostra, que é evitada com o uso de polarizadores. Porém, outro artifício utilizado para contornar o problema foi mudar a angulação da câmera em relação ao projetor ($\approx 30^0$ em relação ao ângulo de incidência).

Todo o equipamento foi automatizado pelo programa LabView (*National Instruments*, Austin, TX, EUA), que compõe rotinas para a administração individual de cada componente. Sendo assim, essas rotinas incluem desde produzir uma incidência de luz modulada, selecionar o filtro desejado e, inclusive, acionar a captura da reflexão difusa.

Após o passo anterior, as imagens são analisadas em Matlab (*Mathworks*, Natick, M.A., U.S.A.), ou seja, serão demoduladas, e tanto a absorção quanto o espalhamento reduzido são estimados por meio de uma *look up table*, uma aproximação pela equação da difusão ou pelo método de Monte Carlo.

4.1.1 Primeiro equipamento desenvolvido

Para a montagem do primeiro equipamento, a unidade de projeção foi composta por uma fonte de luz halógena, ou seja, por meio de um projetor Vivitek cujas características físicas são HDMI, 3D, 3.000 ANSI Lumens e Bivolt.

Para a seleção do comprimento de onda, foi utilizada uma roda de filtros em uma seleção de seis filtros de interferência passa-banda revestidos para transmissão cujos picos são: 530, 650, 680, 750, 780 e 810 nm, respectivamente. Conectado à roda, acoplou-se um

motor de passo que pode ser acionado por comandos do programa Labview. Sendo assim, todo o aparato descrito pode ser visualizado na figura 40.

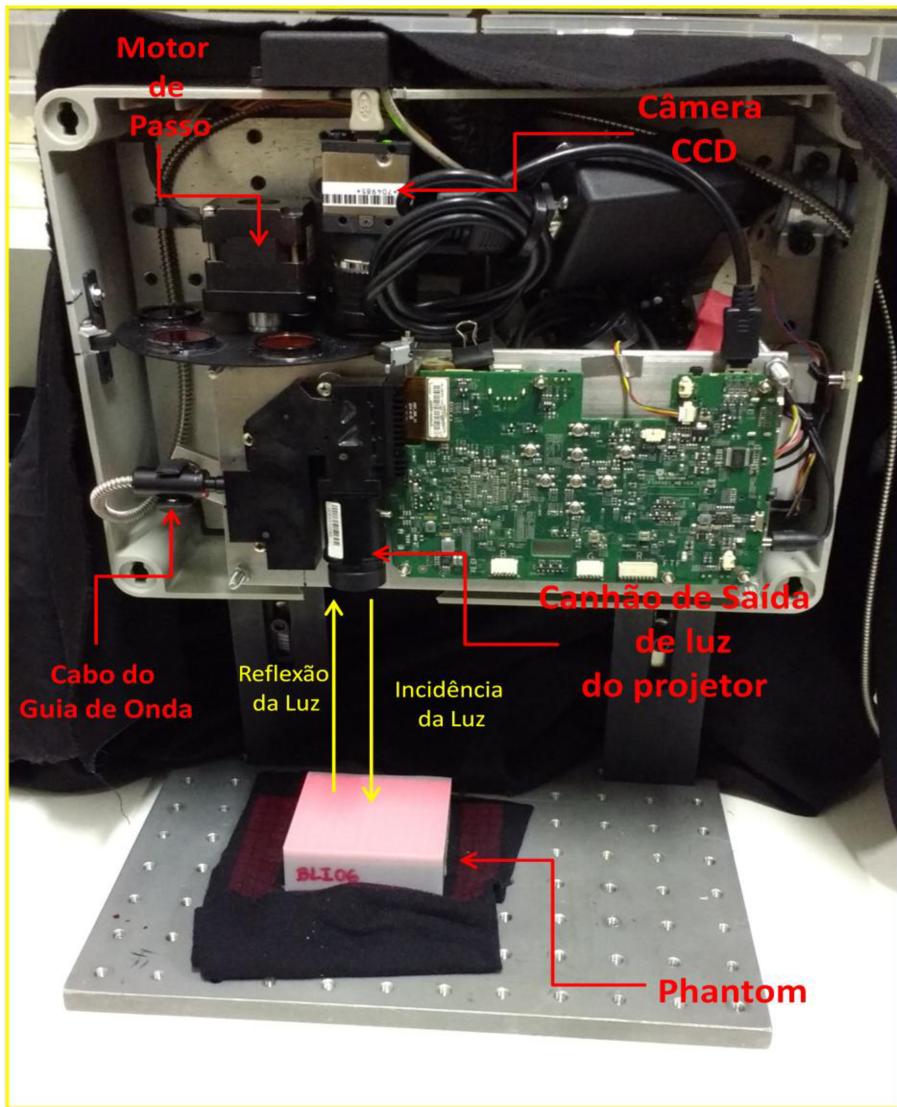


Figura 40: A caixa contendo todos os componentes ópticos e eletrônicos foi propositalmente fixada a um trilho na direção vertical, pois havia em mente aplicações clínicas para o SFDI.

Além do mecanismo de projeção da luz, o sistema SFDI possui o sistema de captura (demonstrado nas figuras 41 e 42) que, por sua vez, é composto por uma câmera CCD (*THORLABS USB 2.0 Digital Camera*) e recebe a mesma projeção de imagem. Inicialmente, havia o problema do efeito de reflexão especular, que, muitas vezes, restringia a qualidade das imagens. Porém, isso foi solucionado iluminando a amostra em um ângulo pequeno em relação a incidência normal.



Figura 41: Vista da face do aparelho SFDI com abertura para projeção de luz. Um pouco acima há a roda de filtros isolada dentro de um sistema automatizado da Thorlabs.

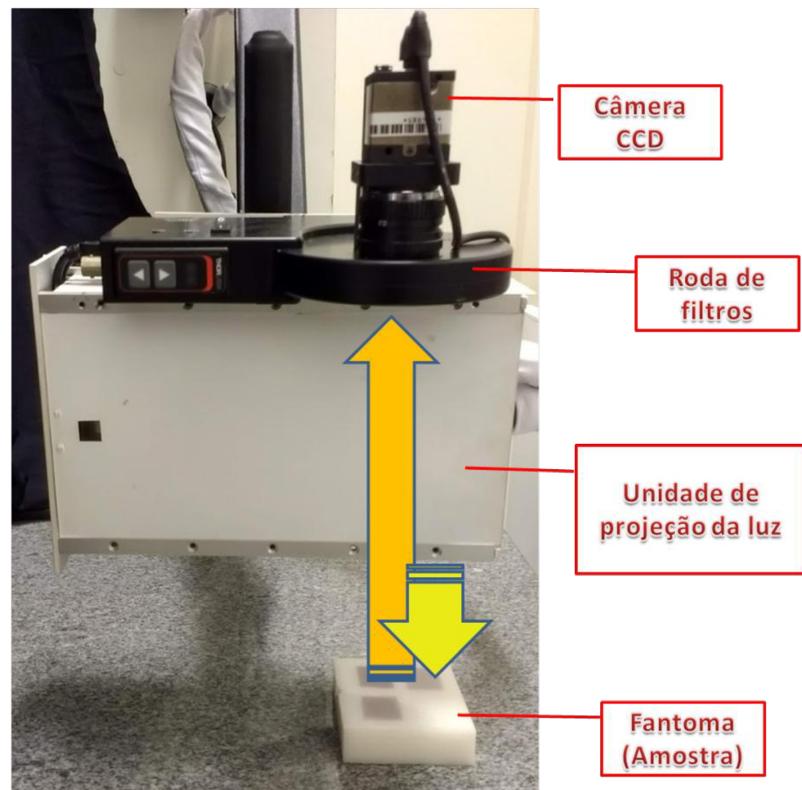


Figura 42: Visão superior da parte principal do equipamento SFDI, onde contém a câmera, o projetor de luz e a roda de filtros. As setas em amarelo representam a incidência de luz enquanto que a cor laranja consiste na reflexão da amostra.

A montagem da técnica de SDFI dentro de um espaço confinado se justifica no fato de que é necessário miniaturizar o equipamento como um todo a fim de poder transladá-lo acoplado a uma mesa para a realização de medidas em qualquer ambiente, tais como clínicas e hospitais. Este passo foi dado desenvolvendo uma mesa própria contendo o suporte para fixação do aparelho, monitor, teclado e mouse, além da montagem dos componentes de informática (HD, motherboard, fonte ATX, entre outros) na parte interna desta mesa, que pode ser visualizada junto com sua aplicação clínica nas figuras 43 e 44:

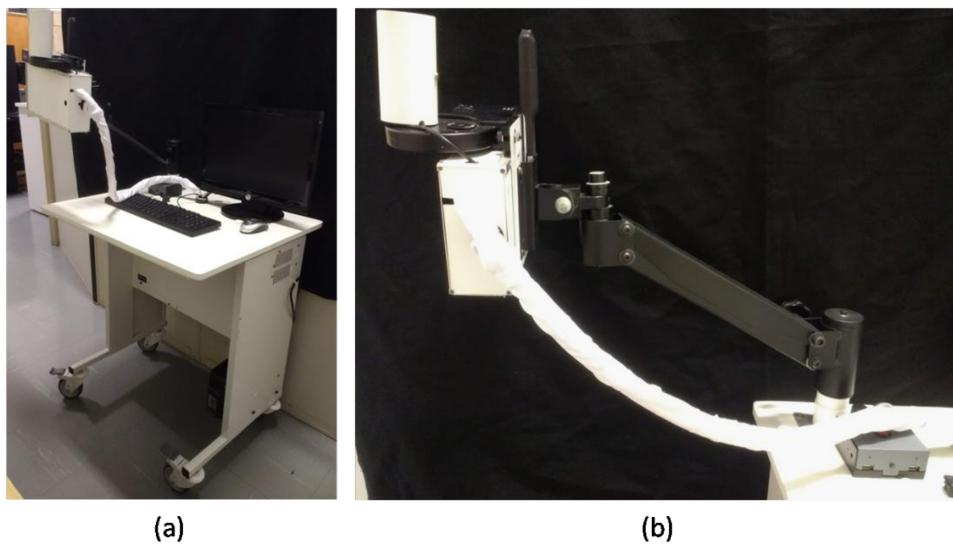


Figura 43: (a) Equipamento completo do SDFI contendo o braço com os instrumentos para aquisição de imagens, acoplado ao carrinho onde as imagens são analisadas e processadas em (b), que é o braço móvel contendo o sistema de projeção e captura de imagens.



Figura 44: Captação de imagens da face esquerda de uma pessoa utilizando o aparelho.

4.1.2 Segundo equipamento desenvolvido

Para a montagem do segundo equipamento, alguns de seus instrumentos foram substituídos em comparação ao primeiro que foi criado anteriormente e a unidade de projeção permaneceu a mesma, sendo composta pelo projetor Vivitek, cujas características físicas já foram citadas previamente. Toda a nova montagem do equipamento pode ser vista na figura 45 (a) a seguir.

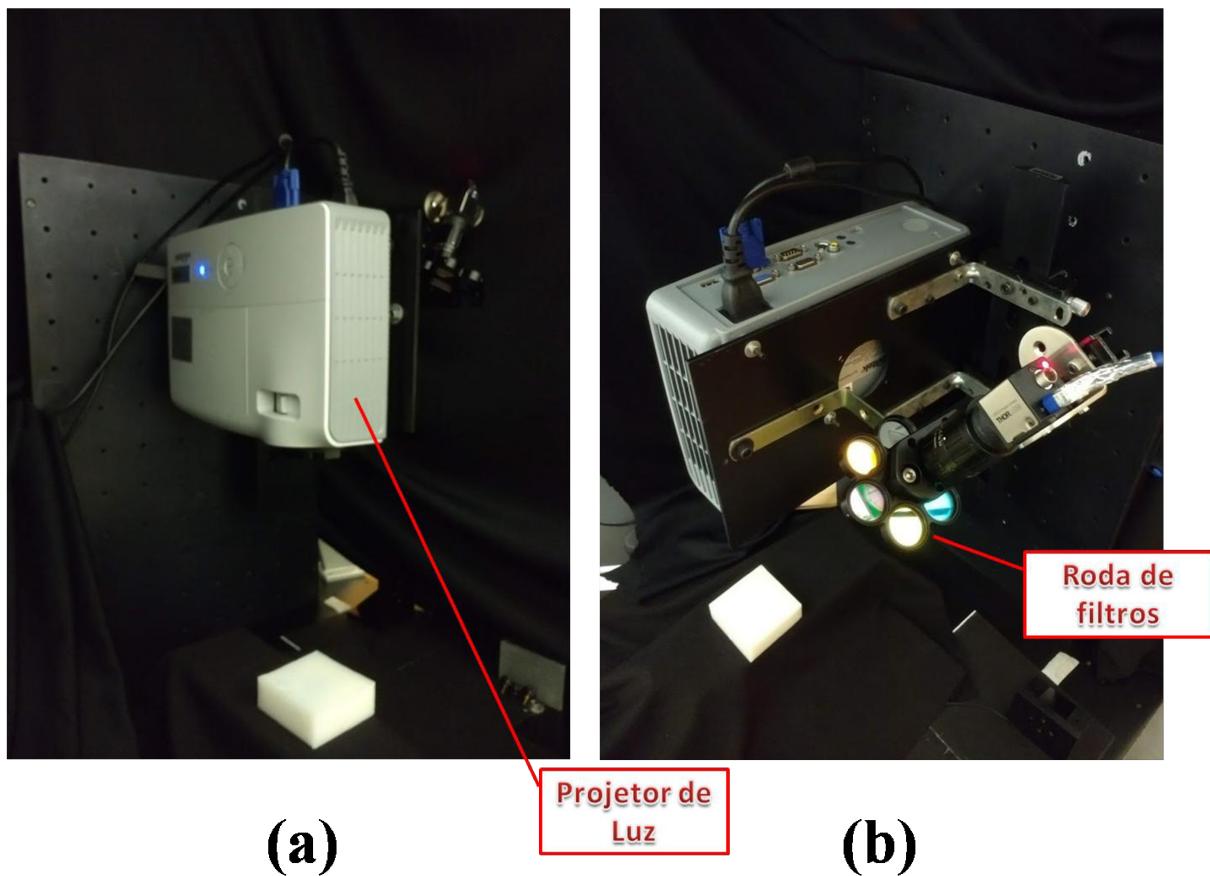


Figura 45: (a) Visão frontal do equipamento; (b) Visão da parte de trás e superior do equipamento de forma que é possível identificar a roda de filtros e a câmera CCD de maneira mais nítida que a anterior.

Para a seleção do comprimento de onda, foi utilizada uma roda de filtros, porém passando uma por nova seleção. Sendo assim, seis filtros de interferência passa-banda revestidos para transmissão foram escolhidos, cujos picos são: 457, 488, 532, 580 e 650 nm, respectivamente. Além disso, um motor de passo foi conectado à roda, o qual pode ser acionado por comandos do programa Labview. Assim, essa montagem pode ser vista na figura 45(b) anteriormente mostrada.

Além do aparato de projeção da luz, o sistema de captura foi novamente composto por uma câmera CCD (*THORLABS USB 2.0 Digital Camera*), que recebe a mesma projeção de imagem. O problema da reflexão especular mais uma vez afetou a utilização e qualidade das imagens; porém, isso foi corrigido iluminando a amostra em um ângulo pequeno em relação à incidência normal.

A segunda montagem do equipamento SDFI foi realizada com o propósito de fixá-lo em uma mesa óptica sem sofrer translado para que houvesse a possibilidade de realizar medidas caso o outro equipamento não estivesse presente ou em manutenção, mostrado na figura 46. A diferença com o maquinário anterior reside no fato de que este foi acoplado ao carrinho do equipamento, enquanto que o segundo utilizou um computador pessoal que era exposto sobre a mesa, era ligado à saída de dados e controlava os comandos em LabView. A montagem da parte física do SDFI pode ser vista na figuras a seguir.

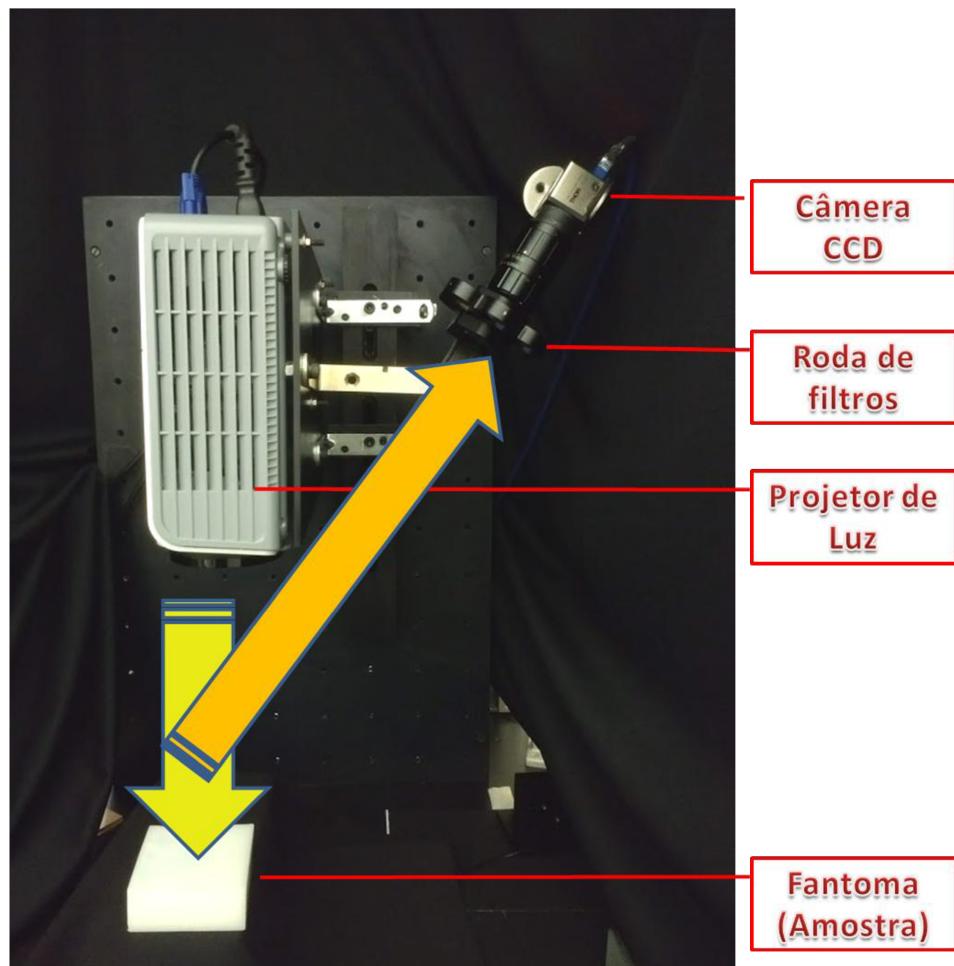


Figura 46: Segundo protótipo desenvolvido para tornar-se fixo para a pesquisa. A seta na cor amarela representa a incidência da luz no fantoma, enquanto que a seta na cor laranja equivale à reflexão.

4.2 Fabricação dos fantomas

Os materiais que simulam ou tentam recriar as propriedades ópticas, acústicas e térmicas de tecidos biológicos podem ser classificados com *phantoms* (ou fantomas). Estes materiais foram desenvolvidos com propósito de compreender a interação da luz com os tecidos, auxiliando na pesquisa e aplicação em fototerapia e fotodiagnóstico. Além destas funções, eles desempenham características importantes na calibração de instrumentos de pesquisa e hospitalares.

A composição química de um fantoma pode ser assumida como uma matriz de água, hidrogel, polímeros e materiais espalhadores e absorvedores. Entre os espalhadores mais utilizados estão as emulsões lipídicas (intralipídios e leite), pós inorgânicos (alumínio, ouro, dióxido de titânio) e microesferas de polímeros (poliestireno). No caso dos materiais absorvedores, estes podem variar entre sangue, células, corantes moleculares e tintas (POGUE; PATTERSON, 2006).

Os fantomas utilizados neste trabalho foram produzidos em laboratório de modo que diferentes parâmetros ópticos puderam ser obtidos devido à introdução de corantes, nanopartículas disponíveis e outras substâncias voltadas para algum tipo de aplicação biológica. Sendo assim, houve a tentativa de manter um padrão sobre as medidas anatômicas de cada fantoma (7,31 cm x 2,44 cm x 7,42 cm), conforme pode ser visto na figura 47:

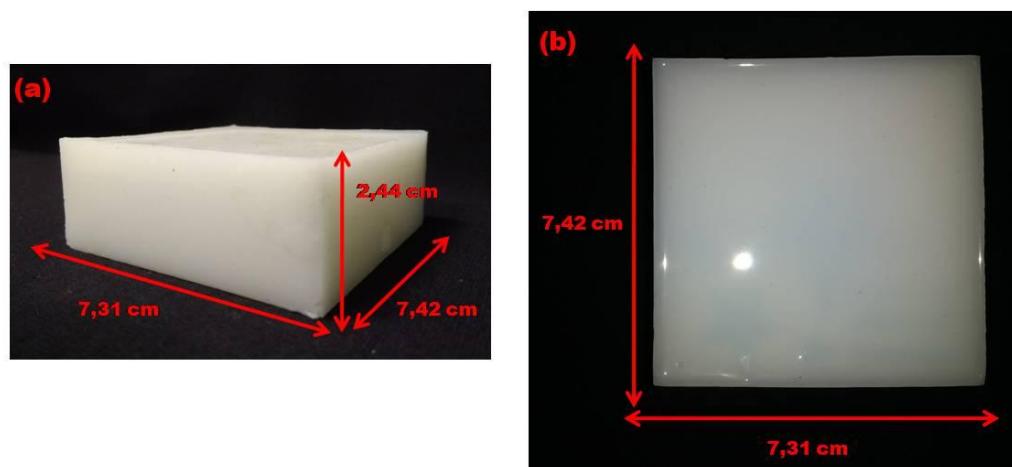


Figura 47: Medidas padrões dos fantomas fabricados em laboratório.

Para a fabricação dos fantomas utilizados neste trabalho, foi selecionado o silicone (PDMS – Polidimetilsiloxano). A preferência por este material justifica-se pelo fato deste ser

durável, possuir uma natureza estável, ser maleável e ser acessível para transporte em aplicações clínicas de interesse. Outro ponto é que o fantoma de PDMS vulcanizado possui o índice de refração correspondente a $n = 1,4$ (valor adimensional), que é similar ao de tecidos biológicos.

Para a obtenção do fantoma de silicone vulcanizado, foram combinados 150 mL de PDMS mais a quantidade de 15 mL do agente endurecedor. A mistura foi adicionada a um recipiente de vidro cujas dimensões eram de 7,32 cm x 2,45 cm x 7,43 cm em formato de paralelepípedo, o que deu origem à forma dos fantomas confeccionados.

Posteriormente, a mistura foi deixada em descanso no recipiente por 20 minutos; contudo, a combinação gerou bolhas, sendo que foi necessário introduzi-la em uma máquina de vácuo por um tempo estimado de 25 minutos para que grande parte das imperfeições no fantoma fosse eliminada. Na última fase do processo, o recipiente com a mistura foi deixada em descanso em um período de 10 a 24 horas.

Na tentativa de simular parâmetros ópticos como o da absorção, foram utilizadas para esta ação substâncias, como o corante zinco ftalocianina (ZnPc) e a tinta Nanquim (Ink), enquanto que na situação em que o espalhamento era foco de interesse da pesquisa, foram utilizados o dióxido de titânio (TiO_2) e as nanopartículas de ouro (Au).

A figura 48 mostra parte dos fantomas fabricados durante a pesquisa, sendo classificados como STAR, PC10, NOV10, PC01 e NOV9, respectivamente e a seguir a tabela 1 relacionando as substâncias utilizadas na confecção.

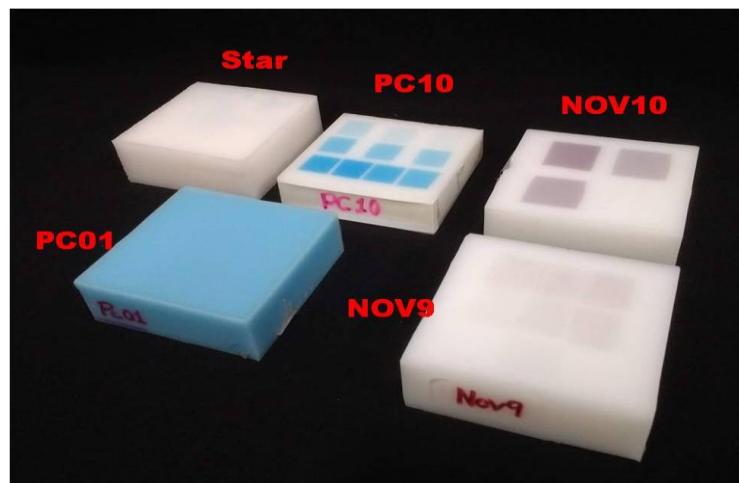


Figura 48: Os fantomas expostos na imagem contêm diferentes características, sendo que as propriedades de absorção, espalhamento e profundidade foram variadas propositalmente, cuja intenção era a de simular as propriedades de um tecido biológico.

Tabela 1: Substâncias usadas para fabricação dos principais fantomas.

	STAR	PC01	PC10	NOV9	NOV10
ZnPc	Utilizado	Utilizado	Utilizado	—	—
Au	—	—	—	Utilizado	Utilizado
TiO₂	Utilizado	Utilizado	Utilizado	Utilizado	Utilizado
InK	—	—	—	—	—
PDMS	Utilizado	Utilizado	Utilizado	Utilizado	Utilizado
Ativador	Utilizado	Utilizado	Utilizado	Utilizado	Utilizado

Assim, as quantidades eram predeterminadas e adicionadas à mistura de silicone. Outra situação era a de confecção de finas camadas ($\approx 1\text{ mm}$), com variação da concentração do material absorvedor ou espalhador e depois de serem implantadas na superfície do hospedeiro PDMS. Na figura 49 é possível observar dois fantomas que foram a base de estudo deste trabalho: um denominado PC10 e que possui finas camadas do corante zinco ftalocianina (ZnPc) e o outro classificado como NOV10, o qual contém finas camadas contendo nanopartículas de ouro (Au).

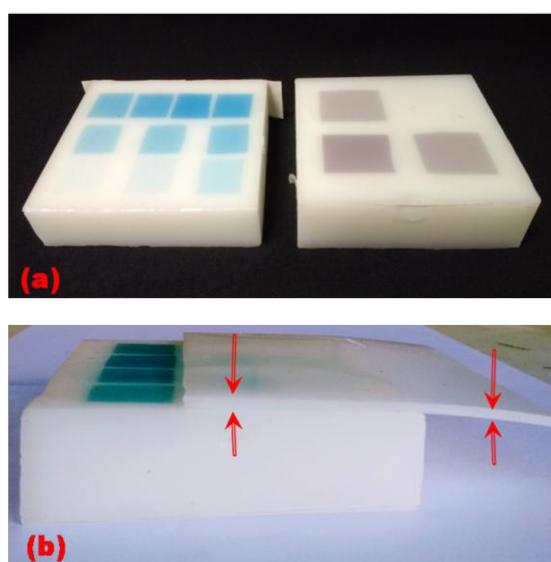


Figura 49: (a) Fantomas PC10 (à esquerda) e NOV10 (à direita). Em (b) é possível visualizar a fina camada que recobre os fantomas anteriores de modo a simular as camadas da pele.

Além de estimar os parâmetros ópticos por meio da técnica SFDI, também foi analisada a capacidade do equipamento na obtenção de imagens com boa resolução quando um material absorvedor encontrava-se em diferentes profundidades no fantoma. Assim, foi confeccionado o fantoma STAR (ver figura 50), cujos objetos em formato de estrela e barras retangulares foram feitas utilizando ZnPc e adicionadas de modo inclinado no interior do fantoma, o que pode ser visto abaixo:

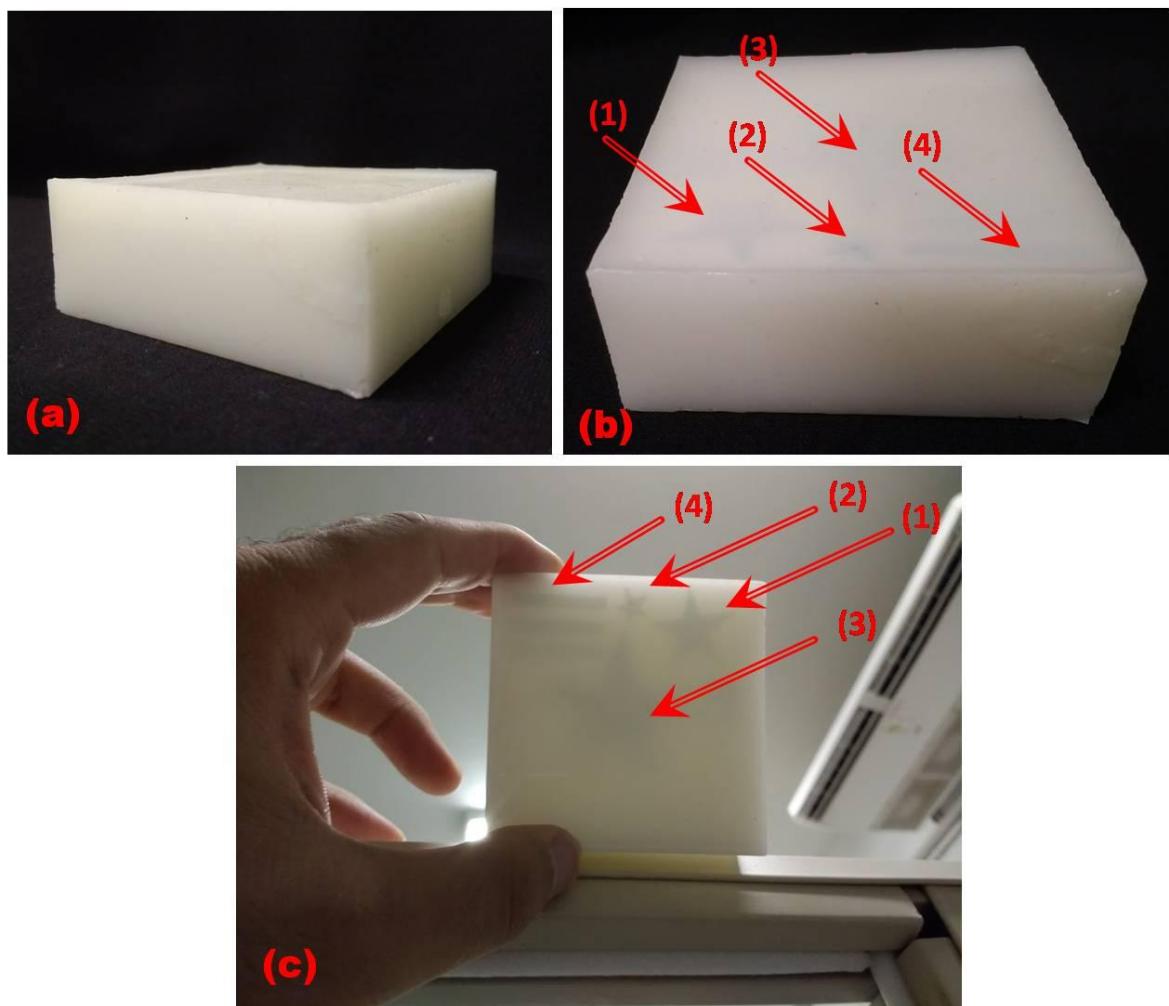


Figura 50: Visualização do fantoma STAR: a) visão em perspectiva do fantoma; (b) vista da superfície superior; e (c) momento em que o fantoma é posicionado contra a luz. Os números 1, 2, 3 e 4 indicam a localização de diferentes objetos no fantoma.

Além dos mimetizadores, que consistem em materiais que simulam propriedades ópticas (na pesquisa foram mencionados os fantomas), também foram confeccionados outros em um segundo lote, utilizando os mesmos princípios de fabricação que foram mencionados

anteriormente. Contudo, a proposta deste novo lote era obter fantomas homogêneos para servirem como referência nas medidas utilizando o SFDI, uma vez que é necessário conhecer os parâmetros ópticos (μ_a e μ_s) de um material conhecido para estimar as propriedades ópticas de um material inexplorado. Desta forma, foram desenvolvidos os fantomas que foram classificados como BLI02, BLI03, BLI05 e BLI06. Estes fantomas podem ser observados na figura 51 e as quantidades utilizadas para a confecção desses materiais estão disponíveis na tabela 2.



Figura 51: Fantomas utilizados como referência nas medidas do SFDI, de forma que suas propriedades ópticas são conhecidas e utilizadas para determinar os parâmetros ópticos de tecidos biológicos e fantomas.

Tabela 2: Quantidades utilizadas para a fabricação dos fantomas de referência.

	BIL02	BIL03	BIL05	BIL06
TiO₂	0,2062 g	0,2085 g	0,2074 g	0,2075 g
InK	0,0 g	0,53 g	0,83 g	0,078 g
PDMS	150 mL	150 mL	150 mL	150 mL
Ativador	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL

5. TÉCNICAS COMPLEMENTARES ÀS MEDIDAS DO SFDI

5.1 A Esfera Integradora (IS)

A compreensão de como a luz se propaga no tecido biológico ou no fantoma permite estimar os seus principais parâmetros ópticos, tais como o coeficiente de absorção (μ_a), o coeficiente de espalhamento (μ_s) e o fator de anisotropia (g), visto que estas variáveis representam importantes funções para essa caracterização. Assim, uma das possibilidades de medidas experimentais para a obtenção das propriedades ópticas dos materiais anteriormente mencionados é por meio da coleta da reflexão difusa com a utilização de uma esfera integradora (IS) (MONTE et al., 2018).

A esfera integradora (IS) consiste em um compartimento esférico oco, cuja parte interna é revestida com material não fluorescente (BaSO_4 ou MgO). A técnica utilizada por este dispositivo possui a habilidade de medir a refletância difusa total (R_d), bem como a transmitância difusa total (T_d) e faz uso de um modelo matemático para mensurar propriedades ópticas (TUCHIN, 2016).

Neste trabalho, foi utilizado uma esfera integradora com diâmetro de 2" e contendo quatro portas, cuja fabricante é a empresa Thorlabs, de forma que ela pode ser vista na figura 52:



Figura 52: Esfera de integração sem detector, cujas dimensões são de 61 x 61 x 65 mm e seu diâmetro é de 2" (HEAD, 2010).

Experimentalmente, duas entradas da esfera integradora (ver figura 53) foram utilizadas para posicionamento das amostras deste trabalho. Sendo assim, uma porta A foi

usada para medir a transmitância, enquanto que uma porta B, inserida na direção oposta, foi usada para realizar medidas de reflexão, feitas posteriormente.

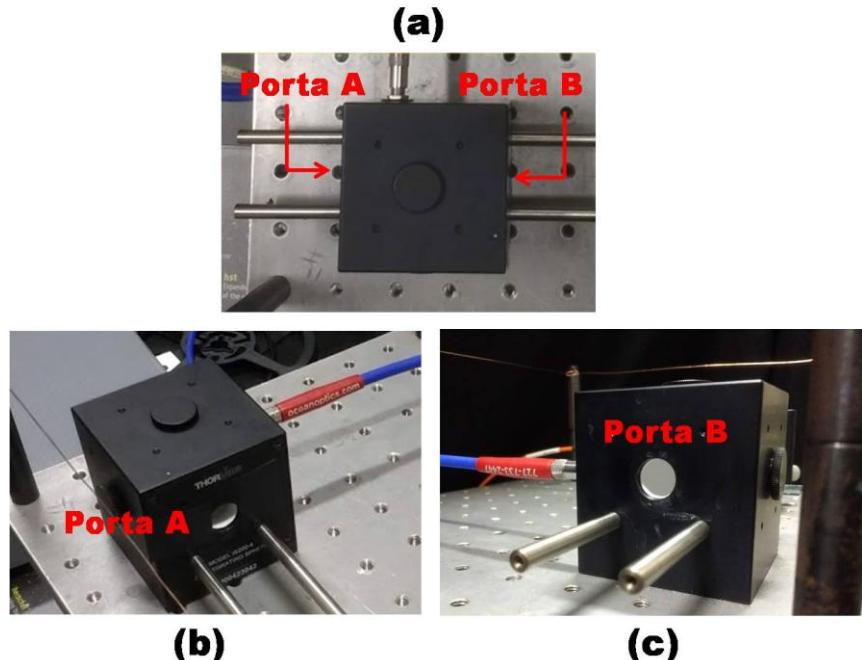


Figura 53: (a) Vista superior da esfera integradora com indicação das portas A e B utilizadas para posicionar as amostras; (b) Visão da porta A utilizada para medidas de transmitância; e (c) Visão da porta B usada para medidas de refletância.

Sendo assim, as amostras foram irradiadas por uma fonte de luz de Tungstênio-Halogênio operada na tensão de 12 volts, cuja fabricante é a empresa Thorlabs. Em relação ao espectro da lâmpada, esta varia entre 300 nm a 2600 nm, o que o torna ideal para aplicações na região do VIS-NIR, algo de interesse para o trabalho. A luz, então, é conduzida por um cabo de fibra óptica de $400 \mu\text{m}$ de diâmetro e direcionada para um espelho ajustável fixado à mesa óptica, fazendo com que esta atinja a superfície da amostra.

O sinal de saída proveniente da esfera integradora é capturado por meio de uma fibra óptica de $600 \mu\text{m}$ de diâmetro e é conduzido ao espectrômetro *Ocean Optics HR400* (200-1100 nm) de alta resolução, sendo que, posteriormente, os dados obtidos foram processados usando o software MATLAB. O esquema da montagem experimental pode ser visualizado na figura 54 a seguir:

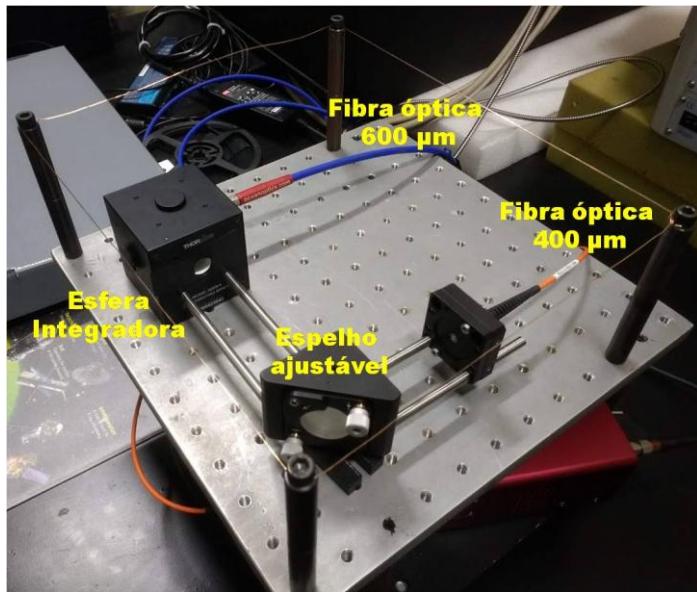


Figura 54: Vista do aparato experimental, incluindo a mesa óptica e demais instrumentos necessários para a realização das medidas de transmitância e reflexão na esfera integradora.

Neste trabalho houve a utilização do método *Inverse adding-doubling* (IAD) (PRAHL; VAN GEMERT; WELCH, 1993a) juntamente com a esfera integradora; este método consiste em um software implementado e disponibilizado por PRAHL (2018). Este algoritmo permite prospectar os parâmetros ópticos μ_a e μ_s a partir das medidas de transmitância (T) e reflexão (R) de amostras turbinas finas, como fantomas e tecidos biológicos.

A base do código IAD tenta estabelecer uma solução numérica para a equação de transferência radiativa (ETR) fundamentando-se em valores obtidos das medidas de reflexão e transmitância. O método empregado baseia-se na comparação entre uma fatia de material com espessura variável com outra fatia de espessura fina, cujas propriedades ópticas são conhecidas.

Ainda, de acordo com a ferramenta IAD, o termo *doubling* corresponde a duplicação sucessivas da solução para a fatia de espessura fina até alcançar a espessura da fatia desejada em estudo. Em relação ao termo *adding*, este se refere ao passo em que camadas com diferentes propriedades podem ser adicionadas ao caso anterior com objetivo de calcular a refletância e a transmitância. Por último, o termo *inverse* é atribuído ao fato de que os cálculos do programa são realizados em ordem contrária, iniciando-se com as propriedades ópticas do material para obter a refletância e transmitância (PRAHL; VAN GEMERT; WELCH, 1993).

Os parâmetros de entrada do software correspondem à refletância (R), à transmitância (T), ao fator de anisotropia (g) e ao índice de refração (n) do material, de forma que o programa, a partir destas informações, proporciona as variáveis ópticas de saída, estas que são o albedo (a) e a espessura óptica (τ). A partir destes dados de saída, é possível recuperar tanto o coeficiente de absorção (μ_a) quanto o coeficiente de espalhamento (μ_s) de uma fatia de amostra turbida.

A variável óptica denominada albedo (a) representa a razão entre o coeficiente de espalhamento e o coeficiente de transporte (μ_{tr}), sendo que este parâmetro foi discutido em tópicos anteriores. Assim, tem-se que:

$$a = \frac{\mu_s}{\mu_{tr}} = \frac{\mu_s}{\mu_a + \mu_s} \quad (49)$$

No caso da variável espessura óptica (τ), esta é o produto entre a espessura da amostra investigada (d) e a soma dos coeficientes de absorção (μ_a) e espalhamento (μ_s), de tal maneira que é representada como:

$$\tau = d \cdot (\mu_a + \mu_s) \quad (50)$$

Em posse das variáveis como o albedo (a) e da espessura óptica (τ), os coeficientes de absorção (μ_a) e espalhamento (μ_s) podem ser obtidos relacionando a equação (49) com a (50) da seguinte forma (PRAHL; VAN GEMERT; WELCH, 1993):

$$\mu_a = \frac{\tau \cdot (1 - a)}{d} \quad (51)$$

$$\mu_s = \frac{a \cdot \tau}{d} \quad (52)$$

6. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

6.1 Obtenção de imagens por meio da técnica SDFI

De um modo geral, o SDFI foi desenvolvido com o intuito de capturar a reflexão difusa da luz proveniente de uma amostra de tecido ou fantoma sem haver contato com a amostra no momento em que uma iluminação modulada periódica espacialmente é projetada nela.

Neste trabalho, a instrumentação do SDFI foi composta de filtros ópticos de interferência passa-banda da empresa Thorlabs revestidos para transmissão, cujos picos são de 500, 650, 680, 750, 780 e 810 nm e estão presentes na figura 55. A seleção dos filtros para a pesquisa contemplou a abrangência dos comprimentos de onda que estavam dentro da janela óptica terapêutica, região a qual se encontra em parte do visível (VIS) e do infravermelho próximo (NIR), além do fato de que a absorção da molécula de água é reduzida.

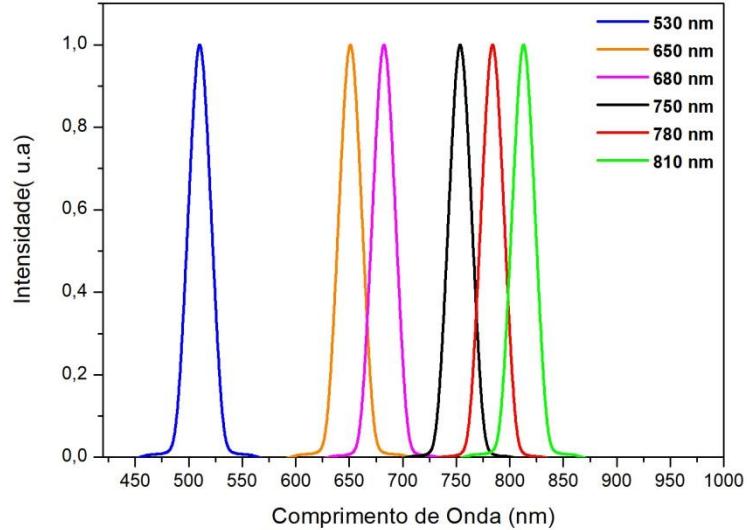


Figura 55: Filtros de interferência passa-banda utilizados durante a pesquisa.

Os filtros foram dispostos em uma roda com sistema automatizado; sendo assim, esta gira trocando os filtros de posição sempre que medidas são realizadas e a informação luminosa selecionada é posteriormente capturada por uma câmera CCD. Assim, tanto a instrumentação óptica e eletromecânica foram projetadas e adicionadas ao equipamento SDFI

no sentido de coletar dados do ambiente de análise externo e disponibilizar as informações ao usuário.

Tem-se, então, que a projeção dos padrões senoidais de luz a partir do projetor, o giro da roda de filtros e a gravação das imagens que chegam até a câmera CCD são controlados pelo programa denominado LabVIEW, este que é um software de instrumentação virtual desenvolvido pela *National Instruments* (NI).

O software LabVIEW possui subprogramas que possibilitam ao usuário desenvolver novos programas a partir de representações gráficas, estas que são ícones representativos de variadas funções que se ligam na forma de um diagrama de blocos e geram um fluxo de dados por meio dele. A rotina de comandos é realizada obedecendo à ordem do diagrama de blocos.

Basicamente, o software LabVIEW pode ser fracionado em três partes: *project explorer*, painel frontal e diagrama de blocos. A primeira corresponde à área onde o usuário dispõe do acesso às pastas para organização do projeto; a segunda corresponde à área que serão dispostos botões, leds, indicadores, entre outros, ou seja, é um ambiente que fornecerá ao usuário as informações sobre os instrumentos externos na forma gráfica. E, por último, na terceira parte, há controles e indicadores que serão interligados dependendo da programação que o usuário necessita para seu trabalho.

Sendo assim, o LabVIEW torna o processo de integração com o hardware muito mais simples utilizando uma abordagem de programação consistente, não importando qual hardware é utilizado (NATIONAL INSTRUMENTS, 2018).

Por ser uma forma mais didática de visualizar os resultados instantaneamente, este trabalho se limitará a mostrar apenas o painel frontal desenvolvido em LabVIEW para a pesquisa. Entre os recursos mais importantes do programa, estão a tela de captura da câmera CCD; os botões de aumento (*Master gain*); a redução da intensidade da luz na amostra (*Blacklevel Offset*); a opção para correção automática da luminosidade (*Auto Shutter*); os botões para seleções de frequências (*Freq*); e as opções de comprimentos de onda (*Wl*), que estão disponíveis na figura 56.

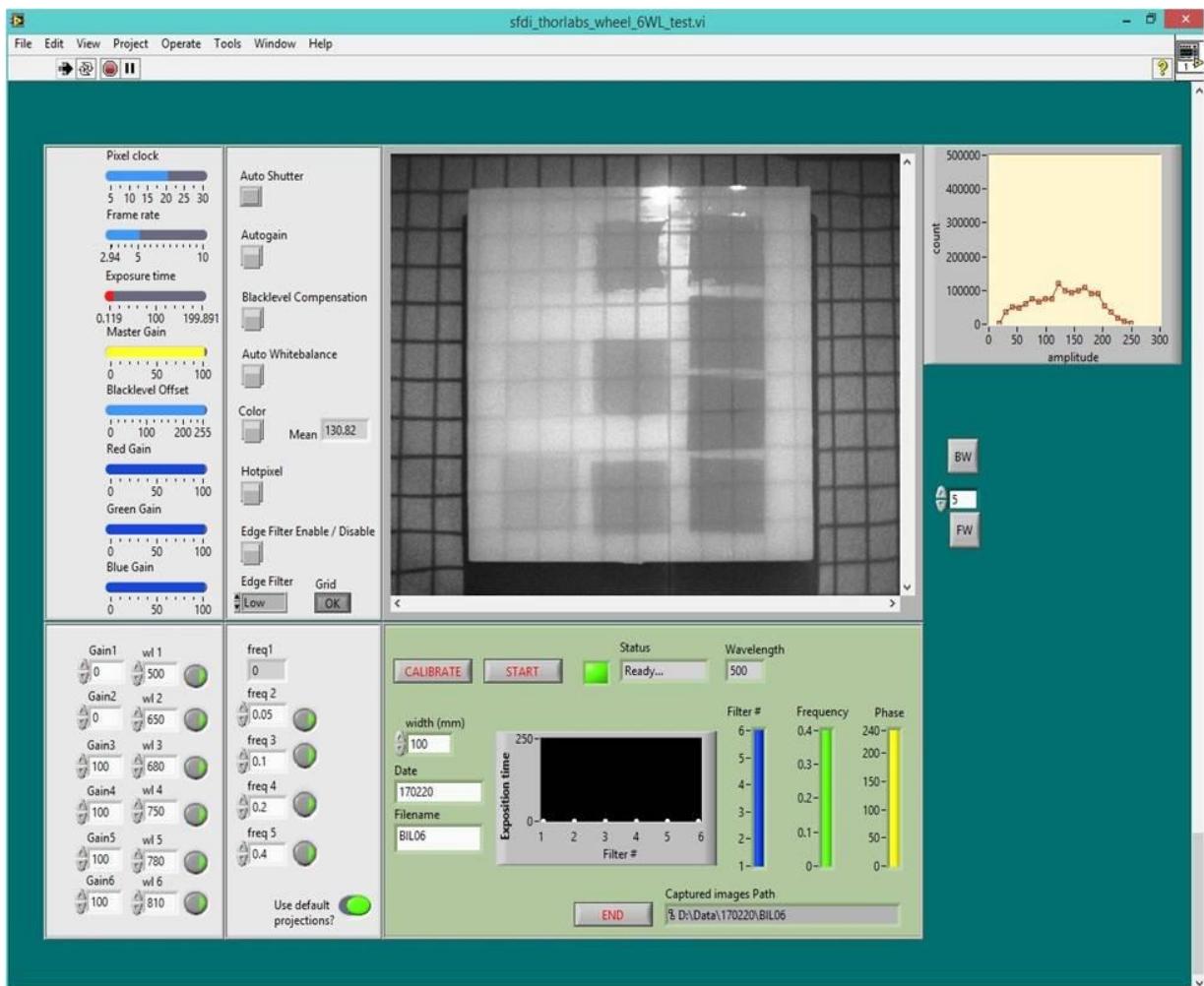


Figura 56: Imagem correspondente ao painel frontal da interface do LabVIEW desenvolvido para a técnica SFDI.

Para que houvesse interação entre a parte eletrônica e o programa, um *script* de informações pré-programadas interagiu com a câmera e gravou a projeção da técnica do *SFDI* apropriada. É importante ressaltar que foram utilizados seis comprimentos de onda e cinco frequências espaciais, sendo que a técnica necessita de, no mínimo, dois comprimentos de onda para obter uma imagem.

Após a projeção da modulação sinusoidal em frequências espaciais de $0 \text{ mm}^{-1} \leq f \leq 0,4 \text{ mm}^{-1}$, foram originadas cinco pastas de dados, em que cada uma corresponde às frequências espaciais 0, 50, 100, 200 e 400 nm^{-1} . Cada pasta possui um conteúdo correspondente a 18 imagens, as quais são divididas em seis comprimentos de onda (devido ao disco de filtros) e três fases (0^0 , 120^0 e 240^0). Assim, o programa obteve em uma única medida o total de 90 imagens provenientes da amostra em estudo. Não foi necessário utilizar

todos os parâmetros para a obtenção das imagens; contudo, neste trabalho houve interesse em explorar diversas condições.

Tal como foram mencionados anteriormente, os fantomas PC10 e NOV10 foram as principais amostras utilizadas neste trabalho; sendo assim, o primeiro contém camadas retangulares do corante Zinco Ftalocianina (ZnPc) em azul enquanto que o segundo possui camadas também no formato do anterior contendo nanopartículas de Ouro (Au) na cor marrom.

Há um terceiro fantoma classificado como STAR, o qual pode ser considerado um caso particular e não será explorado de maneira efetiva como os dois fantomas previamente apresentados, cujo interesse é mensurar a capacidade do equipamento em obter imagens com boa resolução quando um material estiver em diferentes profundidades no fantoma. Assim, foi desenvolvido este fantoma com objetos em formato de estrela e barras confeccionadas externamente utilizando ZnPc. Posteriormente, os objetos fabricados com corante ZnPc foram adicionados em posição diagonal no interior da matriz de PDMS.

As figuras a seguir foram dispostas apresentando o fantoma original sob diversas perspectivas e uma representação tridimensional dele, onde é possível visualizar como as camadas dos respectivos cromóforos estão fixadas no interior dos mimetizadores. Em seguida, foram disponibilizadas as imagens de refletância difusa submetidas à modulação espacial para uma única frequência espacial específica, a qual é obtida nos cinco comprimentos de onda trabalhados e na fase de modulação empregada. Sucessivamente, são mostradas as mesmas medidas; contudo, o comprimento de onda é fixo e varia-se a frequência espacial e fase para amostra.

6.1.1 Fantoma PC10

De um modo geral, o fantoma PC10 desenvolvido para este trabalho agrupa três componentes básicos: a matriz de polidimetilsiloxano (PDMS), o material absorvedor corante zinco ftalocianina (ZnPc) e o agente espalhador dióxido de titânio (TiO_2). Estas substâncias foram escolhidas no intuito de tentar reproduzir o mais fielmente possível as propriedades ópticas da pele, tópico que foi discutido anteriormente.

Para este fantoma, foram desenvolvidas camadas em formato retangular contendo o corante zinco ftalocianina (ZnPc) e o agente espalhador dióxido de titânio (TiO_2). A figura 57 exibe duas situações: na primeira, é apresentada a imagem original, na qual possui diversas

camadas de coloração azul ($ZnPc + TiO_2$) que estão internas a matriz de PDMS. A segunda situação representa a projeção 3D da figura original, que mostra a disposição interna de cada camada.

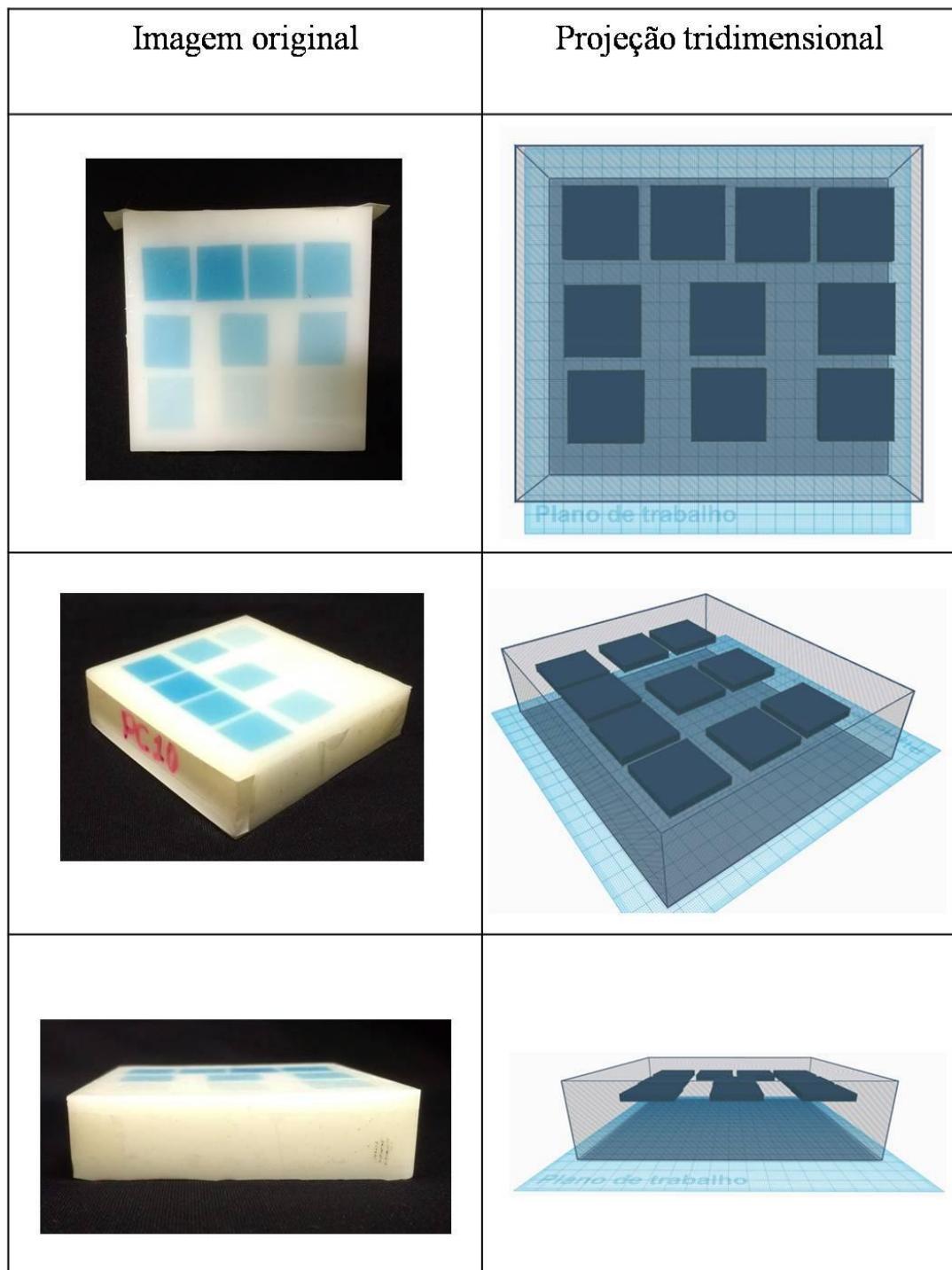
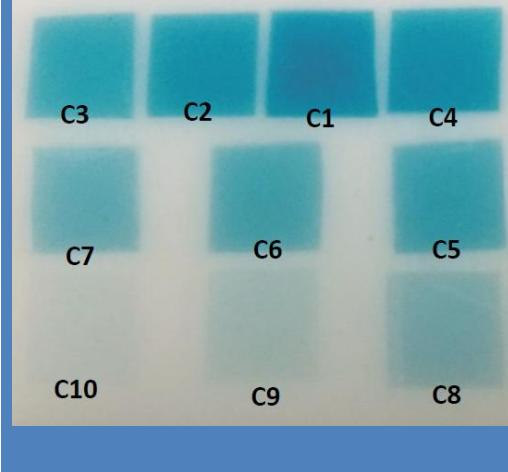


Figura 57: Imagem original e projeção tridimensional do fantoma PC10, que contém pequenas camadas com diferentes concentrações de zinco ftalocianina ($ZnPc$) depositadas sobre a matriz de PDMS.

Sendo assim, foram desenvolvidas 10 camadas com diferentes concentrações para o fantoma PC10. Estas foram classificadas como C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10. Para cada uma destas camadas, variou-se a quantidade de absorvedor (ZnPc) e buscou-se manter constante a quantidade de material espalhador (TiO_2). As quantidades utilizadas no desenvolvimento de cada camada podem ser observadas na tabela 3 abaixo:

Tabela 3: Quantidade utilizada para a confecção das camadas utilizadas na fabricação do fantoma PC10.



	ZnPc (mg)	TiO_2 (mg)
C1	55,0	2,5
C2	50,0	2,5
C3	45,0	2,5
C4	40,0	2,5
C5	35,0	2,5
C6	30,0	2,5
C7	25,0	2,5
C8	20,0	2,5
C9	15,0	2,5
C10	10,0	2,5

A obtenção das camadas anteriormente mencionadas é realizada por meio da mistura das quantidades de agente absorvedor ZnPc e do espalhador TiO_2 , mencionadas na tabela anterior com 10 mL de PDMS e 5 mL do ativador de enrijecimento da matriz. As camadas foram desenvolvidas de forma padrão, possuindo 1 mm de espessura e formato retangular cuja área corresponde a 1 cm^2 . Após o procedimento de preparação das camadas, nelas foram adicionadas a 150 mL de PDMS, sendo que, ao final do processo, o fantoma PC10 foi desenvolvido.

Um ponto importante e necessário que deve ser observado para a compreensão da análise das imagens obtidas pela técnica SFDI é a absorção óptica do cromóforo ZnPc, presente na figura 58; sendo assim, os picos de absorção da ZnPc possuem um mínimo próximo de 620 nm e seu máximo de absorbância encontra-se aproximadamente a 675 nm em ambos os solventes clorofórmio (CLF) e dimetilsulfóxido (DMSO). Contudo, quando ZnPc é misturada ao PDMS, há um alargamento do espectro de absorção óptico de forma que

seu ponto mínimo encontra-se próximo de 625 nm e seu máximo de absorbância a aproximadamente 825 nm.

A razão da utilização deste corante encontra-se no fato de que seus picos de absorção estão localizados na região da janela óptica terapêutica (500-1000nm), onde muitos cromóforos biológicos, como a oxihemoglobina e a deoxihemoglobina, os lipídios, a melanina e a água possuem baixa absorção nessa região, permitindo uma significativa penetração da luz no tecido biológico. Desta maneira, é possível simular por meio de um fantoma as características ópticas de um tecido biológico (MONTE et al., 2018).

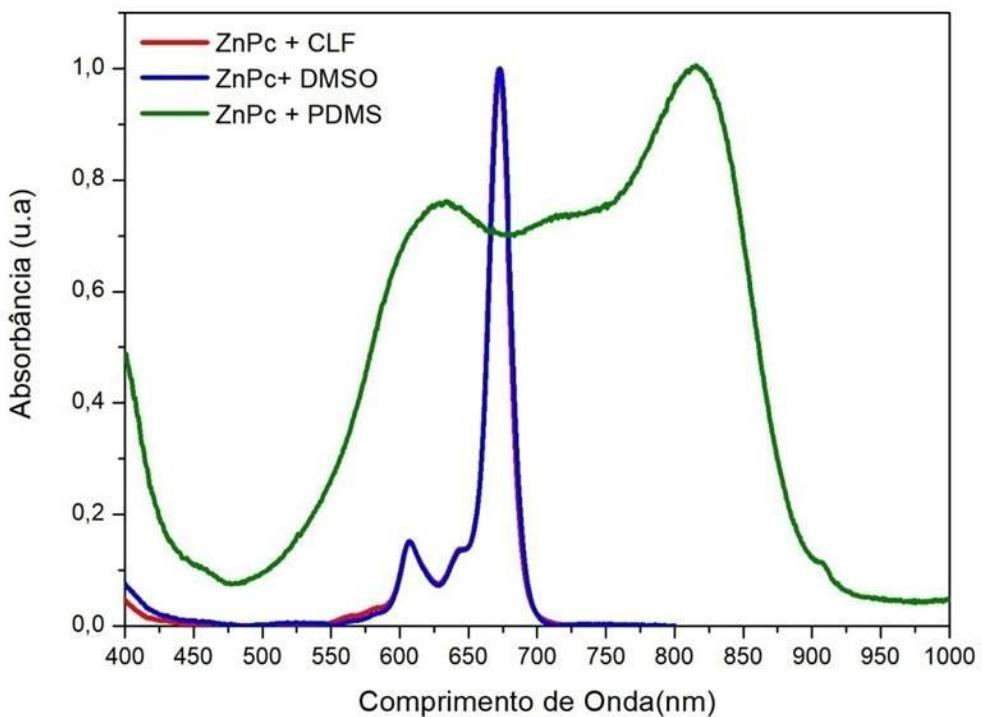


Figura 58: Comparação do espectro de absorção óptica do cromóforo zinco Ftalocianina (ZnPc) em três meios diferentes: clorofórmio (CLF), dimetilsulfóxido (DMSO) e polidimetilsiloxano (PDMS).

Retornando ao objetivo deste tópico, que é a obtenção das imagens pela técnica SFDI, os padrões senoidais foram projetados no fantoma PC10, sendo estes criados pelo software MATLAB (The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA). Dessa forma, houve a utilização de uma imagem bitmap de 8 bits em tons de cinza. O arquivo é, então, aberto pelo software PowerPoint (Microsoft Office, Inc.) como uma apresentação de slides, que, por sua vez, é

repassada de maneira automática em sequenciamento diferente a cada projeção. Toda a dinâmica deste processo é controlada pelo LabVIEW (CUCCIA et al., 2009).

Todo o aparato do SFDI desenvolvido em laboratório foi mantido fixo quando uma medida era realizada, inclusive o fantoma PC10, o qual permaneceu em repouso e sem inclinação da base que o sustenta. Um fato que poderia prejudicar as medidas experimentais e distorcer as imagens da projeção capturada pela CCD é a reflexão especular. Contudo, isso poderia ser solucionado por meio da utilização de filtros polarizadores ou da inclinação da câmera em um pequeno ângulo em relação ao projetor. Dessa forma, neste trabalho optou-se pela segunda alternativa.

A distância da amostra em relação ao projetor foi mantida constante em 30 cm para que a projeção dos padrões pudessem ocupar uma área de 7 cm x 7 cm na superfície da amostra para que toda a região contendo as camadas com a ZnPc capturasse integralmente a imagem.

A figura 59 consiste de imagens provenientes da captura da reflexão difusa do fantoma PC10 em diferentes padrões senoidais, sendo o suficiente para demonstrar o comportamento da modulação espacial em diferentes frequências e em um comprimento de onda (λ) específico. Ainda, pode-se observar que na figura que medida em que o valor da frequência espacial cresce a distância entre as linhas claras e escuras (cristas e vales) diminuem e o número de linhas tende a aumentar.

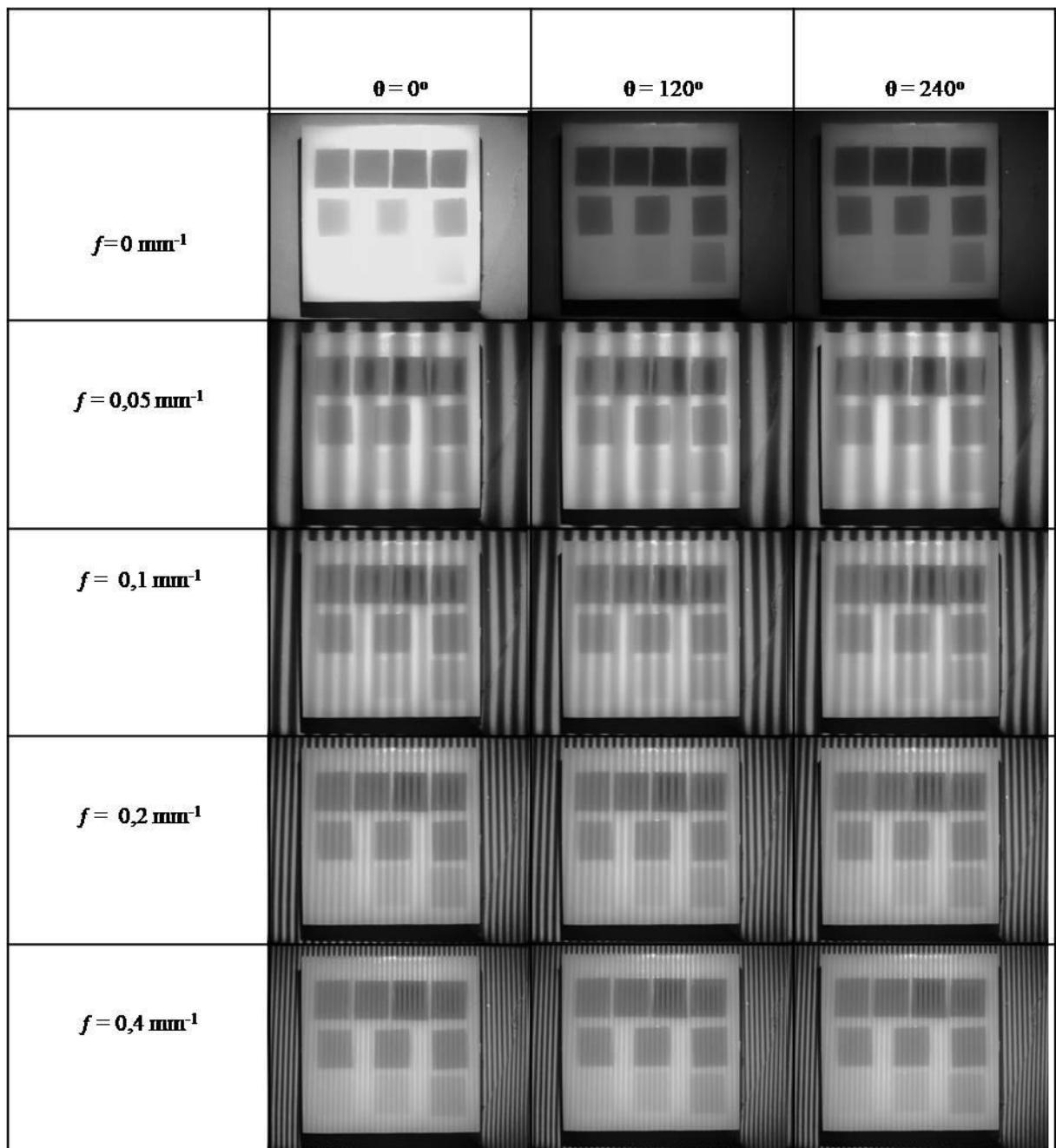


Figura 59: Imagens capturadas a partir do fantoma PC10 pelo programa LabVIEW onde foi selecionado e mantido o comprimento de onda correspondente a $\lambda=500$ nm para todas as frequências espaciais e fases escolhidas.

6.1.2 Fantoma NOV10

De um modo geral, o segundo fantoma desenvolvido para esta pesquisa é o NOV10. Dessa forma, este mimetizador é composto por três componentes básicos: a matriz de polidimetilsiloxano (PDMS), as nanopartículas de ouro (Au) (que servem como material absorvedor) e o agente espalhador dióxido de Titânio (TiO_2). Similar ao desenvolvimento do fantoma anterior, as substâncias foram escolhidas a fim de reproduzir o mais fielmente as propriedades ópticas de um tecido biológico, fato que também foi justificado em discussão de tópicos anteriores.

Para este fantoma, foram desenvolvidas quatro camadas em formato retangular com 1mm de espessura contendo as nanopartículas de ouro (Au) e o agente espalhador dióxido de titânio (TiO_2) as quais, posteriormente, foram introduzidas na matriz de PDMS. As nanopartículas de Au utilizadas foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich e possuem um diâmetro de 10 nm. Ainda, estas nanopartículas foram estabilizadas em suspensão de 0,1 mM em uma solução tampão de fosfato-salino (PBS).

A figura 60 exibe duas situações semelhantes: na coluna esquerda é apresentada a imagem original do fantoma NOV10, o qual possui diversas camadas com coloração marrom ($Au + TiO_2$) e é resultado da solução tampão, considerando que estas camadas foram posicionadas internamente na matriz de PDMS. A coluna da direita exemplifica as imagens da coluna esquerda utilizando-se de uma projeção tridimensional para exibir a disposição interna de cada camada no interior da matriz de PDMS.

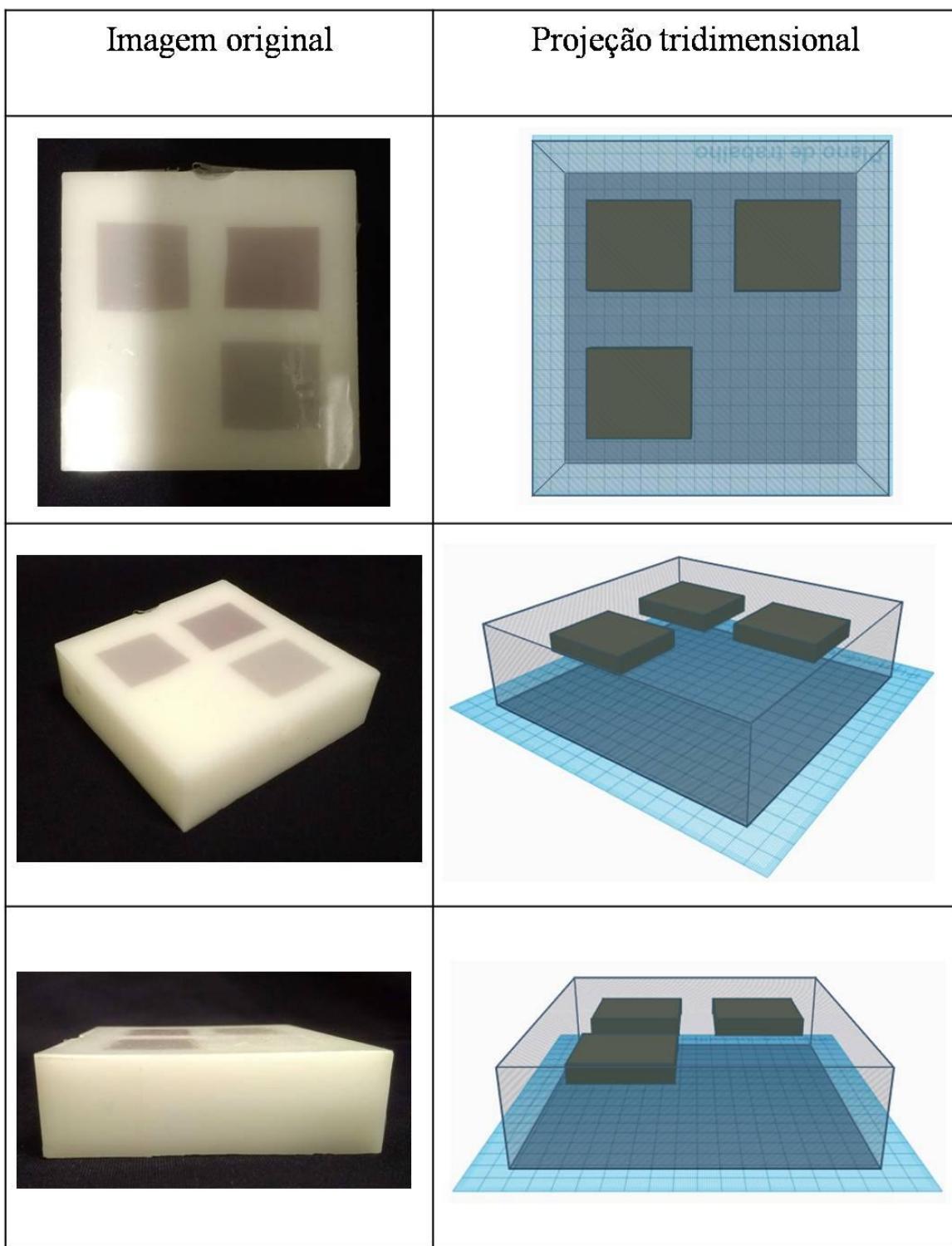
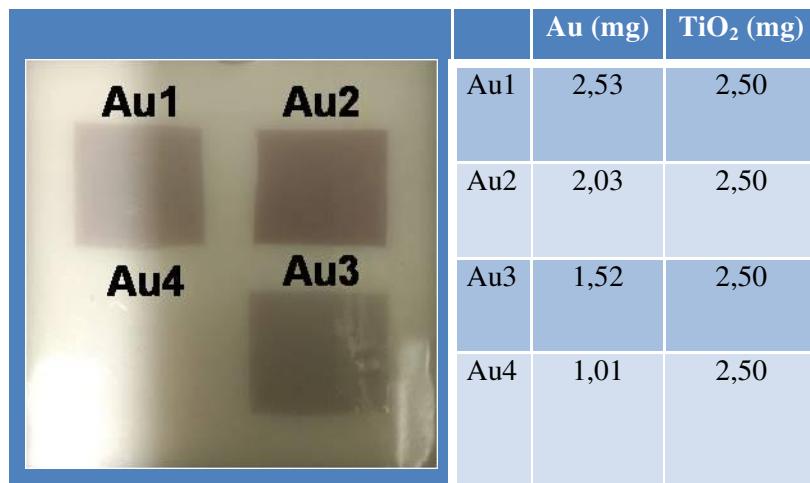


Figura 60: Imagem original e projeção tridimensional do fantoma NOV10, que contém pequenas camadas com diferentes concentrações de nanopartículas (Au) depositadas sobre a matriz de PDMS.

Para o fantoma NOV10, foram desenvolvidas quatro camadas com diferentes concentrações; sendo assim, estas podem classificadas como Au1, Au2, Au3 e Au4. Para cada uma dessas camadas, variou-se na quantidade de absorvedor (Au) e manteve-se constante a quantidade de material espalhador (TiO_2). As quantidades utilizadas no desenvolvimento de cada camada podem ser observadas na tabela 4:

Tabela 4: Quantidades utilizadas para a confecção das camadas utilizadas na fabricação do fantoma Au.



	Au (mg)	TiO_2 (mg)
Au1	2,53	2,50
Au2	2,03	2,50
Au3	1,52	2,50
Au4	1,01	2,50

A confecção das camadas citadas foi realizada por meio da combinação das nanopartículas de Au (agente absorvedor), do espalhador TiO_2 com 10 mL de PDMS e com 5 mL do ativador de endurecimento da matriz de PDMS. As camadas foram mantidas seguindo a padronização do fantoma anterior, possuindo 1 mm de espessura e formato retangular cuja área corresponde a $1cm^2$. Após o procedimento de preparação das camadas, estas foram inseridas em recipientes com formato de paralelepípedo com 150 mL de PDMS, sendo que, ao final do processo, o fantoma NOV10 foi desenvolvido.

Uma informação de grande relevância para a compreensão da análise das imagens obtidas pela técnica SFDI é a absorção óptica do cromóforo Au, de maneira que foram mensurados dois espectros em meios distintos, um na solução tampão de fosfato-salino (PBS) e outro em polidimetilsiloxano (PDMS), que podem ser observados na figura 61.

Pode-se observar também uma semelhança entre os espectros de absorção; porém, quando as nanopartículas de Au estão imersas na solução PBS, estas possuem pico de absorção em 525 nm, enquanto que nas nanopartículas em PDMS há um deslocamento para

550 nm, de acordo com a literatura. A razão desta mudança de posição está relacionada à polaridade do solvente, no qual as nanopartículas estão imersas. Dessa forma, elas apresentam pico único de absorção na região do visível (VIS) na faixa de 510 a 550 nm, sendo que também há uma mudança no pico de absorção deslocando para comprimentos de onda (λ) maiores à medida que o tamanho da nanopartícula cresce (CAI, 2008).

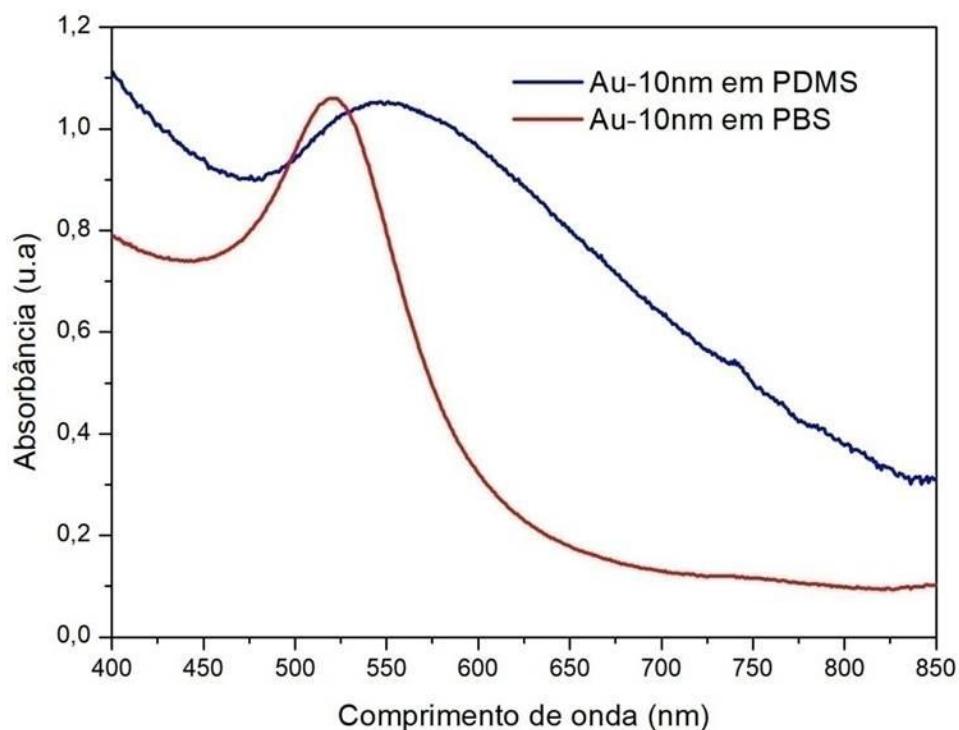


Figura 61: Comparação do espectro de absorção óptica do cromóforo ouro (Au) em dois meios diferentes: Solução tampão de fosfato-salino (PBS) e polidimetilsiloxano (PDMS).

As nanopartículas de ouro (Au) possuem compatibilidade para aplicações biológicas devido a propriedades físicas e químicas exclusivas destes materiais; aplicações na área biomédica com biosensores, imagem óptica, monitoramento e células e tecidos biológicos; entre outros. Entre as aplicações que se mais destacam está o uso de nanopartículas de ouro em conjunto com nanopartículas magnéticas no sentido de induzir determinados tipos de células cancerígenas para a obtenção de imagens médicas de qualidade, uma vez que estas nanopartículas se acumulam na região do tecido atingido (RAGHAVENDRA et al., 2014).

O emprego das nanopartículas de ouro (Au) cujo diâmetro é 10 nm está no fato de que seu pico de absorção se encontra na região da janela óptica terapêutica (500-1000 nm), na

qual muitos cromóforos biológicos possuem absorção atenuada, permitindo uma significativa penetração da luz no tecido biológico e possibilitando simular por meio de um fantoma as características ópticas da pele (MONTE et al., 2018).

Utilizando a mesma metodologia para mensurar o fantoma anterior e realizar a obtenção das imagens pela técnica SFDI, os padrões senoidais foram projetados no fantoma NOV10, sendo estes criados pelo software MATLAB (The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA) e com o uso de uma imagem bitmap de 8 bits em tons de cinza. O arquivo foi, então, aberto pelo software PowerPoint (Microsoft Office, Inc.) como uma apresentação de slides, que, por sua vez, foi repassada de maneira automática em sequenciamento diferente a cada projeção. Toda a dinâmica deste processo é controlada pelo LabVIEW (CUCCIA et al., 2009).

Ao realizar as projeções no fantoma NOV10, a distância entre o material e o equipamento sempre é mantida a uma distância fixa, evitando durante a mensuração quaisquer vibrações e deslocamentos que possam deixar em dúvida a qualidade das imagens. A projeção senoidal então é obtida em um área da amostra correspondente a 7 cm x 7 cm quando o projetor é posicionado a 30 cm do fantoma.

Um problema comum que ocorreu no fantoma apresentado anteriormente foi a reflexão especular; esta gerou um brilho intenso que reduziu a qualidade das imagens de reflexão. Sendo assim, a correção também foi realizada alterando o ângulo da câmera com relação ao projetor.

As imagens obtidas pela técnica SFDI, provenientes da captura da reflexão difusa do fantoma NOV10 quando submetido a diferentes padrões senoidais, podem ser vistas na figura 62 e demonstram o comportamento da modulação espacial em diferentes frequências espaciais e para um comprimento de onda (λ) específico.

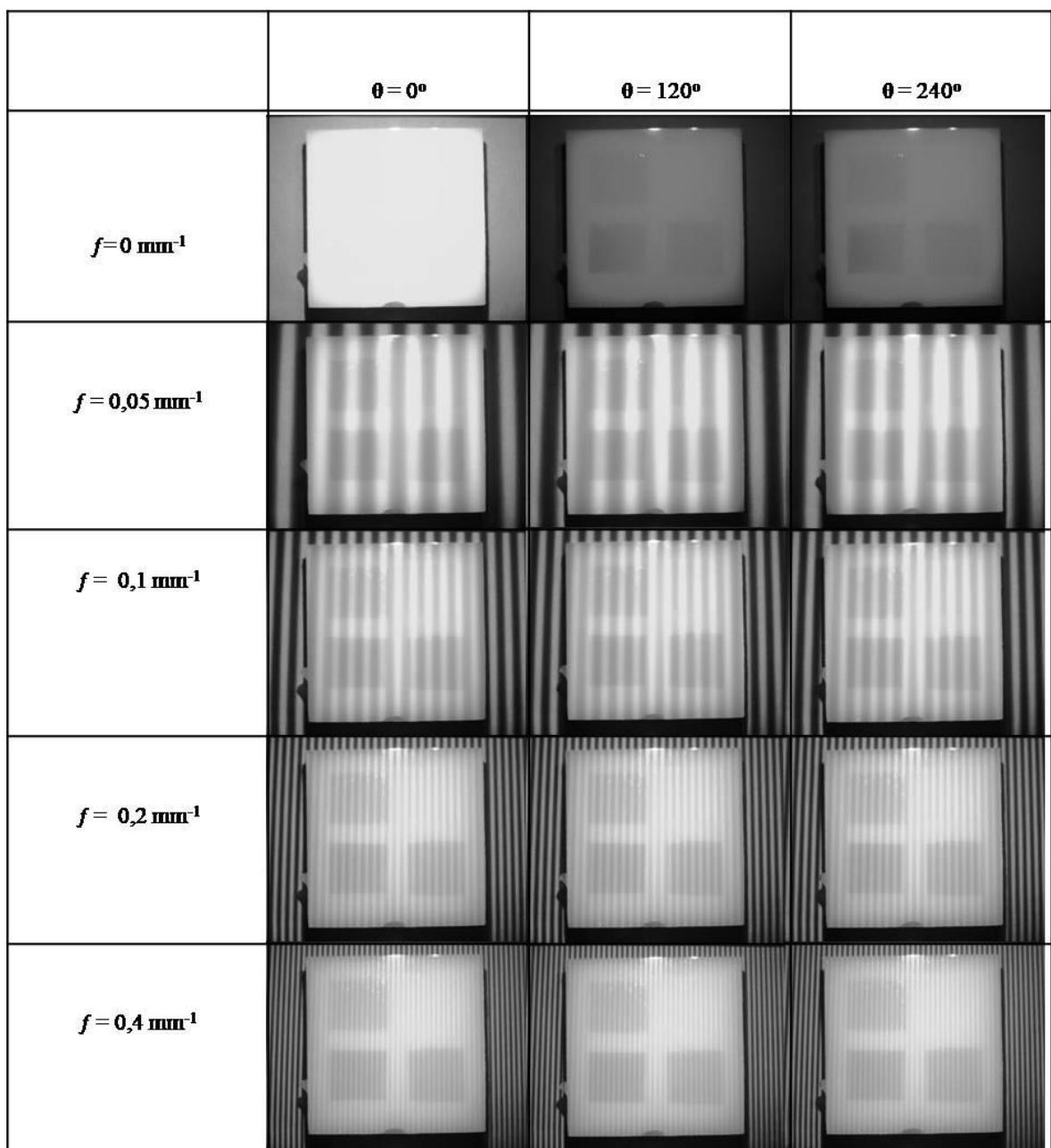


Figura 62: Imagens capturadas a partir do fantoma NOV10 pelo programa LabVIEW, onde foi selecionado e mantido o comprimento de onda correspondente a $\lambda=500$ nm para todas as frequências espaciais e fases escolhidas.

6.1.3 Caso particular - Fantoma Star

De maneira geral, o fantoma STAR (ver figura 63) foi desenvolvido similarmente ao PC10 e agrupa os mesmos materiais: a matriz de polidimetilsiloxano (PDMS), o material absorvedor corante zinco ftalocianina (ZnPc) e o agente espalhador dióxido de titânio (TiO_2), com o objetivo de tentar reproduzir o mais próximo possível as propriedades ópticas de um tecido biológico.

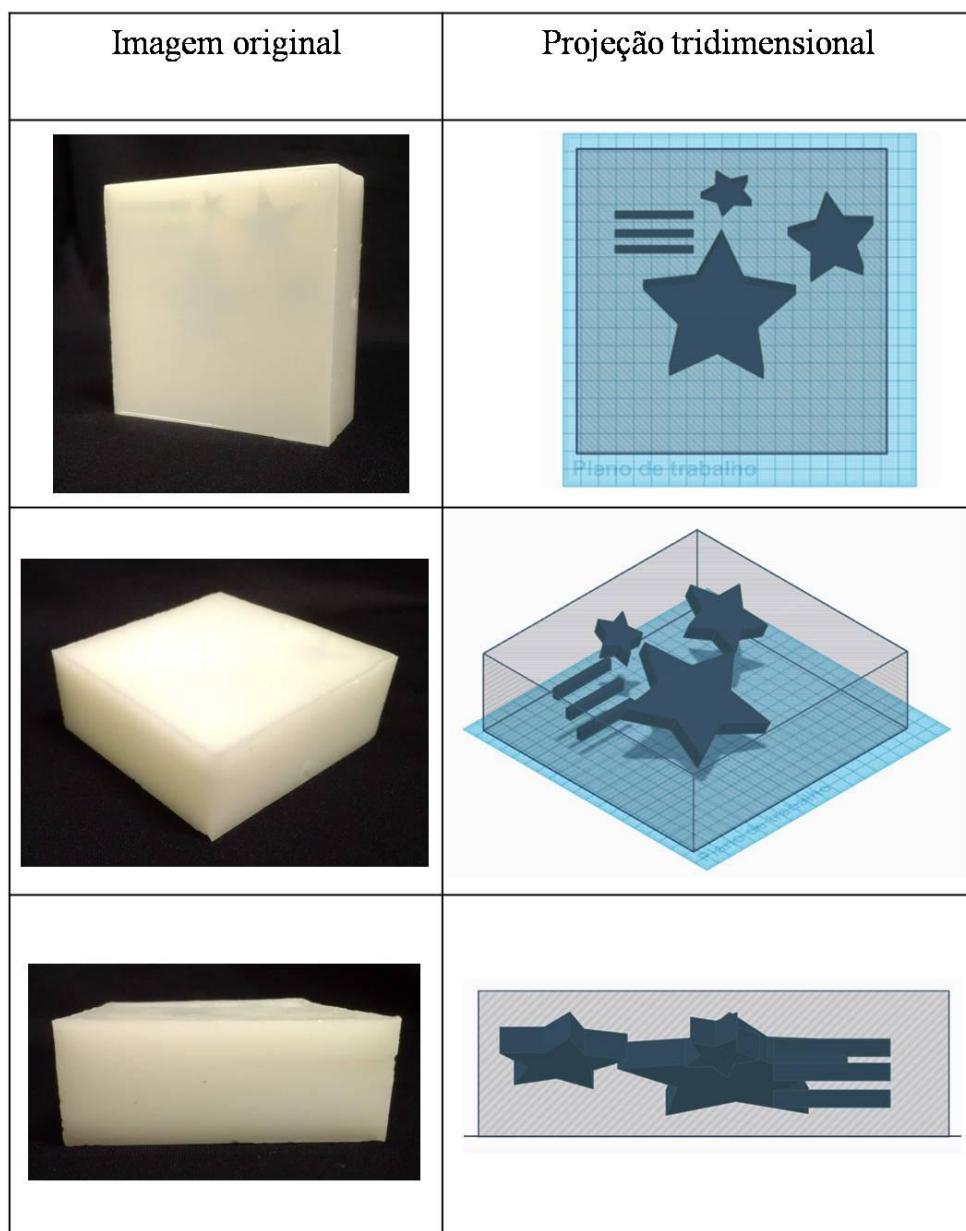
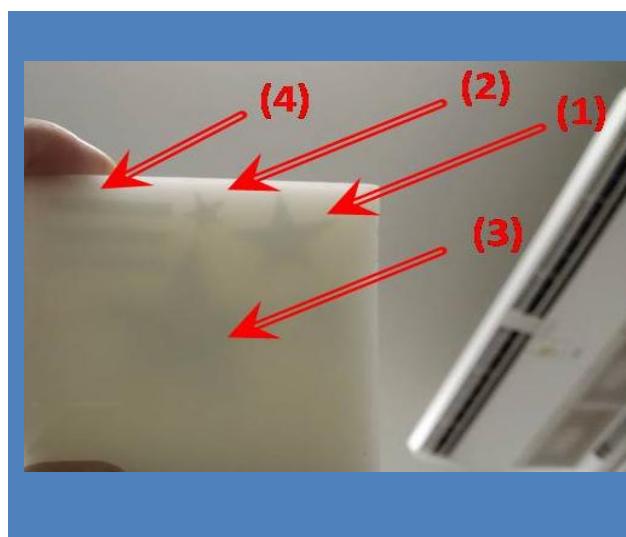


Figura 63: Imagem original e projeção tridimensional do fantoma STAR, que contém estruturas internas no formato de estrelas e barras dispostas diagonalmente na matriz de PDMS.

Neste mimetizador, ao contrário do processo de produção dos fantomas anteriores, foram produzidos objetos em forma de estrelas e barras (ver figura 63 com a imagem original do fantoma e sua projeção 3-D). Dessa forma, estes objetos foram confeccionados externamente utilizando o cromóforo ZnPc e, posteriormente, adicionados em posição diagonal no interior da matriz de PDMS.

O interesse no estudo deste fantoma se refere à capacidade do equipamento SFDI em obter imagens com boa resolução em diferentes profundidades na matriz de PDMS, isto é, simulando desde um tumor superficial ao mais profundo na pele. As quantidades utilizadas na confecção dos objetos inseridos na matriz de PDMS do fantoma STAR podem ser vistas na tabela 5 abaixo:

Tabela 5: Quantidades utilizadas para a confecção das camadas utilizadas na fabricação do fantoma STAR.



	ZnPc (mg)	TiO2 (mg)
(1) Estrela média	1,20	1,18
(2) Estrela pequena	1,01	1,18
(3) Estrela grande	1,52	1,18
(4) barras	1,25	1,18

Além disso, o caminho percorrido para a obtenção das imagens de reflexão difusa do fantoma STAR segue os mesmos passos do que foi realizado para a obtenção de imagens com o PC10 e NOV10. O aparato do SFDI foi mantido fixo durante toda captura das imagens, sendo que o fantoma também permaneceu estático e sem qualquer inclinação da base o qual se encontrava. A reflexão especular pôde ser corrigida pela opção da utilização de filtros polarizadores ou inclinação da câmera em um pequeno ângulo; assim, em relação ao projetor, optou-se pela segunda alternativa.

A distância da amostra STAR em relação ao projetor foi mantida constante em 30 cm para que a projeção dos padrões pudesse ocupar uma área de 7 cm x 7 cm na superfície da

amostra para que toda a região contendo as camadas com a ZnPc tivessem a captura integral na imagem.

A figura 64 a seguir refere-se as imagens provenientes da captura da reflexão difusa do fantoma STAR para diferentes padrões senoidais, que demonstra o comportamento da modulação espacial em diferentes frequências espaciais para um comprimento de onda (λ) específico. Logo, pode-se observar que, à medida que o valor da frequência espacial cresce a distância entre as linhas claras e escuras (cristas e vales) diminuem e o número de linhas tende a aumentar.

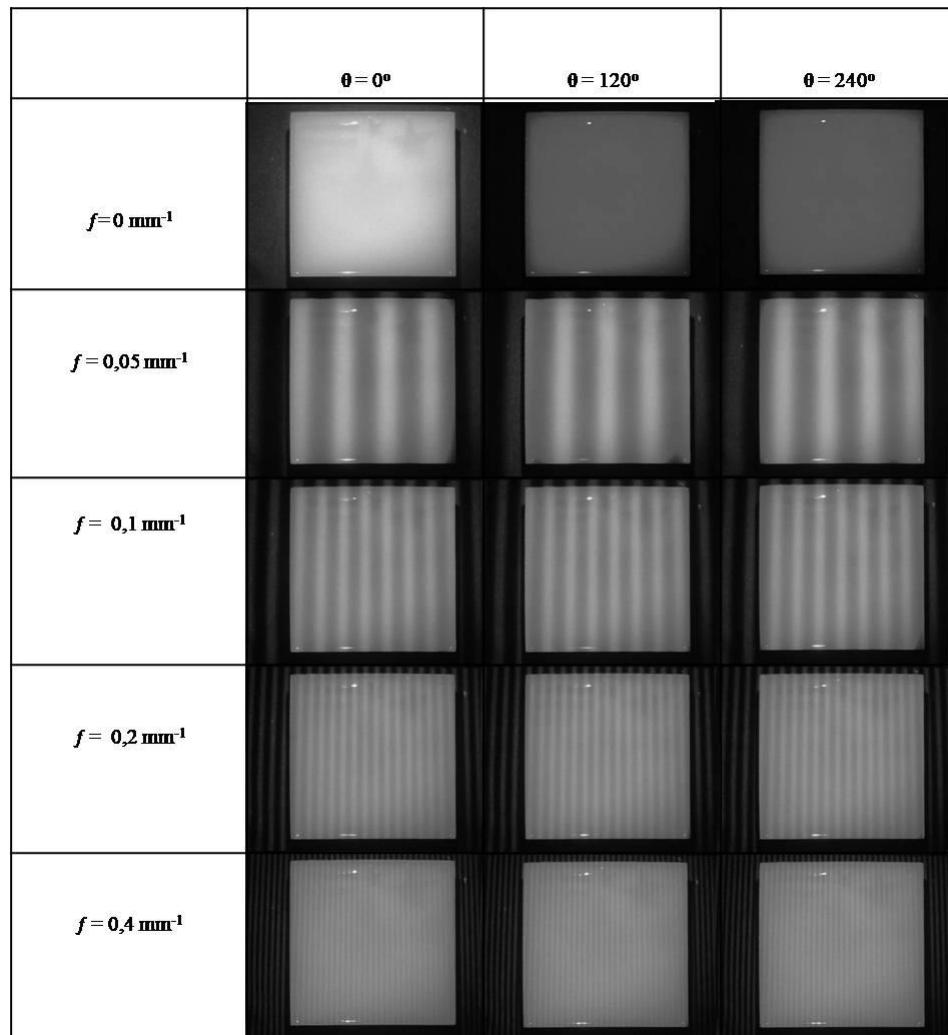


Figura 64: Imagens capturadas a partir do fantoma STAR pelo programa LabVIEW, onde foi selecionado e mantido o comprimento de onda correspondente a $\lambda=500$ nm para todas as frequências espaciais e fases escolhidas.

6.2 Processamento de imagens por meio da técnica SFDI

Quando uma fonte de luz incide sobre um meio turbido, especificamente em um tecido biológico como a pele, parte dos fótons pode ser simultaneamente refletida, transmitida ou sofrer eventos de espalhamentos múltiplos no meio, sendo que a técnica SFDI rejeita a reflexão espelhada e coleta a reflexão difusa contendo informações tanto do parâmetro de absorção quanto do de espalhamento da amostra, que são codificadas na forma de imagens.

Sendo assim, após o procedimento de captura das imagens de reflexão, o próximo passo foi o de processar as informações coletadas e convertê-las em mapas de absorção e espalhamento, bem como quantificar as propriedades ópticas da amostra.

Toda a rotina para decodificar os coeficientes de absorção (μ_a) e espalhamento (μ_s) desenvolvida para o processamento das imagens foi escrita em Matlab e seguiu os seguintes passos apresentados na figura 65:

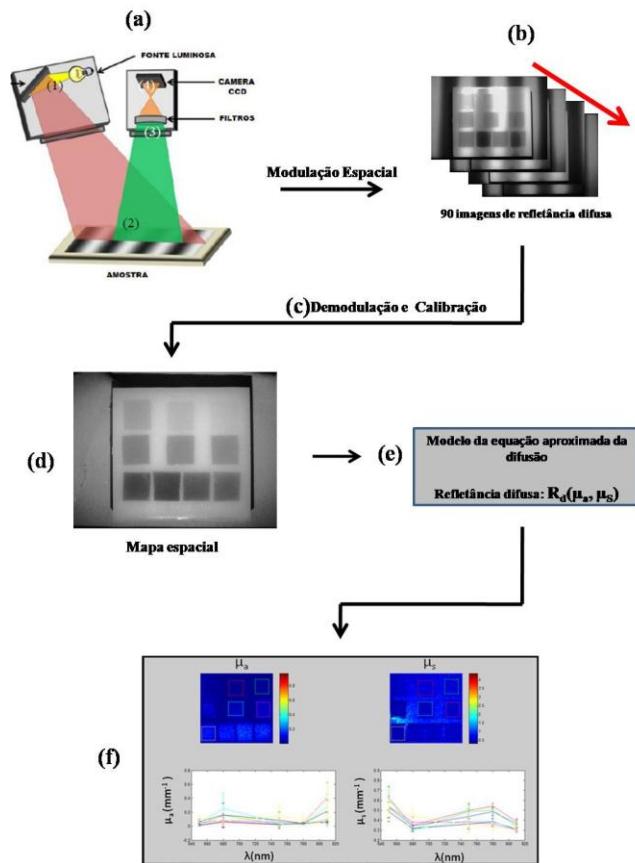


Figura 65: Esquema de obtenção e processamento de imagens pela técnica SFDI.

- a) Obtenção das imagens provenientes da refletância difusa capturadas pela câmera CCD e comandadas pelo LabVIEW;
- b) Cada imagem modulada espacialmente foi salva em pastas equivalentes para cada frequência espacial escolhida, no comprimento de onda (λ) pré-determinado e com deslocamento de fase (0° , 120° e 240°). Neste estágio, o MATLAB condensou as figuras em um bloco único que utiliza do código apresentado no **Anexo I** deste trabalho, cujo título é **convert_HC1_data.m**. Este, por sua vez, modificou o formato da imagem gerada pelo SFDI em dados;
- c) As imagens anteriormente obtidas foram calibradas, ou seja, comparadas com as imagens de um fantoma homogêneo cujas propriedades ópticas são conhecidas e cadastradas em um banco de dados do computador, sofrendo, assim, o processo de demodulação;
- d) Nesta etapa, utilizou-se um novo código, o qual se encontra novamente no **Anexo I** deste trabalho e foi designado como **test_script_for_HC1.m**. Este conjunto de comandos permitiu a criação de um mapa espacial de cores proveniente das imagens anteriores, em que é possível interagir com o programa MATLAB e selecionar a região de interesse para a determinação das propriedades ópticas (μ_a e μ_s);
- e) Os parâmetros ópticos puderam ser extraídos quando foram ajustados por um modelo de processamento pré-escolhido pelo usuário, que, no caso, foi a equação aproximada da difusão;
- f) Na etapa final, foram disponibilizados os mapas de absorção e espalhamento da região selecionada, bem como a relação entre os coeficientes de absorção e espalhamento em função do comprimento de onda (λ), representada nos gráficos abaixo de cada mapa.

6.2.1 Fantoma PC10

Como mencionado anteriormente, o fantoma PC10 é caracterizado por possuir três componentes básicos: a matriz de polidimetilsiloxano (PDMS), o corante cromóforo absorvedor zinco ftalocianina (ZnPc) e o agente espalhador dióxido de titânio (TiO₂). A

partir dos dados analisados para este fantoma, foram obtidos os mapas dos cromóforos e as curvas de absorção e espalhamento em função do comprimento de onda (λ).

Observando o espectro de absorção óptica do cromóforo ZnPc na figura 58, verifica-se que a molécula da ZnPc, quando está imersa em PDMS, passa a ter um comportamento diferente da situação em que estaria na presença de solventes líquidos. Dessa forma, há, então, uma ampliação da região de absorção em função do comprimento de onda (λ) (MONTE et al., 2018).

Utilizando-se do raciocínio anterior, os mapas de absorção e espalhamento foram gerados nas faixas de 530, 650, 680, 750 e 810 nm, presentes na figura 66. Para melhor orientação desta figura, a coluna da esquerda corresponde à absorção, enquanto que a coluna da direita representa o evento de espalhamento, bem como uma forma de analisar os mapas. Sendo assim, esta análise é realizada por meio da escala de cores localizada ao lado direito de cada mapa: quanto mais próximo do campo vermelho, mais intensa é a absorção ou o espalhamento local. Opostamente, quanto mais azul escuro, menores são as contribuições.

Ainda, analisando a figura 66, é possível ver que a absorção é mais intensa em 530nm, 650 e 680nm. Entretanto, para os comprimentos de onda (λ) correspondentes a 750 e 810nm, visualiza-se uma redução da intensidade da absorção. Esse comportamento justifica-se no fato de que foi utilizado um projetor RGB (*Red, Green, Blue*) e este possui um espectro de emissão limitante ao vermelho (700nm, aproximadamente), ou seja, as imagens adquiridas em comprimentos de onda superiores terão um mapeamento ineficiente, o que pode ser visto nas imagens apresentadas.

Da mesma forma, pode-se inferir que os mapas de espalhamento também deverão apresentar comportamento semelhante à situação anterior, pois as melhores imagens para este parâmetro correspondem a comprimentos de onda (λ) abaixo de 780 nm.

Um fato importante sobre os mapas de espalhamento correspondentes ao fantoma PC10 é que as regiões que apresentaram maior intensidade na escala de cores foram as que não possuíam as camadas retangulares de ZnPc e TiO₂. Sendo assim, o espalhamento é mais proeminente nas regiões que contém o PDMS.

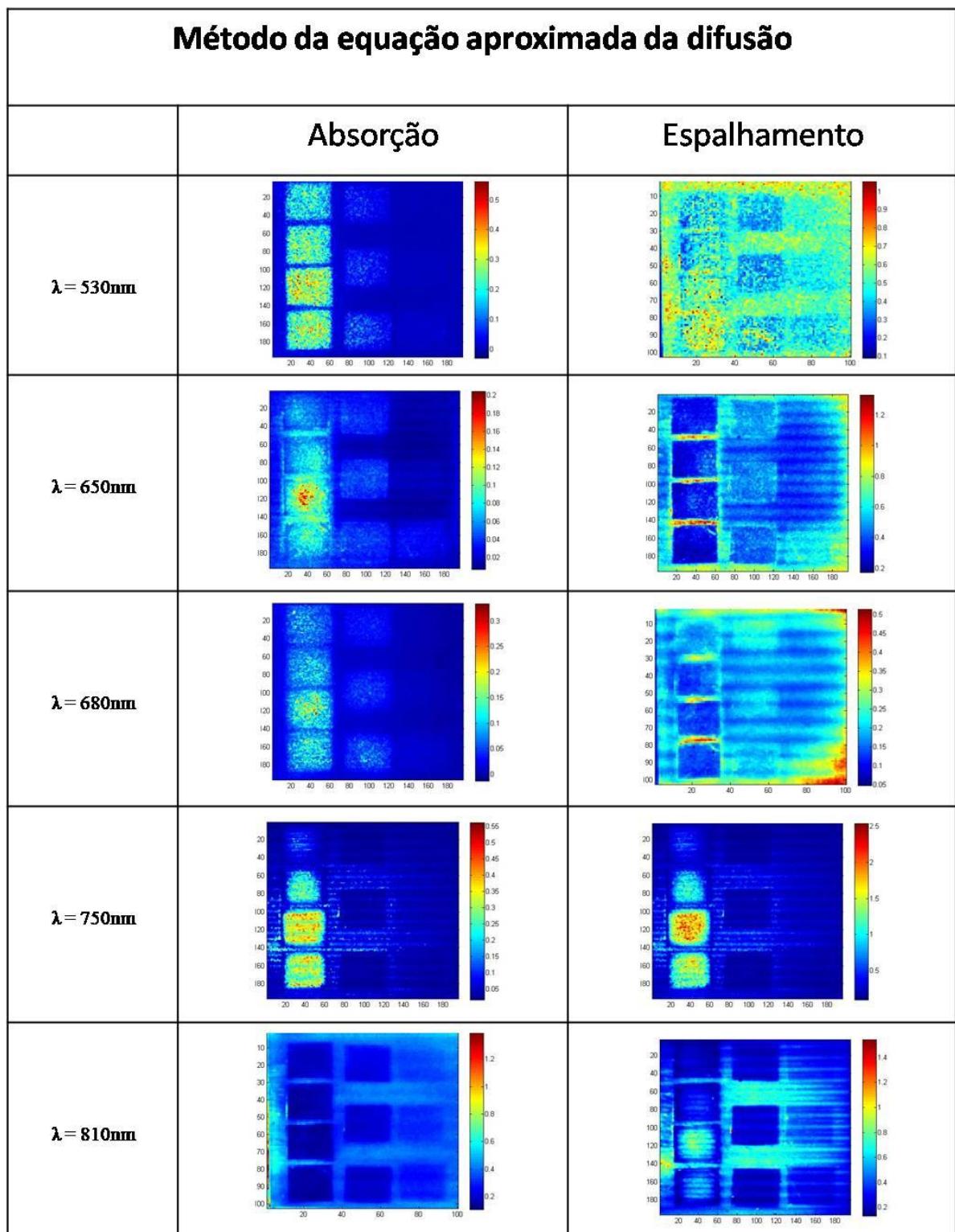


Figura 66: Mapas de absorção e espalhamento representados em duas colunas distintas e filtrados por diferentes comprimentos de onda (λ), cujo objeto é detectar o cromóforo zinco ftalocianina pelo método da difusão.

Em conjunto com a aquisição das imagens de mapeamento, também são geradas as curvas de absorção e espalhamento em função do comprimento de onda, apresentadas na figura 67 e que consistem na representação das medidas quantitativas para os coeficientes de absorção e espalhamento em função do comprimento de onda (λ).

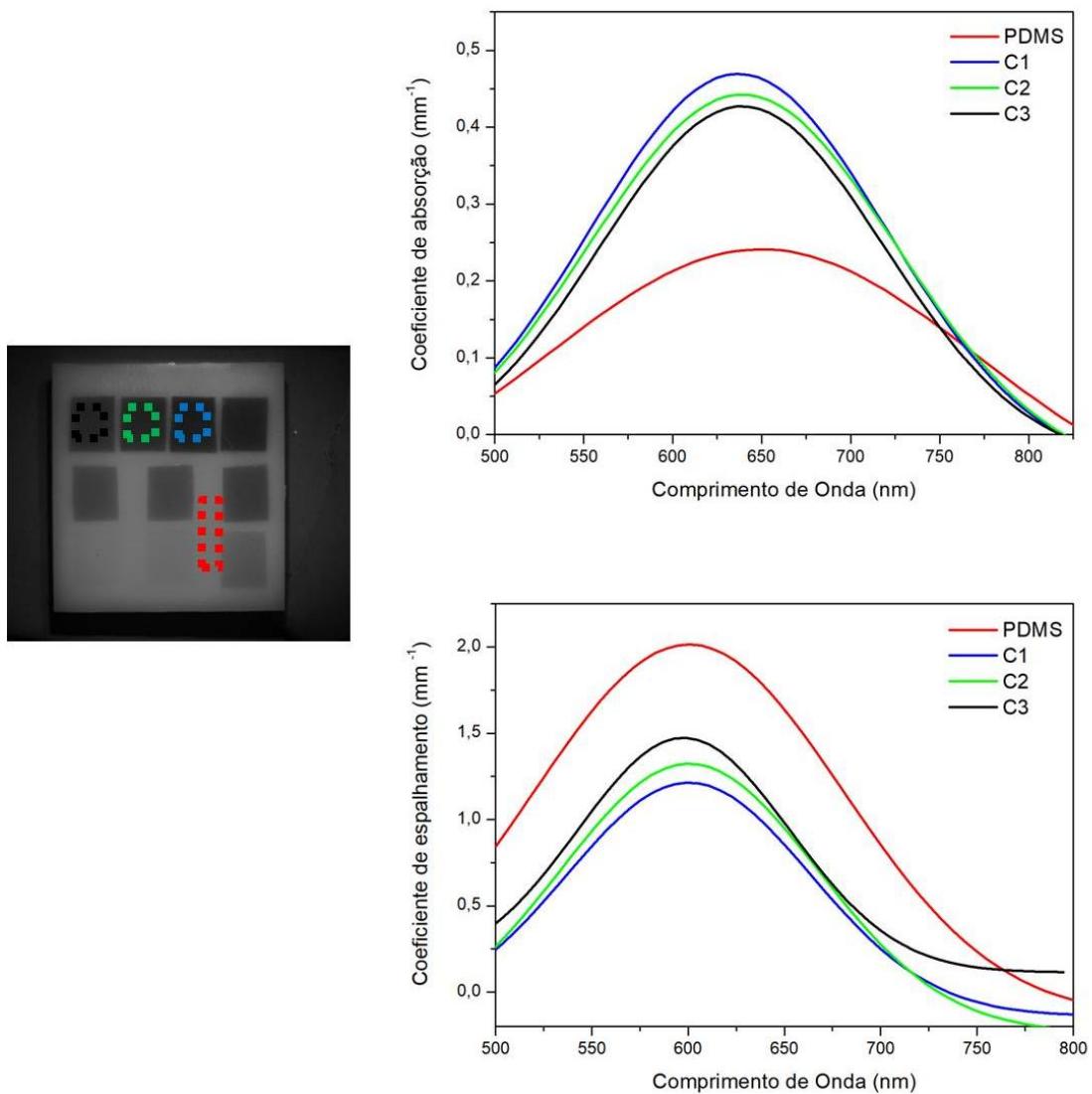


Figura 67: Curvas dos coeficientes de absorção e espalhamento reduzido em função do comprimento de onda e medidas em diferentes regiões do fantoma PC10.

As curvas foram obtidas a partir da imagem de reflexão difusa gerada em MATLAB, cujas regiões de interesse são selecionadas durante a fase de processamento para serem analisadas quantitativamente. Os valores apresentados nos gráficos da figura 67 são a representações dos valores médios da absorção ou de espalhamento da região de interesse escolhida.

Sendo assim, para o PC10 foram selecionadas quatro regiões de interesse deste fantoma, sendo três na presença de ftalocianina de zinco, vistas na figura 67 e representadas, então, nas cores azul escuro (**C1**), verde (**C2**), preto (**C3**) e uma região local em vermelho contendo apenas a matriz PDMS. É importante relatar que o software permite apenas a escolha das regiões; contudo, a escolha das cores que demarcam a região fica a critério do programa.

Nas regiões analisadas, é perceptível que há uma clara diferença de absorção e espalhamento entre os locais que possuem a presença de ZnPc e PDMS e isso pode ser observado também nos mapas de cores. Deve-se notar que, assim como nas medidas do mapeamento apresentadas anteriormente, há limitações para comprimentos de onda acima de 650nm, visto que há limitação do equipamento utilizado. Desta maneira, as discussões a seguir serão limitadas aos três comprimentos de onda iniciais selecionados pelos filtros de 530 nm, 650 nm e 680 nm. Na tabela 6 é possível a acompanhar os valores quantificados de μ_a e μ'_s :

Tabela 6: Valores dos coeficientes de absorção (mm^{-1}) e espalhamento reduzido (mm^{-1}) obtidos pela técnica de SFDI para o fantoma PC10 em diferentes comprimentos de onda (λ).

Amostra PC10	Comprimento de Onda (λ)	Coeficiente de Absorção (μ_a)	Coeficiente de Espalhamento (μ'_s)
C1	530 nm	0,1789 mm^{-1}	0,5608 mm^{-1}
	650 nm	0,4646 mm^{-1}	0,8969 mm^{-1}
	680 nm	0,3937 mm^{-1}	0,5192 mm^{-1}
C2	530 nm	0,1673 mm^{-1}	0,7073 mm^{-1}
	650 nm	0,4398 mm^{-1}	0,9939 mm^{-1}
	680 nm	0,3798 mm^{-1}	0,5020 mm^{-1}
C3	530 nm	0,1446 mm^{-1}	0,8068 mm^{-1}
	650 nm	0,4241 mm^{-1}	0,9441 mm^{-1}
	680 nm	0,3594 mm^{-1}	0,5345 mm^{-1}

6.2.2 Fantoma NOV10

Como mostrado no tópico que demonstra a confecção do fantoma NOV10 já apresentado, este possui em sua composição a matriz de polidimetilsiloxano (PDMS), o cromóforo absorvedor representado pelas nanopartículas de ouro (Au) e o agente espalhador dióxido de titânio (TiO_2). Similar ao fantoma PC10, a medida das propriedades ópticas do NOV10 ocorreu por meio da técnica SFDI, a qual resultou nos mapas dos cromóforos e nas curvas de absorção e espalhamento em função do comprimento de onda (λ).

A absorção óptica do cromóforo Au pode ser visualizada por meio da figura 61 apresentada anteriormente, sendo duas amostras distintas: quando está imersa em PDMS e na situação em que ela está imersa na solução tampão (PBS). Logo, é perceptível que ocorre um alargamento da região de absorção em função do comprimento de onda na situação com o PDMS em comparação com o PBS e isso serve de referência para o entendimento dos mapas de absorção e espalhamento.

A mesma rotina de medidas também foi realizada gerando os mapas na faixa de 530, 650, 680, 750 e 810 nm (ver figura 68). Novamente, a coluna da esquerda corresponde à absorção, enquanto que a coluna da direita representa o evento de espalhamento, bem como a escala de cores localizada ao lado direito de cada mapa. Esta escala sugere que a cor presente no mapa, quanto mais próxima está do campo vermelho, mais intensa é a absorção ou espalhamento local; e quanto mais azul escuro, menores são as contribuições.

Ainda, na análise da figura 68, verifica-se que nas regiões onde a absorção é mais intensa, esta acontece em comprimentos de onda com 530 nm, 650, 680 nm. Contudo, para os comprimentos de onda (λ) correspondentes a 750 e 810 nm, há uma redução extrema da intensidade da absorção. A alegação para esse comportamento é que foi utilizado um projetor RGB (*Red, Green, Blue*) e este possui um espectro de emissão limitante ao vermelho (700 nm aproximadamente), ou seja, imagens adquiridas em comprimentos de onda superiores terão um mapeamento de baixa qualidade de imagem e isso justifica a ausência de mapas de cores para a região de 810 nm.

Ainda, sobre os mapas de espalhamento correspondentes ao fantoma NOV10, as regiões que apresentaram maior intensidade na escala de cores foram as que não possuíam a camadas retangulares de Au e TiO_2 . Sendo assim, o espalhamento é mais proeminente nas regiões onde contém o PDMS.

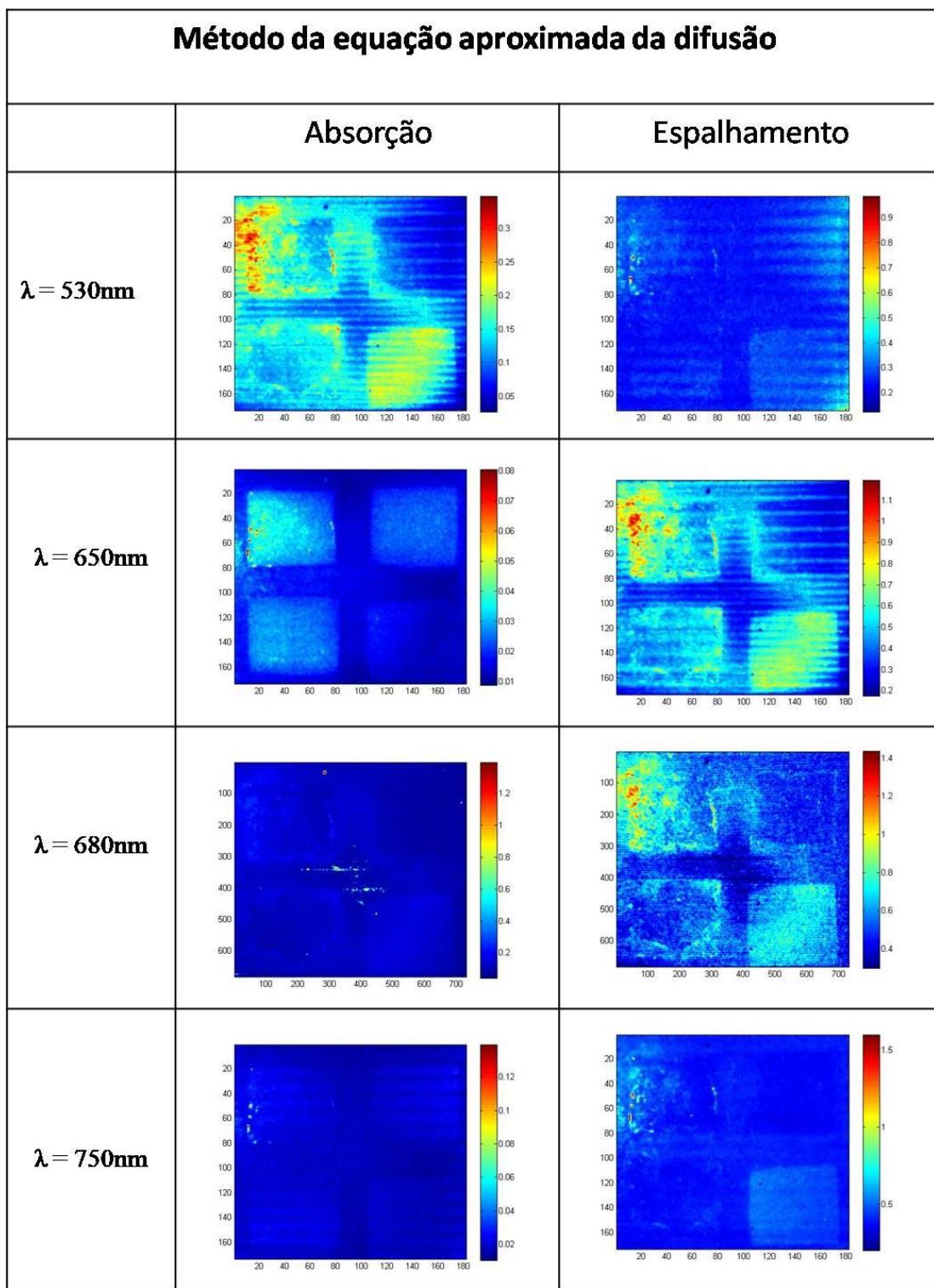


Figura 68: Mapas de absorção e espalhamento representados em duas colunas distintas e filtrados por diferentes comprimentos de onda (λ), cujo objeto é detectar o cromóforo ouro (Au) pelo método da difusão.

Em conjunto com a aquisição das imagens de mapeamento, também foram geradas as curvas de absorção e espalhamento em função do comprimento de onda que são apresentadas na figura 69. Estas são as representações das medidas quantitativas para os coeficientes de absorção e espalhamento em função do comprimento de onda (λ).

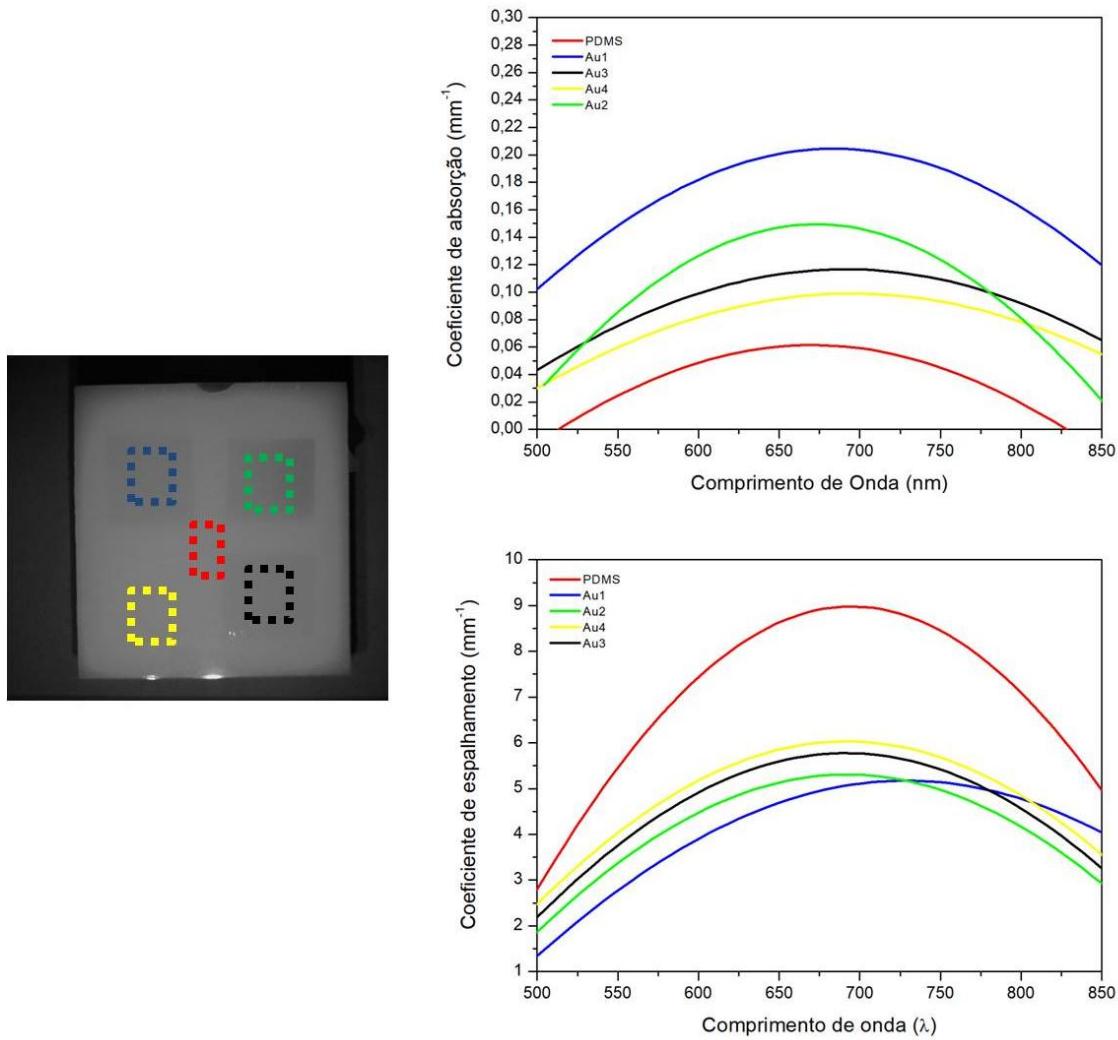


Figura 69: Curvas dos coeficientes de absorção e espalhamento reduzido em função do comprimento de onda medidos em diferentes regiões do fantoma NOV10.

As curvas foram obtidas a partir da imagem de reflexão difusa gerada em MATLAB, cujas regiões de interesse foram selecionadas durante a fase de processamento para serem analisadas quantitativamente. Os valores apresentados nos gráficos da figura 69 são a representações dos valores médios da absorção ou espalhamento da região de interesse escolhida.

Dessa forma, para o NOV10 foram selecionadas quatro regiões de interesse deste fantoma; entre elas, há três na presença de nanopartículas de ouro (Au), também representadas pelas cores azul escuro (**Au1**), verde (**Au2**), preto (**Au3**) e amarelo (**Au4**) e um campo em vermelho contendo apenas a matriz PDMS.

Nos locais que possuem a presença de nanopartículas de Au e PDMS, é possível confirmar visualmente uma diferença de absorção e espalhamento que pode ser observada também nos mapas de cores.

Além disso, deve-se notar que, assim como nas medidas do mapeamento apresentadas anteriormente, há limitações para comprimentos de onda acima de 650 nm, visto a presença de limitação do equipamento utilizado. Dessa maneira, as discussões a seguir serão limitadas desta vez aos três comprimentos de onda iniciais selecionados pelos filtros 530 nm, 650 nm e 680 nm. Na tabela 7 é possível a acompanhar os valores quantificados de μ_a e μ'_s :

Tabela 7: Valores de absorção (mm^{-1}) e espalhamento reduzido (mm^{-1}) obtidos pela técnica de SFDI para amostra NOV10.

Amostra NOV10	Comprimento de Onda (λ)	Coeficiente de Absorção (μ_a)	Coeficiente de Espalhamento (μ'_s)
Au1	530 nm	0,1309 mm^{-1}	2,2234 mm^{-1}
	650 nm	0,2003 mm^{-1}	4,6705 mm^{-1}
	680 nm	0,2044 mm^{-1}	5,0117 mm^{-1}
Au2	530 nm	0,0683 mm^{-1}	2,8012 mm^{-1}
	650 nm	0,1477 mm^{-1}	5,1174 mm^{-1}
	680 nm	0,1491 mm^{-1}	5,3004 mm^{-1}
Au3	530 nm	0,6333 mm^{-1}	3,1652 mm^{-1}
	650 nm	0,1127 mm^{-1}	5,5814 mm^{-1}
	680 nm	0,1165 mm^{-1}	5,7688 mm^{-1}
Au4	530 nm	0,0486 mm^{-1}	3,4458 mm^{-1}
	650 nm	0,0947 mm^{-1}	5,8878 mm^{-1}
	680 nm	0,0987 mm^{-1}	6,0261 mm^{-1}

6.2.3 Caso particular - Fantoma STAR

Além de parâmetros ópticos como o coeficiente de absorção (μ_a) e espalhamento (μ_s), outra variável que se destaca é a profundidade de penetração, pois a partir desta é possível obter informações sobre como a luz se transmite no tecido e sabe-se que, quando a luz tenta adentra este meio, há múltiplos efeitos de absorção e espalhamentos acontecendo de forma dinâmica (Z. HUANG, H. XU, 2018).

Com o objetivo de estudar a propagação da luz em camadas com mais de 2 mm de espessura, foi desenvolvido o fantoma STAR contendo a matriz de polidimetilsiloxano (PDMS), o corante absorvedor zinco ftalocianina (ZnPc) e o agente espalhador dióxido de titânio (TiO_2), componentes também utilizados no fantoma PC10.

A diferença entre os dois mimestizadores é que no STAR as “camadas” foram criadas em formato de estrelas e barras e posicionadas diagonalmente em relação à matriz, enquanto que, no PC10, as camadas eram uniformes, retangulares e posicionadas paralelamente e na mesma altura no interior da matriz.

Na figura 70 são apresentados os mapas de absorção e espalhamento processados e obtidos seguindo a faixa de filtros utilizados no equipamento SFDI, os quais correspondem a 530, 650, 680, 750 e 810nm. No entanto, para comprimentos de onda (λ) superiores a 700 nm, ocorre uma perda por parte da intensidade nas figuras de absorção. Isso se justifica no fato que é o projetor que utiliza um sistema RGB (*Red, Green, Blue*) e possui um espectro de emissão limitante para o visível (700 nm, aproximadamente), o que significa que as imagens adquiridas em comprimentos de onda superiores terão um mapeamento de baixa qualidade de imagem.

Analizando as imagens, observa-se que a qualidade das figuras de absorção se reduz à medida que crescem os comprimentos de onda, sendo que os mapas mais nítidos se encontravam na faixa de 530 a 680 nm. Outro ponto que justifica tal resultado é o espectro de absorção óptica da ZnPc em PDMS na figura 61; este aponta uma forte absorbância por parte da molécula do corante entre 550 a 680 nm.

No caso dos mapas de espalhamento, as imagens são mais visíveis para comprimentos de onda abaixo de 750 nm. Porém, as imagens aparentemente tiveram uma excelente qualidade.

Sobre os resultados do fantoma STAR, a redução da absorção foi gerada em função do posicionamento das formas geométricas dentro da matriz de PDMS, uma vez que a técnica SFDI torna-se limitada para obtenção de imagens em grandes profundidades. Além disso, o êxito das imagens de espalhamento está na quantidade de PDMS acumulada sobre as peças contendo o ZnPc e TiO₂.

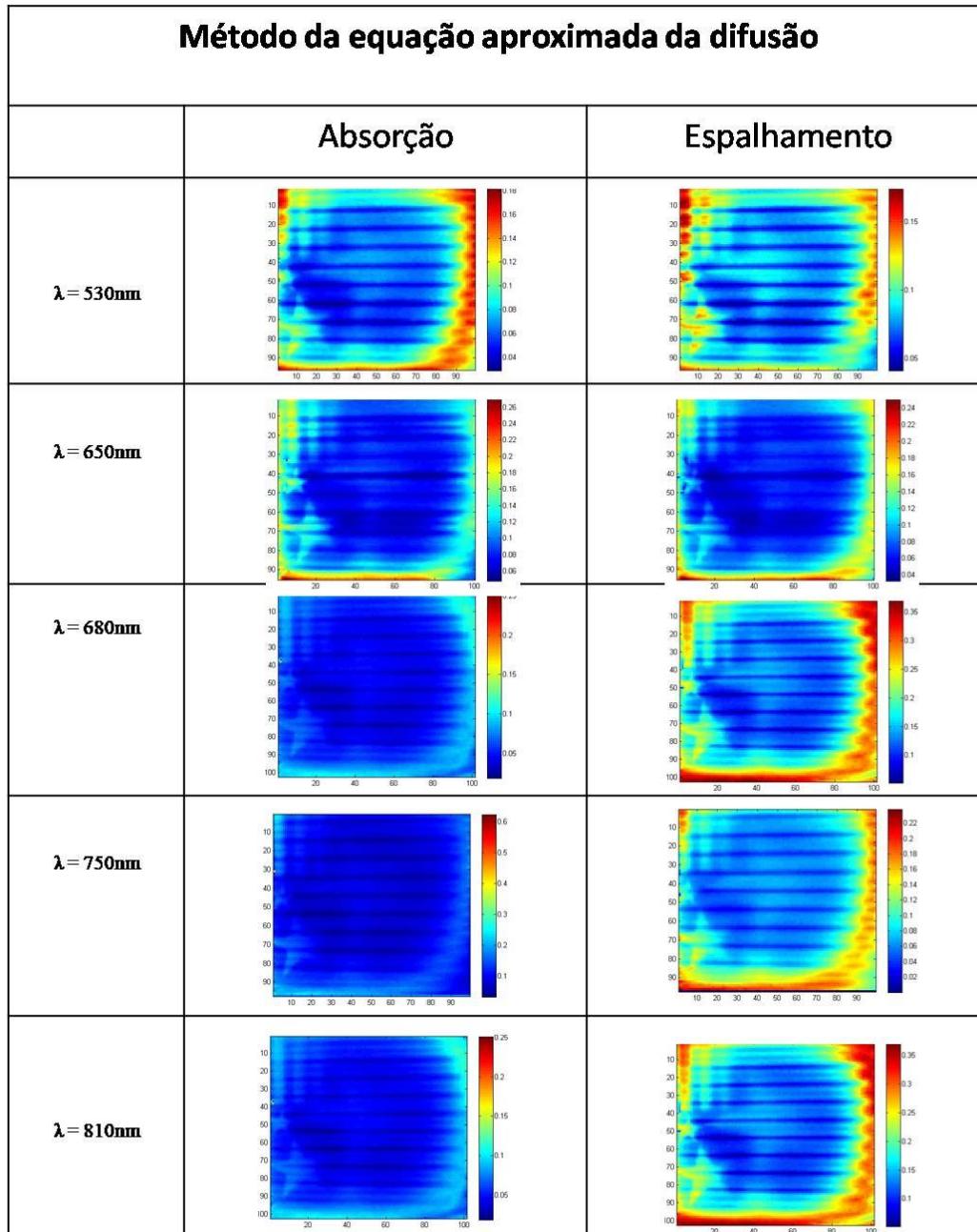


Figura 70: Mapas de absorção e espalhamento do fantoma STAR representados em duas colunas distintas, filtrados em diferentes comprimentos de onda (λ) e processados pelo método da difusão, cujo objeto é detectar o cromóforo zinco ftalocianina (ZnPc).

7. RESULTADOS COM TÉCNICAS COMPLEMENTARES AO SFDI

7.1 Determinação dos índices de refração dos fantomas utilizados

De um modo geral, os fantomas correspondem ao agrupamento de materiais desenvolvidos com o objetivo de fazer equivalência às propriedades de tecidos biológicos. Sendo assim, entre as funções premeditadas para desenvolvimento deles, há o teste de novos diagnósticos, a calibração e a regulação feita anteriormente no que tange à aplicação de novas técnicas clínicas, principalmente no estudo de imagens médicas (SRINIVASAN; KUMAR; SINGH, 2002).

No caso dos tecidos biológicos, estes são estruturas heterogêneas, sendo uma organização de distintos constituintes celulares, além de corresponder a um meio dielétrico, em que o índice de refração (n) de um tecido biológico equivale a uma aproximação ou uma média dos valores dos índices de refração de seus constituintes.

No caso da interação de uma radiação eletromagnética com a superfície do tecido biológico, os eventos de reflexão parcial e refração deverão ocorrer quando há uma diferença entre os índices de refração do tecido e do meio no qual este se encontra. Assim, o índice de refração representa uma importante informação sobre o meio. Ainda, a maioria dos tecidos possui índice de refração na faixa de 1,335 a 1,620 (valor adimensional) para a região da luz visível (TUCHIN, 2016).

Como mencionado em tópicos anteriores, os fantomas são sistemas desenvolvidos para imitar as propriedades de tecidos biológicos, principalmente os parâmetros ópticos que são de extrema importância neste trabalho.

Para a confecção dos fantomas, foi usado como material base o silicone (PDMS – Polidimetilsiloxano). A justificativa para o uso desta substância como uma matriz para adição de novos cromóforos como o zinco ftalocianina (ZnPc) e as nanopartículas de ouro (Au) está no fato de que o PDMS é transparente e possui índice de refração correspondendo a $n = 1,4$. É importante salientar que tecidos biológicos macios possuem índice de refração entre 1,35 a 1,5 (valor adimensional) (BAYS; WAGNIE; ROBERT, 1997).

Nesta tese foram confeccionados três tipos de fantomas em camadas cujas espessuras possuíam 1 mm. Sendo assim, esses mimetizadores são o silicone PDMS (puro), o PDMS com ZnPc e o PDMS com Au. As ilustrações podem ser vistas na figura 71:

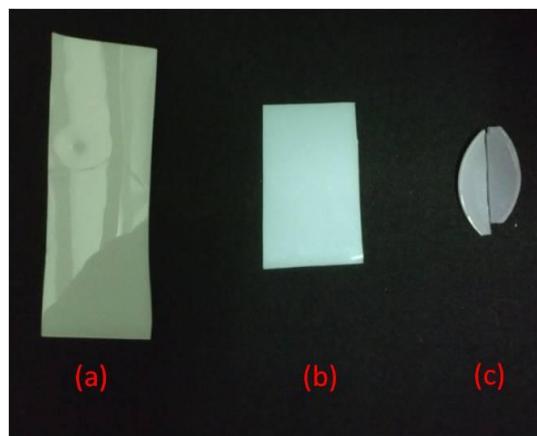


Figura 71: Principais fantomas utilizados neste trabalho: (a) PDMS, (b) PDMS + ZnPc e (c) PDMS + Au. Observação: o fantoma (a) está mais escuro devido à superfície na qual a fotografia foi capturada.

Para determinar o índice de refração de cada camada de fantoma anteriormente mencionado, foi utilizado um aparelho refratômetro digital da marca Atago, modelo RI, cuja faixa de medição para o índice de refração está entre 1,3306 a 1,5284 (valor adimensional) para uma temperatura ambiente que varia entre 10 a $40^{\circ}C$ e que o tempo de mensuração é de três segundos (ATAGO BRASIL, 2018).

As medições foram realizadas primeiramente calibrando o instrumento com a substância líquida Bromonaftaleno, aplicando-a diretamente sobre o prisma do equipamento e, posteriormente, posicionando cada camada de fantoma sobre este mesmo líquido.

Os valores obtidos experimentalmente por meio do refratômetro são mostrados na tabela abaixo:

Tabela 8: Valores dos índices de refração para os fantomas anteriormente mencionados.

Fantoma	Índice de refração (n)
Silicone (PDMS) sem adição de cromóforos	1,43150
Silicone (PDMS) com zinco ftalocianina	1,43140
Silicone (PDMS) como nanopartículas de Au	1,43213

7.2 Medidas realizadas na Esfera Integradora (IS)

Primeiramente, a luz consiste em uma ferramenta de caráter não invasivo que proporciona a possibilidade de investigação de meios turbidos e tecidos biológicos por meio de parâmetros ópticos, como o coeficiente de absorção (μ_a) e o coeficiente de espalhamento reduzido (μ'_s). Assim, é importante considerar que estas variáveis proporcionam informações a respeito da propagação dos fótons no interior da amostra (DI ROCCO et al., 2007).

O coeficiente de absorção (μ_a) está relacionado à concentração de cromóforos na amostra, enquanto que o coeficiente de espalhamento reduzido (μ'_s) revela o tipo e densidade de espalhadores no material analisado. Contudo, estes dois parâmetros agem de forma simultânea no meio turbido, dificultando a interpretação física por meio da refletância difusa capturada. Desta forma, seria interessante quantificar separadamente cada uma destas variáveis (PALMER; RAMANUJAM, 2006).

Para resolver o problema proposto acima, o método que foi empregado neste trabalho é a técnica da esfera integradora simples. Ela consiste em uma câmara esférica e oca contendo uma superfície interna com material de alta refletividade, o que possibilita a distribuição da luz de forma homogeneizada em sua cavidade. Desta forma, quando a amostra é posicionada nas aberturas da esfera, tanto a refletância difusa total quanto a transmitância difusa total são coletadas e posteriormente analisadas por um modelo matemático para obtenção dos parâmetros ópticos (HAMDY et al., 2017).

Neste trabalho, utilizou-se o método *Inverse adding-doubling* (IAD) (PRAHL; VAN GEMERT; WELCH, 1993a), que consiste em um software implementado e disponibilizado por PRAHL (2018). Sendo assim, este algoritmo permite prospectar os parâmetros ópticos μ_a e μ_s .

Por fim, a técnica da esfera integradora foi escolhida pela precisão de seus resultados e a possibilidade de comparar os dados obtidos por ela com os dados adquiridos pela técnica SFDI de uma mesma amostra. Os espectros de absorção e espalhamento podem ser visualizados separadamente em função do comprimento de onda nas figuras das próximas seções da presente pesquisa, bem como a partir das tabelas de confrontação de resultados para cada fantoma que será apresentado.

7.2.1 Fantoma PC10

Com os primeiros resultados utilizando a esfera integradora, foi possível encontrar os coeficientes de absorção e espalhamento reduzido para as camadas C1, C2 e C3 do fantoma PC10 por meio da refletância difusa total e da transmitância.

A figura 72 consiste na relação entre os espectros dos coeficientes de absorção versus o comprimento de onda ($\mu_a \times \lambda$) para as camadas do fantoma PC10 mensurados na região de 400 -100 nm. Neste gráfico é importante ressaltar a presença das fortes bandas de absorção entre 500 a 850 nm, bem como um fraca região em entre 400 a 450nm, algo característico do cromóforo ZnPc (SHARMA et al., 2013). Dessa forma, é perceptível um pico fraco de 910 nm, o qual consiste na fraca absorção da matriz de PDMS.

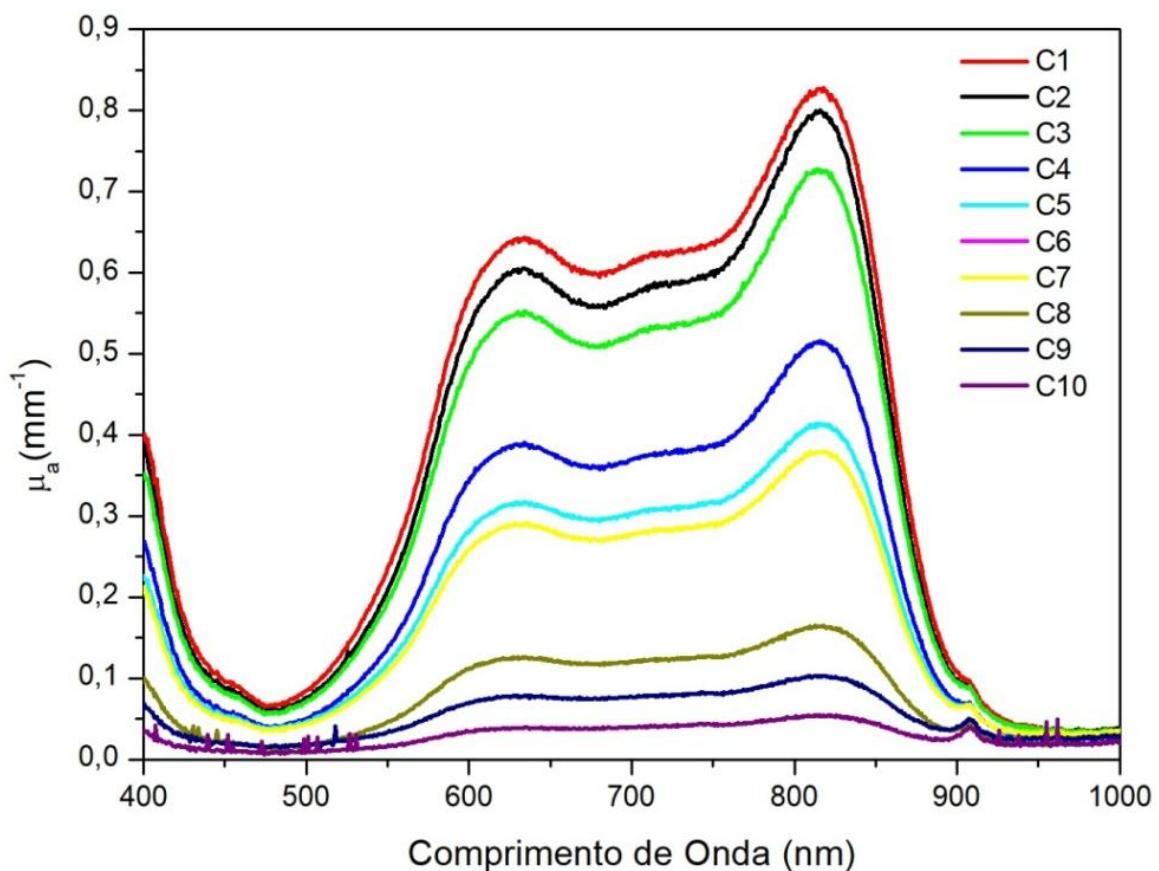


Figura 72: Espectros dos coeficientes de absorção em função do comprimento de onda para as camadas do fantoma PC10 na matriz de PDMS com diferentes concentrações de ZnPc.

Outra informação relevante é a relação entre o coeficiente de espalhamento reduzido e o comprimento de onda ($\mu'_s \times \lambda$), que nos aponta o acréscimo de μ'_s quando o agente absorvedor ZnPc é reduzido nas camadas do fantoma PC10. Sendo assim, essa relação pode estar presente na figura 73.

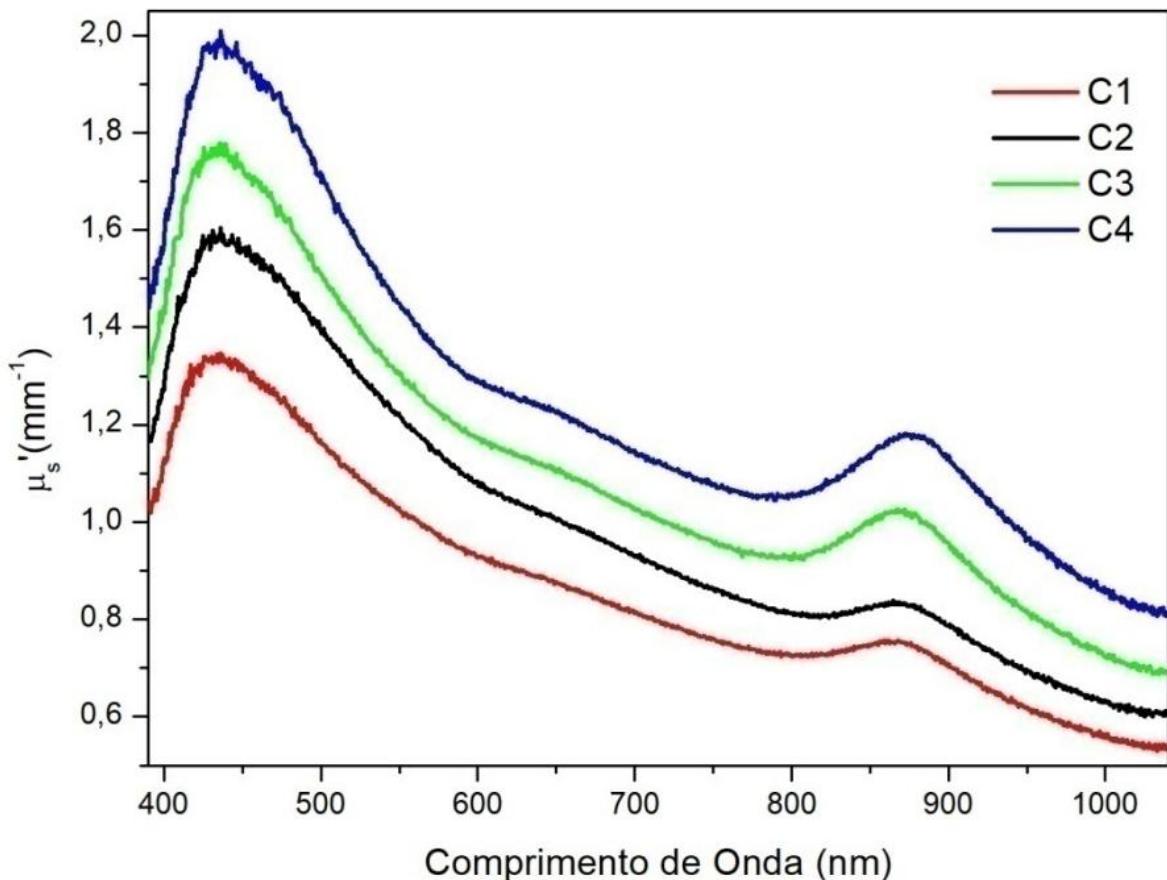


Figura 73: Espectros dos coeficientes de espalhamento reduzido em função do comprimento de onda para as camadas do fantoma PC10.

Uma boa comparação entre os espectros ($\mu_a, \mu'_s \times \lambda$), correspondentes à figura 74, também permite quantificar que os valores do espalhamento são bem maiores do que os dos coeficientes de absorção para o fantoma PC10. Isso ocorre, pois a propagação da luz em meio turbido utiliza a equação aproximada da difusão, o que impõe que $\mu'_s \gg \mu_a$ (DI ROCCO et al., 2007).

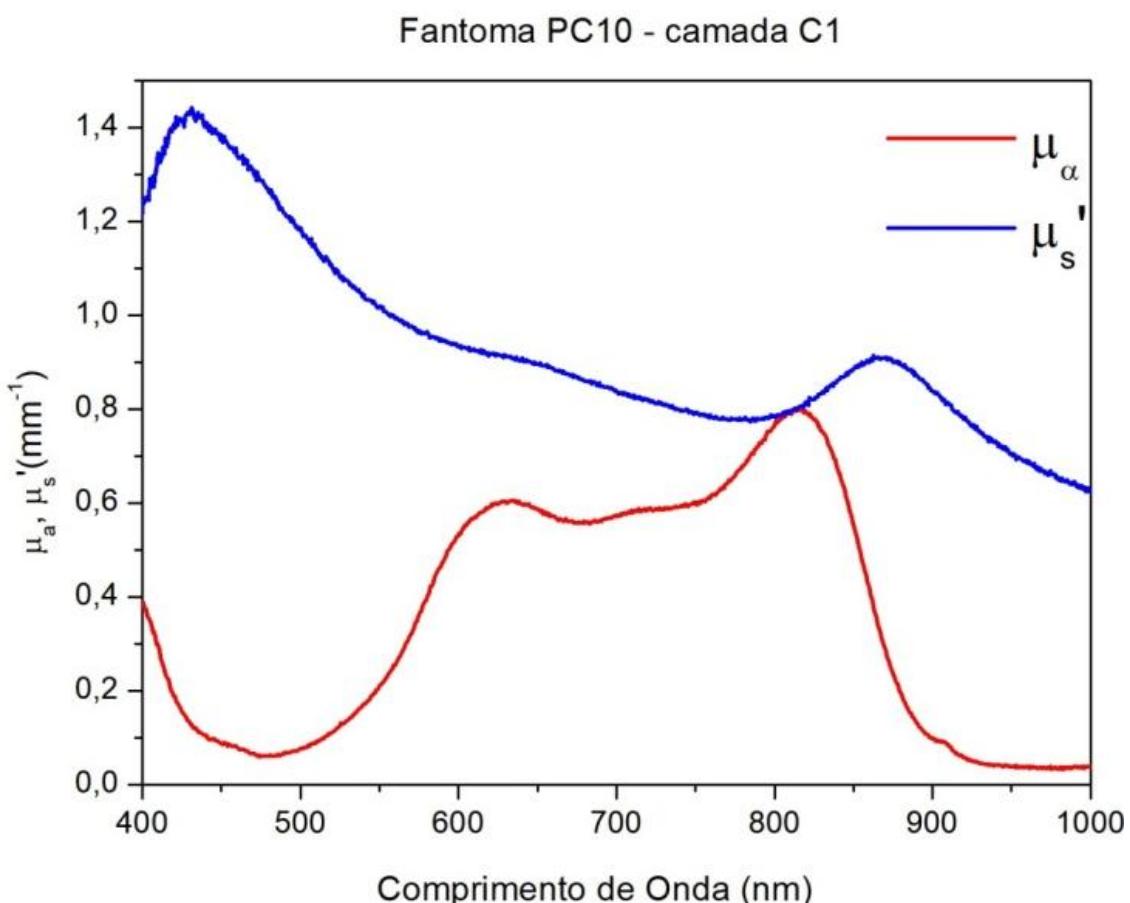


Figura 74: Comparação entre os espectros de absorção e espalhamento do fantoma PC10 na camada C1 obtida a partir da esfera integradora.

Outro resultado relevante levantado nesta pesquisa foi a comparação entre os dados quantificados pela esfera integradora e a técnica SFDI (ver tabela 9). Tal como foi descrito anteriormente, a esfera integradora foi escolhida como um parâmetro de referência devido à precisão dos seus resultados e para assegurar que as informações a respeito das curvas dos coeficientes de absorção (μ_a) e espalhamento reduzido (μ_s') fossem alcançadas pela modulação espacial da luz e, por fim, obtivessem valores idênticos.

Entre os valores mensurados por ambas as técnicas, há uma correspondência tanto para μ_a quanto μ_s' e, não havendo grandes discrepâncias de resultados, isso demonstra que o aparelho desenvolvido para a pesquisa possui condições técnicas de ser utilizado para aplicações clínicas. Entretanto, é necessário que ajustes sejam feitos na parte de programação de análise das imagens para melhora da precisão.

Tabela 9: - Valores de absorção (mm^{-1}) e espalhamento reduzido (mm^{-1}) obtidos pela técnica de SFDI para o fantoma PC10.

Amostra PC10	Comprimento de Onda (λ)	Coeficiente de Absorção (μ_a) Esfera	Coeficiente de Absorção (μ_a) SFDI	Coeficiente de Espalhamento (μ'_s) Esfera	Coeficiente de Espalhamento (μ'_s) SFDI
C1	530 nm	0,1513 mm^{-1}	0,1789 mm^{-1}	1,0741 mm^{-1}	0,5608 mm^{-1}
	650 nm	0,6273 mm^{-1}	0,4646 mm^{-1}	0,8750 mm^{-1}	0,8969 mm^{-1}
	680 nm	0,5996 mm^{-1}	0,3937 mm^{-1}	0,8376 mm^{-1}	0,5192 mm^{-1}
C2	530 nm	0,1393 mm^{-1}	0,1673 mm^{-1}	1,2788 mm^{-1}	0,7073 mm^{-1}
	650 nm	0,5863 mm^{-1}	0,4398 mm^{-1}	1,1068 mm^{-1}	0,9939 mm^{-1}
	680 nm	0,5593 mm^{-1}	0,3798 mm^{-1}	1,0611 mm^{-1}	0,5020 mm^{-1}
C3	530 nm	0,1304 mm^{-1}	0,1446 mm^{-1}	1,3696 mm^{-1}	0,8068 mm^{-1}
	650 nm	0,5349 mm^{-1}	0,4241 mm^{-1}	1,1068 mm^{-1}	0,9441 mm^{-1}
	680 nm	0,5102 mm^{-1}	0,3594 mm^{-1}	1,0605 mm^{-1}	0,5345 mm^{-1}

7.2.2 Fantoma NOV10

De um modo geral, as camadas Au1, Au2, Au3 e Au4 do fantoma NOV10 também foram quantificadas pela esfera integradora para que posteriormente os dados pudessem sofrer comparação com as medidas realizadas pelo equipamento SFDI.

Na figura 75 está representada a relação entre os espectros dos coeficientes de absorção e o comprimento de onda ($\mu_a \times \lambda$) para as camadas do fantoma NOV10 mensurados na região de 450-800 nm. Logo, verificou-se a presença de uma forte região de absorção entre 450-650nm, o que está de acordo com a bibliografia discutida (ABDELHALIM; M. MADY, 2012).

No gráfico ($\mu_a \times \lambda$) pode-se observar também a relação entre a concentração do cromóforo Au e os valores do coeficiente de absorção (μ_a). Quando a concentração de nanopartículas de Au é reduzida de camada para camada (Au1 > Au2 > Au3 > Au4), o espectro de absorção acompanha esta dinâmica sofrendo também um decréscimo.

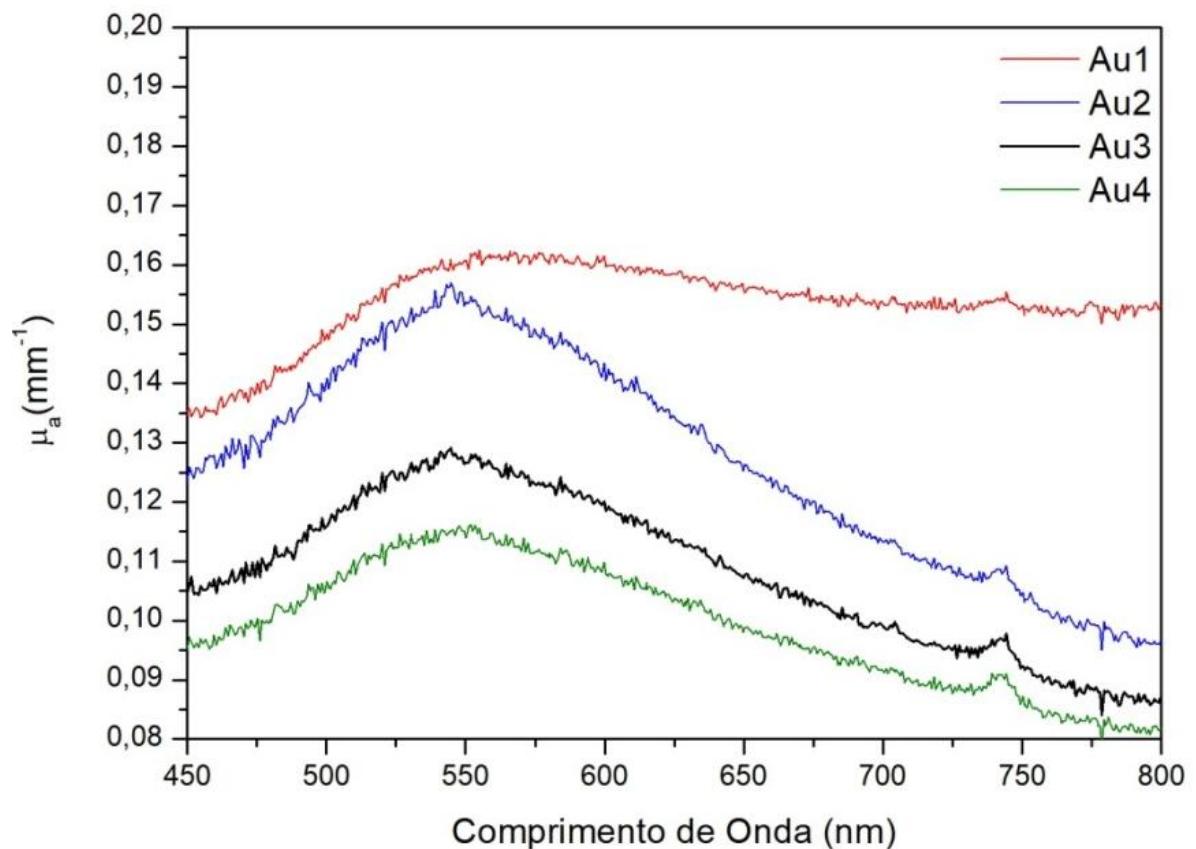


Figura 75: Espectros dos coeficientes de absorção em função do comprimento de onda para as camadas do fantoma NOV10 na matriz de PDMS com diferentes concentrações de Au.

Outro comportamento avaliado é o vínculo do coeficiente de espalhamento reduzido com o comprimento de onda ($\mu'_s \times \lambda$), ele nos mostra o acréscimo do espectro de μ'_s quando é feita uma redução do agente absorvedor Au, uma vez que o espalhamento tende a predominar quando possui maiores quantidades de TiO_2 nas camadas do fantoma NOV10. Esta situação que pode ser visualizada na próxima imagem, que corresponde à figura 76.

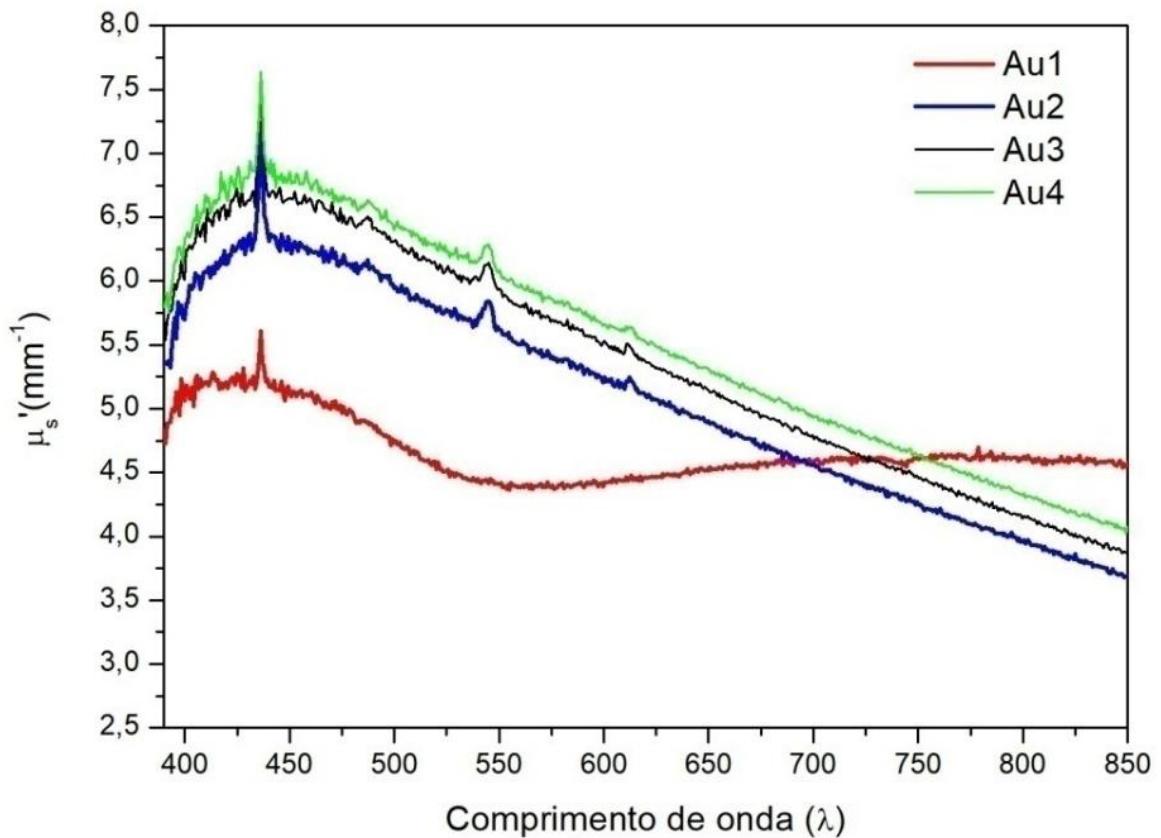


Figura 76: Espectros dos coeficientes de espalhamento reduzido em função do comprimento de onda para as camadas do fantoma NOV10.

Uma comparação relevante é a obtida entre os espectros ($\mu_a, \mu'_s \times \lambda$), e apresentados na figura 77. Sendo assim, essa relação permite afirmar que os valores do espalhamento são bem maiores do que os coeficientes de absorção para o fantoma PC10. Isso pode ser justificado pela quantidade de material espalhador nas camadas analisadas, bem como a propagação da luz em meio turbido utilizando a equação aproximada da difusão que impõe que $\mu'_s \gg \mu_a$ (DI ROCCO et al., 2007).

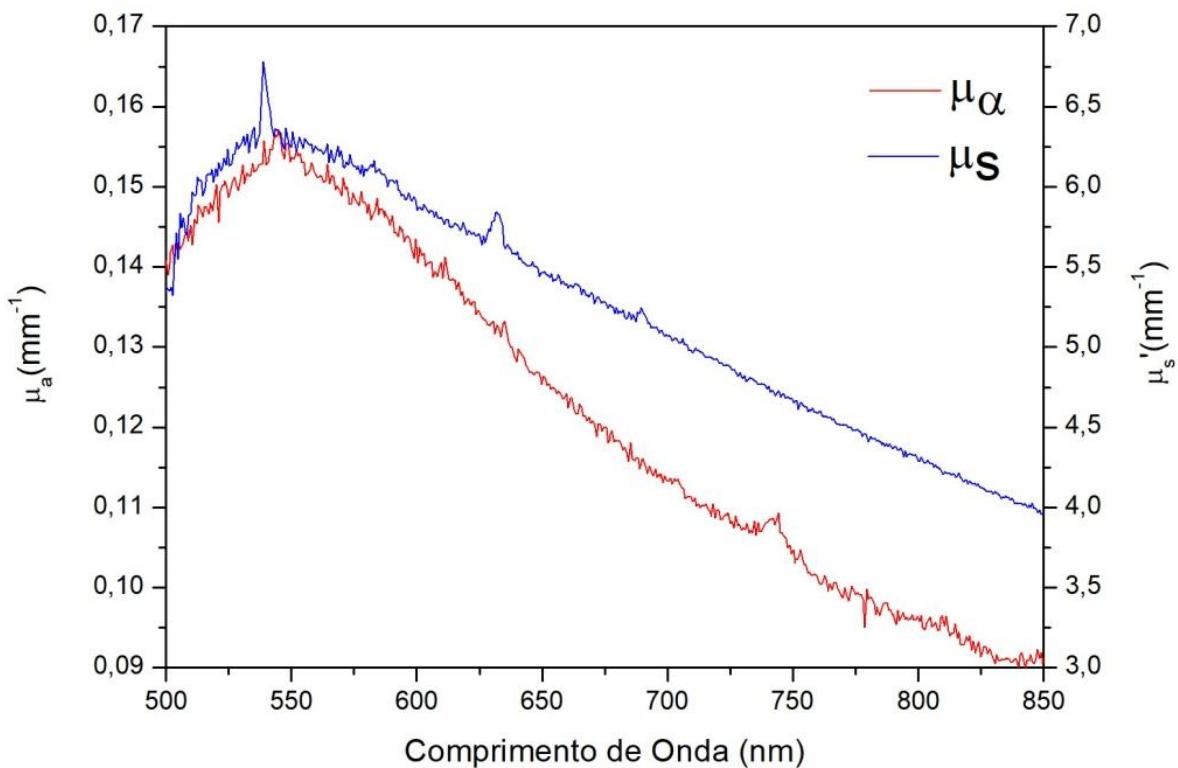


Figura 77: Comparação entre os espectros de absorção e espalhamento do fantoma NOV10 na camada Au2 obtida a partir da esfera integradora.

Tal como foi realizado com o fantoma anterior, houve também a comparação entre os dados quantificados pela esfera integradora e a técnica SFDI (ver tabela 10) para avaliação das camadas do fantoma NOV10. Sendo assim, a esfera integradora foi usada novamente como um parâmetro de referência devido à precisão dos seus resultados e para assegurar que as informações a respeito das curvas dos coeficientes de absorção (μ_a) e espalhamento reduzido (μ'_s) fossem alcançadas pela modulação espacial da luz e obtivessem valores similares.

Os valores mensurados por ambas as técnicas mostraram uma correspondência tanto para μ_a quanto μ'_s . Porém, houve algumas variações em relação ao gráfico que chamaram a atenção. Tal fato pode ser explicado pela baixa concentração de agentes absorvedores, o que torna o equipamento SFDI insensível a esta quantidade de material. Entretanto, para o espalhamento, o aparelho demonstra êxito quando seus resultados são comparados com os da esfera integradora.

Em síntese, o aparelho desenvolvido para a pesquisa na situação do fantoma NOV10 possui condições técnicas de ser utilizado para aplicações clínicas, mas ajustes deverão ser

desenvolvidos na parte de programação de análise das imagens para melhora da precisão para baixas concentrações dos agentes absorvedores.

Tabela 10: Valores de absorção (mm^{-1}) e espalhamento (mm^{-1}) obtidos pela técnica de SFDI para o fantoma NOV10.

Amostra NOV10	Comprimento de Onda (λ)	Coeficiente de Absorção (μ_a) Esfera	Coeficiente de Absorção (μ_a) SFDI	Coeficiente de Espalhamento (μ_s) Esfera	Coeficiente de Espalhamento (μ_s) SFDI
Au1	530 nm	0,1577 mm^{-1}	0,1309 mm^{-1}	4,4827 mm^{-1}	2,2234 mm^{-1}
	650 nm	0,1552 mm^{-1}	0,2003 mm^{-1}	4,5415 mm^{-1}	4,6705 mm^{-1}
	680 nm	0,1540 mm^{-1}	0,2044 mm^{-1}	4,5715 mm^{-1}	5,0117 mm^{-1}
Au2	530 nm	0,1527 mm^{-1}	0,0683 mm^{-1}	5,6966 mm^{-1}	2,8012 mm^{-1}
	650 nm	0,1264 mm^{-1}	0,1477 mm^{-1}	4,8861 mm^{-1}	5,1174 mm^{-1}
	680 nm	0,1183 mm^{-1}	0,1491 mm^{-1}	4,6842 mm^{-1}	5,3004 mm^{-1}
Au3	530 nm	0,1267 mm^{-1}	0,6333 mm^{-1}	6,017 mm^{-1}	3,1652 mm^{-1}
	650 nm	0,1077 mm^{-1}	0,1127 mm^{-1}	5,132 mm^{-1}	5,5814 mm^{-1}
	680 nm	0,1019 mm^{-1}	0,1165 mm^{-1}	4,9194 mm^{-1}	5,7688 mm^{-1}
Au4	530 nm	0,1146 mm^{-1}	0,0486 mm^{-1}	6,1699 mm^{-1}	3,4458 mm^{-1}
	650 nm	0,0988 mm^{-1}	0,0947 mm^{-1}	5,3004 mm^{-1}	5,8878 mm^{-1}
	680 nm	0,0948 mm^{-1}	0,0987 mm^{-1}	5,0721 mm^{-1}	6,0261 mm^{-1}

8. APLICAÇÃO DA TÉCNICA SFDI NA ÁREA MÉDICA

A primeira participação em trabalhos clínicos do primeiro equipamento desenvolvido foi realizada no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HCU-UFU), no sábado, dia 1º de dezembro de 2018, fazendo parte da campanha nacional de prevenção ao Câncer da Pele com o tema nacional “Se exponha, mas não se queime”. A campanha pretendia conscientizar e educar as pessoas sobre os riscos do câncer da pele decorrentes da exposição excessiva ao sol sem proteção e a importância de fazer o diagnóstico precoce. Ainda, como resultado, havia o objetivo de encaminhar os pacientes para biópsias e cirurgias caso fosse necessário. A seguir, a figura 78 mostra o banner de divulgação da campanha.



Figura 78: Banner de divulgação da campanha nacional de prevenção ao Câncer da Pele em Uberlândia-MG.

Neste evento, dermatologistas, residentes, alunos de cursos de pós-graduação em Física da UFU e de iniciação científica e técnicos administrativos prestaram atendimento à população no Ambulatório Central do HCU-UFU, localizado na Avenida Pará, 1720 – Campus Umuarama, das 8h às 15h. Nesta edição da campanha na cidade, mais de 1.700 pessoas foram examinadas e saíram com encaminhamento no mesmo momento em que foram atendidas.

Um dia antes do evento, o primeiro equipamento da técnica SFDI foi transportado até o ambulatório do HC, testado e calibrado diversas vezes. Durante o dia da campanha, as medidas foram realizadas em pacientes indicados pelos residentes da dermatologia com supervisão da Dr(a). Renata Scarabucci Janones Kobata (CRM 35196-MG) e a obtenção das imagens foram chefiadas pelo professor Dr. Adamo Ferreira Gomes do Monte. Além disso, a pesquisa foi amparada pelo protocolo nº: 85363417.9.0000.5152, cujo título do trabalho era “Diagnóstico óptico de tumores cutâneos não-melanoma por meio da técnica não invasiva de imagem de luz modulada no domínio da frequência espacial”.

Com o propósito de diagnosticar o câncer de pele precocemente, é necessário saber que este consiste no maior órgão do corpo, responsável pela troca de calor e água com o ambiente. Além disso, é um componente do corpo que é encarregado de proteger os órgãos internos contra bactérias e de captar e enviar para o cérebro informações sobre calor, frio, dor e tato. Assim, a pele tem três camadas: a epiderme (a camada mais externa), a derme e o tecido subcutâneo, a parte mais profunda do órgão (TUCHIN, 2015).

Dessa forma, a epiderme é bem fina e, nestas três camadas há a camada superior, formada por células chamadas queratinócitos, a camada média e a camada mais interna, formada, então, pelas chamadas células basais. Estas dão origem aos queratinócitos, também chamadas de células escamosas, as quais produzem queratina e impermeabiliza a pele. Já os melanócitos, estas são células que produzem melanina, sendo o pigmento marrom que dá cor à pele e cuja função é proteger as camadas mais profundas da pele contra os efeitos nocivos da radiação solar.

A derme é a camada intermediária da pele, sendo mais espessa que a epiderme e que abriga as glândulas sebáceas, folículos pilosos (as raízes dos pêlos), vasos sanguíneos e nervos.

Por fim, o tecido subcutâneo, às vezes chamado de hipoderme, é responsável pela retenção do calor do corpo e funciona como um amortecedor, absorvendo impacto e protegendo os órgãos internos contra choques e pancadas (YUN; KWOK, 2017).

Dessa forma, há dois tipos básicos de câncer de pele: os não-melanoma, geralmente das células basais ou das escamosas, e os melanomas, que têm origem nos melanócitos, as células produtoras de melanina.

O câncer não-melanoma representa 95% do total dos casos de câncer de pele e os dois tipos mais comuns são o basocelular (carcinoma de células basais) e o espinocelular (carcinoma de células escamosas).

O carcinoma basocelular ou de células basais tem origem nas células basais da epiderme e representam 75% dos casos de câncer de pele. Sendo assim, trata-se de um tipo de câncer mais comum em pessoas de meia-idade e idosos e geralmente aparecem em áreas muito expostas ao sol, como o rosto e o pescoço.

O carcinoma espinocelular ou de células escamosas tem origem na camada mais externa da epiderme e responde por 20% do total de casos. Geralmente aparece no rosto, orelha, lábios, pescoço e no dorso da mão. Ainda, a doença pode surgir de cicatrizes antigas ou de feridas crônicas da pele em qualquer parte do corpo e até nos órgãos genitais (LISTER; WRIGHT; CHAPPELL, 2012).

Utilizando o equipamento de SFDI, as imagens e as medidas coletadas dos pacientes foram autorizadas por eles diante da assinatura de um termo de responsabilidade e de autorização. Parte das medidas realizadas no dia da campanha pode ser vistas nas figuras 79, 80, 81 e 82 adiante que contém imagens de pacientes do sexo masculino e feminino recebendo a projeção modulada em diferentes localizações do corpo com suspeita de ação tumoral local. Contudo, devido à grande quantidade de dados obtidos nesta pesquisa, serão apresentados apenas os resultados mais relevantes.

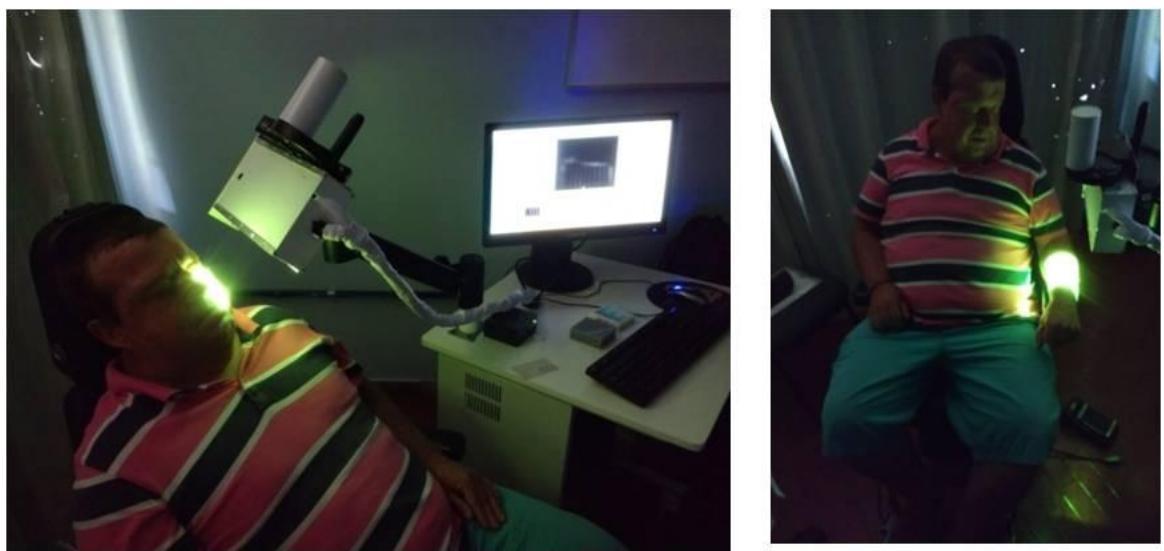


Figura 79: Paciente do sexo masculino de 52 anos, encaminhado com suspeita de carcinoma basocelular (CBC) no lado esquerdo da face e na região esquerda do antebraço.



Figura 80: Paciente do sexo masculino de 61 anos, encaminhado com suspeita de um melanoma em diversas regiões do corpo, especificamente na região do peito e das costas.

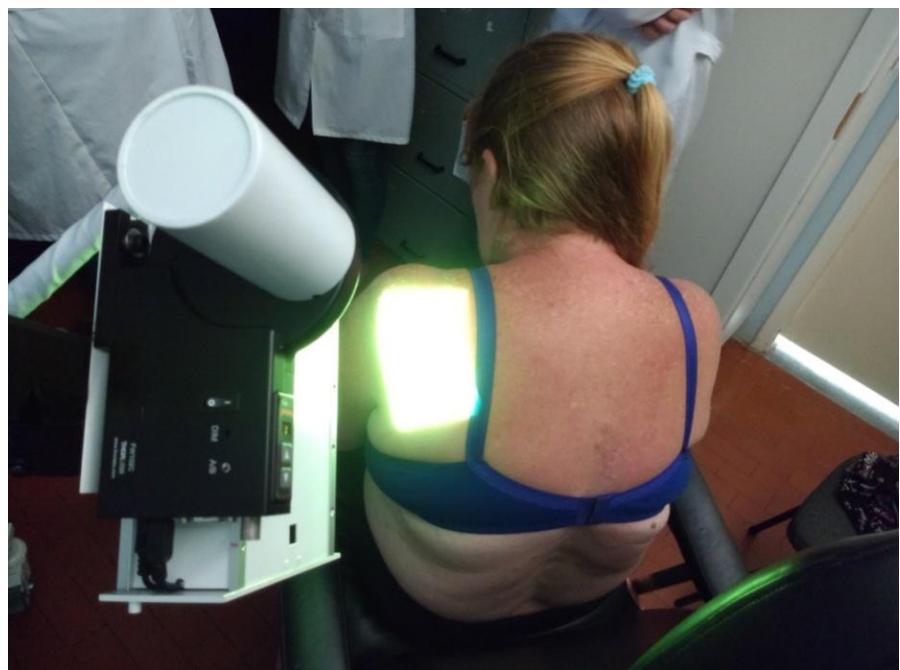


Figura 81: Paciente do sexo feminino de 46 anos, encaminhada com suspeita de carcinoma espinocelular (CEC) no lado esquerdo da região superior das costas.

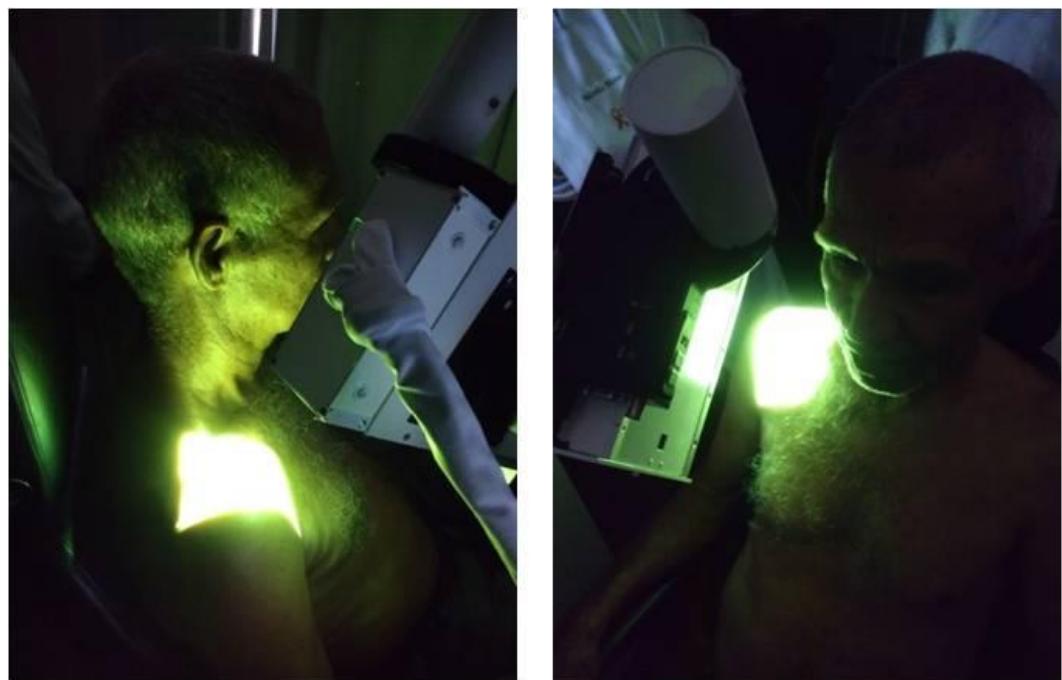


Figura 82: Paciente do sexo masculino de 68 anos, encaminhado com suspeita de carcinoma basocelular (CBC) no lado direito na região do ombro.



Figura 83: Paciente do sexo feminino de 41 anos, encaminhada com suspeita de um câncer não-melanoma na região esquerda da face.

Uma vez que o equipamento de SFDI realizou medidas em diversos fantomas, especialmente no PC10 e no NOV10, gerando mapas de absorção e espalhamento e estimando as propriedades ópticas destes mimetizadores a partir da reflexão difusa da luz, houve a oportunidade de realizar medidas *in vivo* no dia campanha de prevenção ao câncer de pele.

Uma das pessoas encaminhadas pelo grupo da Dermatologia do HC-UFU foi um paciente idoso, com idade de 82 anos, cuja identidade não será revelada por questões éticas, de forma que foi denominado ‘Paciente X’ nesta pesquisa. Sendo assim, seu quadro clínico foi apresentado como operado de um carcinoma basocelular para minimizar os efeitos locais.

Desta operação restou-se uma cicatriz na lateral esquerda do pescoço que pode ser vista na figura 84 em (a) e em ângulo mais aproximado em (b). Entretanto, segundo os residentes, há novos indícios de que um novo carcinoma esteja se desenvolvendo no local. Sendo assim, a equipe de dermatologia optou pelo uso do SFDI para obter os mapas de cromóforos e conhecer mais sobre a região interna antes de decidir utilizar um método invasivo.



Figura 84: (a) Foto lateral do pescoço do Paciente X contendo marcas de uma cirurgia de pele e (b) Região de interesse a ser analisada pelo SFDI onde há uma provável protuberância de aspecto cancerígeno.

Sendo assim, para estimar as propriedades ópticas da região escolhida do pescoço do Paciente X, realizou-se os mesmos procedimentos feitos com os fantomas trabalhados nesta tese. Dessa forma, houve, então, a projeção sequencial de cinco frequências espaciais (0, 0.05, 0.1, 0.2 e 0.4 mm^{-1}) com cada padrão de modulação espacial projetados três vezes em fases distintas (0° , 120° e 240°). Após a modulação, ocorreu a demodulação, em que os valores de μ_a e μ'_s do tecido biológico analisado são estimados usando o método aproximado da equação da difusão (Diff).

Para tecidos biológicos, o programa MATLAB proporcionou mapas de cromóforos biológicos devido à seleção de seis filtros de interferência passa-banda revestidos para transmissão de pico a 530, 650, 680, 750, 780 e 810 nm. Estes comprimentos de onda (λ) representam os cromóforos oxihemoglobina, deoxihemoglobina, água, lipídeos e melanina,

que são alguns dos principais absorvedores no tecido biológico dentro da janela óptica terapêutica (500-1000nm) (TANZI; LUPTON; ALSTER, 2003).

Quando se trata de tecidos biológicos, em particular a pele, a absorção é ocasionada pela água na região do NIR e as macromoléculas (proteínas e pigmentos) que absorvem na faixa espectral do UV e VIS e a concentração destes biocromóforos permitem indicar a presença de uma região com tecido não saudável.

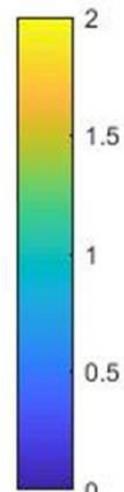
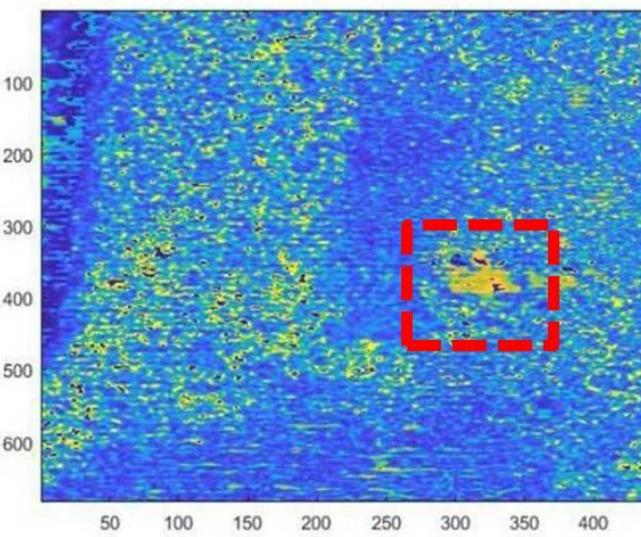
No caso de um câncer, pode ser verificada uma grande concentração de vasos sanguíneos na região interna do tumor devido à alta necessidade de metabolismo por parte das células cancerígenas, o que aponta que os tecidos submetidos a um câncer contêm regiões altamente vascularizadas com a presença de oxihemoglobina.

Outro caminho para detecção precoce de um câncer consiste em mudanças na dimensão e na estrutura dos biocromóforos, uma vez que as propriedades de espalhamento de um tecido sadio serão distintas de um tecido contendo um processo cancerígeno (BACKMAN et al., 2000).

Sendo assim, os mapas de cromóforos foram obtidos do Paciente X seguindo um padrão em que para cada comprimento de onda (λ) têm-se duas imagens obtidas: uma na parte superior referente ao coeficiente de absorção (μ_a) e outra na parte inferior correspondente ao coeficiente de espalhamento reduzido (μ'_s). A região tracejada em vermelho nesses mapas refere-se ao local onde os mapas de cromóforos detectaram algo diferente. Estes, por sua vez, podem ser visualizados a seguir nas figuras 85 (mapa da oxihemoglobina), 86 (mapa da deoxihemoglobina), 87 (mapa da água), 88 (mapa dos lípidos) e 89 (mapa da melanina):

$\lambda = 530 \text{ nm} - \text{Cromóforo Oxihemoglobina}$

**Mapa
de
Absorção**



**Mapa
de
Espalhamento**

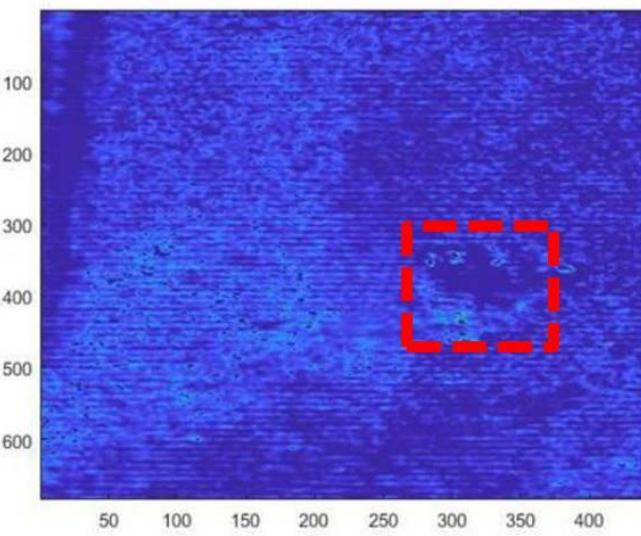
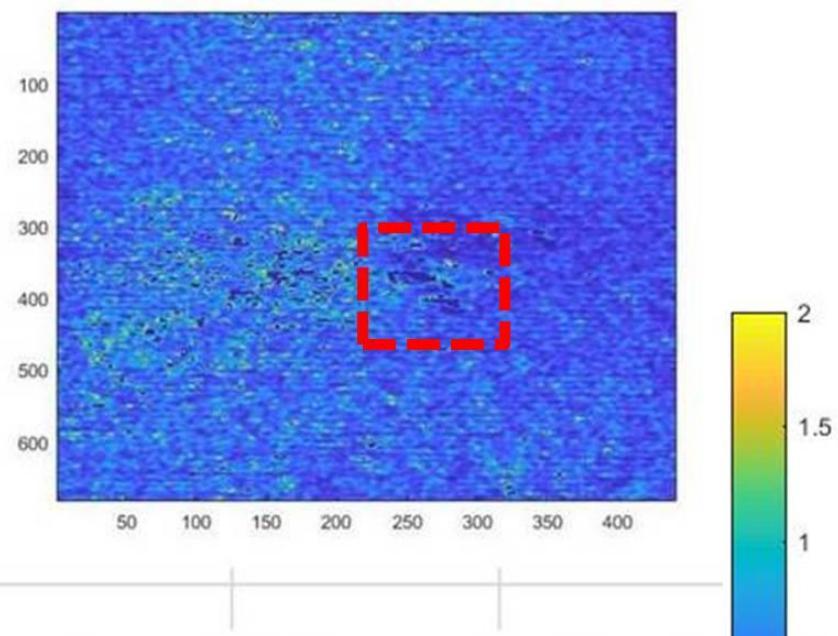


Figura 85: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo oxihemoglobina.

$\lambda = 650 \text{ nm} - \underline{\text{Cromóforo Deoxihemoglobina}}$

**Mapa
de
Absorção**



**Mapa
de
Espalhamento**

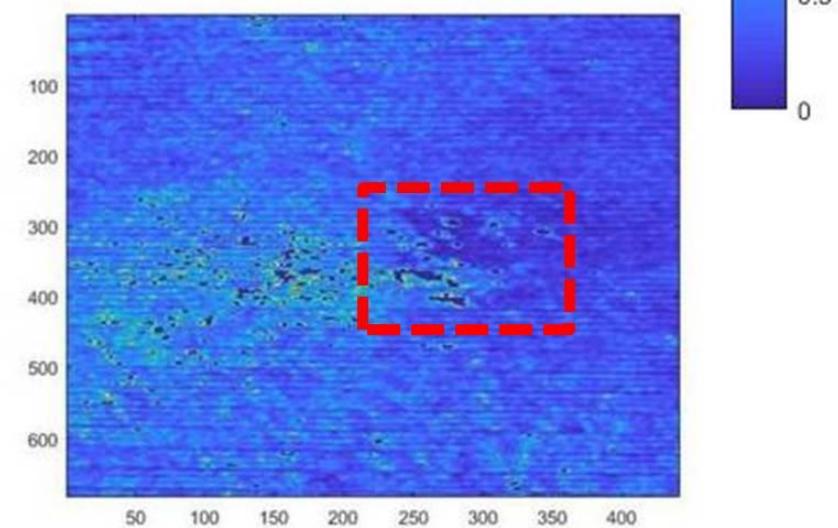
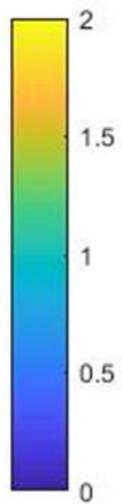
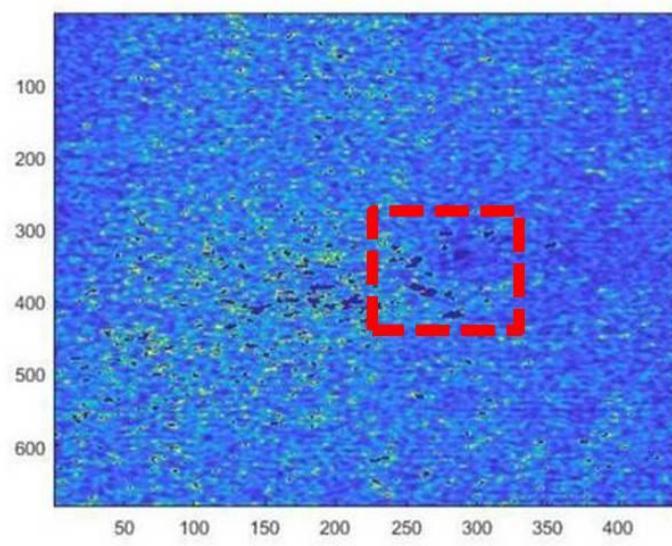


Figura 86: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo deoxihemoglobina.

$\lambda = 680 \text{ nm}$ - Cromóforo Água

**Mapa
de
Absorção**



**Mapa
de
Espalhamento**

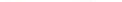
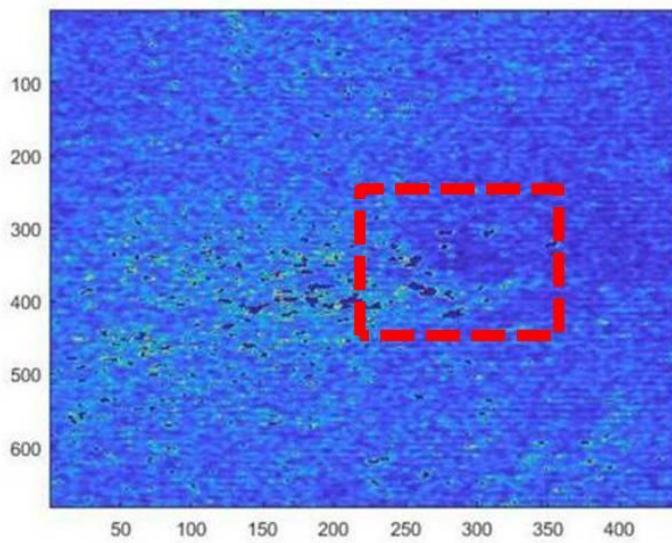
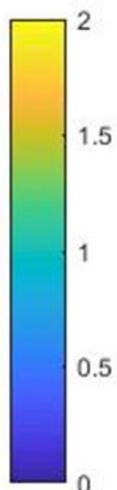
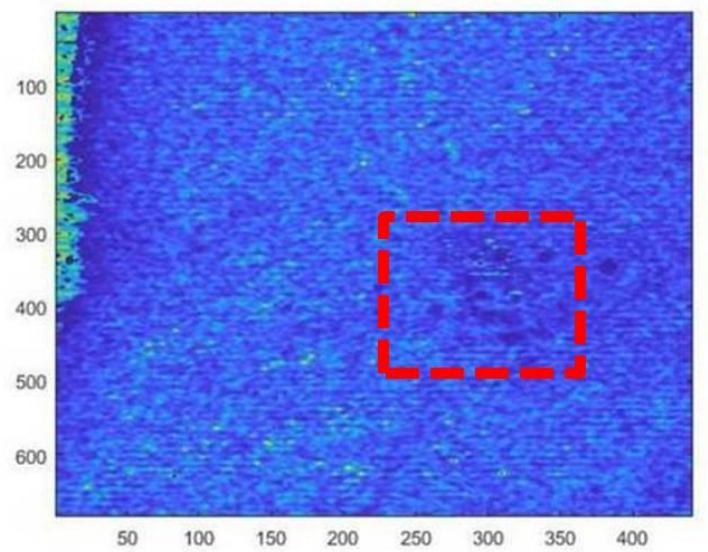


Figura 87: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo água (H_2O).

$\lambda = 750 \text{ nm}$ - Cromóforo Lipídeo

**Mapa
de
Absorção**



**Mapa
de
Espalhamento**

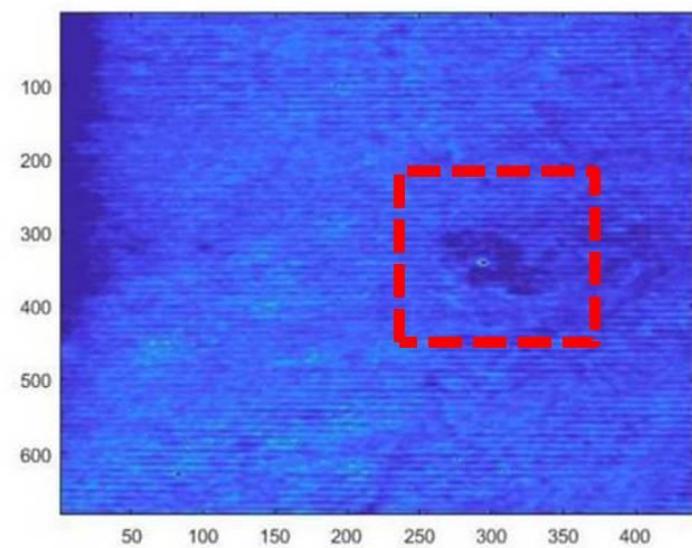


Figura 88: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo lipídeo.

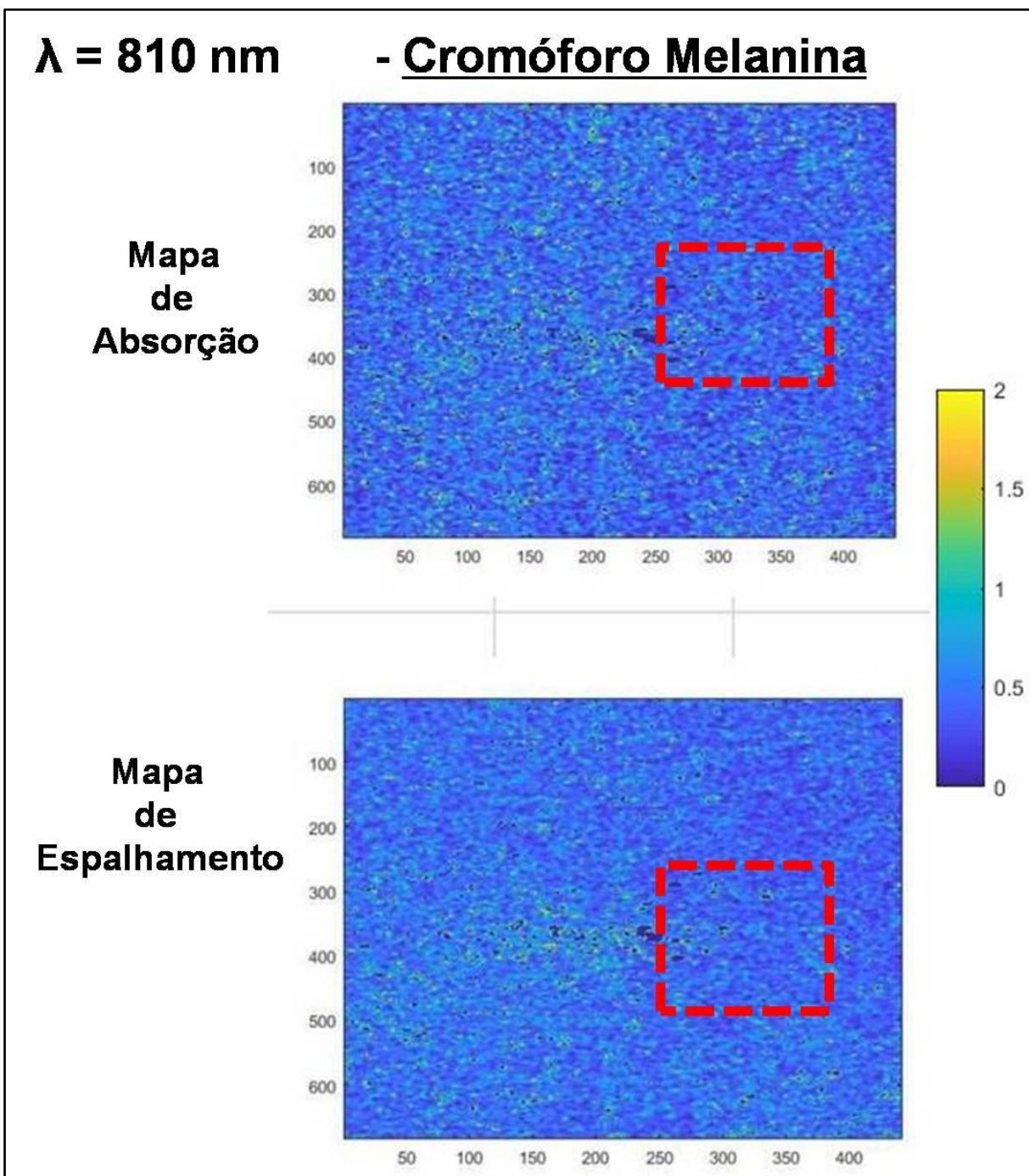


Figura 89: Mapas de absorção e espalhamento para o cromóforo melanina.

Com todos os mapas de cromóforos obtidos do Paciente X, uma estrutura de forma arredondada chamou a atenção, pois estava contida em todas as imagens, sendo selecionada para facilitar a visualização por uma área retangular vermelha.

Os mapas correspondentes ao cromóforo oxihemoglobina na figura 85 foram os que mais chamaram atenção, pelo fato da intensidade de absorção dentro da região selecionada ser

alta, bem como também ocorre em algumas partes da região externa. Uma preocupação existente reside no fato de que o Paciente X já passou por um quadro de câncer de pele e apresenta uma pré-disposição. Sendo assim, segundo a literatura, o aumento na concentração de hemoglobina está diretamente relacionada ao aparecimento de angiogênese, que é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de existentes e, logo, o ponto de partida para o desenvolvimento de um câncer (MEHNATI et al., 2016).

No segundo mapa que abrange o cromóforo deoxihemoglobina, presente na figura 86, a imagem dentro da região selecionada em vermelho que delimita a protuberância arredondada possui baixa intensidade de espalhamento. Entretanto, o efeito inverso acontece ao seu redor. De acordo com GARCIA-URIBE et al. (2011), em regiões cujo tecido contém atividade tumoral, há um significativo aumento do espalhamento no local, o que mostra um crescimento no tamanho e na largura dos centros espalhadores que correspondem ao aumento de células cancerígenas, afetando a reflexão difusa da luz na superfície da pele.

Observando o terceiro mapa na figura 87, pertencente ao cromóforo da água, na imagem de absorção tanto a área selecionada quanto os locais externos possuem uma intensidade razoável. A partir disso, o fato é que este cromóforo concentra-se em grande quantidade no organismo humano e dominam o espectro de absorção. Entretanto, trabalha-se na região da janela óptica terapêutica (500-1000 nm), onde os efeitos de absorção deste cromóforo são reduzidos (JACQUES, 2013).

Nos mapas dos cromóforos lipídeo e melanina correspondente às figuras 88 e 89, neste caso nada de apreciável pode ser observado, nem no mapa de absorção e nem no de espalhamento de ambos, visto a limitação do equipamento SFDI acima de 750 nm. Contudo, a protuberância de formato arredondado ainda é perceptível.

Por fim, as imagens obtidas pelo SFDI não necessariamente afirmam que existe um carcinoma basocelular presente no organismo do Paciente X, de modo que isso somente poderá ser confirmado pelo médico dermatologista. Reitera-se ainda que a técnica de luz difusa tem por função uma investigação não-invasiva, diferentemente da biopsia, sendo o SFDI uma ferramenta para o “auxílio” antes de um procedimento invasivo. Novamente, deve-se ponderar que uma análise mais severa apenas será realizada por um médico especialista, cabendo a esta pesquisa mostrar a funcionalidade do equipamento de SFDI.

9. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nesta pesquisa foram desenvolvidos dois equipamentos pilotos que utilizaram a modalidade de imagem no domínio da frequência espacial (SFDI), uma metodologia que foi desenvolvida no Beckman Laser Institute (Califórnia-USA). A técnica consiste em um procedimento de não-contato de campo largo que utiliza a projeção de padrões senoidais de luz monocromática em um fantoma ou tecido biológico, de modo que a reflexão difusa é capturada por uma câmera CCD.

Por meio das medidas de campo largo, é possível recuperar as propriedades ópticas da amostra, como o coeficiente de absorção (μ_a) e espalhamento reduzido (μ'_s), separá-las e quantificá-las em função do comprimento de onda (λ). Sendo assim, a concentração de biocromóforos, tal como a oxihemoglobina, a deoxihemoglobina, a água, os lipídeos e a melanina, também pode ser estimada por meio de medidas de reflexão na superfície, bem como investigar profundidades de até 5mm na pele.

Logo, foram analisados três fantomas de PDMS contendo camadas produzidas a partir de diferentes materiais, e os materiais absorvedores, como as nanopartículas de zinco ftalocianina (ZnPc) e ouro (Au), as quais tiveram disposições diferentes no interior da matriz. Cada fantoma foi confeccionado na tentativa de reproduzir o máximo possível as propriedades ópticas de um tecido biológico, em particular, a pele humana.

O equipamento SFDI obteve êxito em produzir os mapas de absorção e espalhamento para diferentes comprimentos de onda (λ) e frequências espaciais (f_x), realizando medidas de não-contato e campo largo. Além dos mapas, também foram gerados curvas dos coeficientes de absorção (μ_a) e de espalhamento reduzido (μ'_s) em função do comprimento de onda (λ), que permitem quantificar os valores.

Para assegurar que os valores emitidos pelo equipamento de SFDI estivessem adequados, utilizou-se como parâmetro de referência de uma esfera integradora simples cuja análise dos resultados de refletância difusa e transmitância foi realizada pelo método *inverse adding-doubling*. Constatou-se que não houve discrepância por parte dos resultados emitidos pela técnica SFDI quando confrontados com a esfera integradora, assegurando que o equipamento estava em condições de mensurar tecidos *in vivo*.

Como etapa final desta pesquisa, o equipamento de SFDI foi submetido à pré- testes clínicos durante o dia de campanha de combate ao câncer de pele no Hospital das Clínicas em

Uberlândia–MG. Dessa forma, os resultados alcançados demonstram a viabilidade de produzir mapas de absorção e espalhamento reduzido para biocromóforos de um tecido biológico, além da capacidade de gerar informações das propriedades ópticas em profundidade específicas a partir da captura da reflexão difusa da superfície sem haver contato com o paciente, o que torna este equipamento um método não-invasivo de diagnóstico e de produção de imagem médica.

Entretanto, deve-se ressaltar que o equipamento ainda necessita de melhoramentos, principalmente na parte de programação e do código utilizado para produção e análise de imagens, a fim de contornar a dificuldade em obter mapas de cores acima do comprimento de onda (λ) de 750 nm. As perspectivas para novas aplicações da técnica SFDI em futuros trabalhos incluem:

1. A produção de novos fantomas com detalhes ainda mais próximos das propriedades ópticas de tecidos biológicos;
2. A variação de outras frequências espaciais, trabalhando no regime sub-difusivo para permitir um aumento da penetração da luz na amostra e possibilitar a produção de imagens das camadas mais profundas em tecidos biológicos;
3. A redução no tempo de captura da reflexão difusa na superfície da amostra;
4. A produção de mapas de cromóforos em três dimensões (3-D), obtendo o maior número de detalhes possíveis em relação à amostra.

10. ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE A PESQUISA

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

applied optics

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

A. F. G. MONTE,*  A. F. REIS,  L. B. CRUZ JUNIOR,  AND A. ANTUNES

Laboratório de Imagens Funcionais, Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG 38400-902, Brazil
 *Corresponding author: adamo@ufu.br

Received 19 March 2018; revised 3 May 2018; accepted 7 May 2018; posted 8 May 2018 (Doc. ID 326388); published 10 July 2018

Journal of Luminescence 204 (2018) 349–353

 Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Luminescence

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jlumin



Evidence of resonant energy transfer between CdSe/ZnS quantum dots and Neutral Red dye molecules



A.F. Reis*, A.F.G. Monte, G.A. Alves¹

Functional Imaging Laboratory, Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil

Tu2C.3.pdf Latin America Optics and Photonics Conference © OSA 2018

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

Laboratório de Imagens Funcionais, Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG 38400 Brazil
 adamo@ufu.br

Abstract: The design of protocols for an effective in-vivo therapeutic outcome relies on the knowledge of the nanoparticle localization and concentration. In order to create a methodology based on optical absorption maps gold nanoparticles were embedded in tissue simulating media. Silicone-based phantoms were used to mimic the scattering and absorption properties of tissues and determine the accuracy of spatial frequency domain imaging to localize and quantify the nanoparticles with a 3D perspective. © 2018 The Author(s)

OCIS codes: (110.6960); (120.5820); (240.6380); (300.1030); (290.1990)

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHALIM, M. A. K.; M. MADY, M. Physical Properties of Different Gold Nanoparticles: Ultraviolet-Visible and Fluorescence Measurements. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, v. 3, n. 3, 2012. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000133>
- ADAMS, F. et al. Soft 3D-Printed Phantom of the Human Kidney with Collecting System. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 45, n. 4, p. 963–972, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1757-5>
- AKARÇAY, H. G. et al. Determining the optical properties of a gelatin-TiO₂ phantom at 780 nm. *Biomedical Optics Express*, v. 3, n. 3, p. 418, 2012. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.000418>
- ATAGO BRASIL. Refratômetro Digital de Bolso Série PAL-RI. Disponível em: <<http://loja.atago-brasil.com/refratometro-digital-de-bolso-pal/pal-ri>>. Acesso em: 22 nov. 2018.
- BACKMAN, V. et al. Detection of preinvasive cancer cells. *Nature*, v. 406, n. 6791, p. 35–36, 2000. <https://doi.org/10.1038/35017638>
- BALLRICK, J. W. et al. Image distortion and spatial resolution of a commercially available cone-beam computed tomography machine. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 134, n. 4, p. 573–582, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2007.11.025>
- BAYS, R.; WAGNIE, G.; ROBERT, D. Three-Dimensional Optical Phantom and Its Application in Photodynamic Therapy. [s.l: s.n.]. v. 234
- BÖCKLIN, C. Modelling light propagation in Tissue. [s.l.] ETH ZURICH, 2014.
- BODENSCHATZ, N. et al. Detecting structural information of scatterers using spatial frequency domain imaging. *Journal of Biomedical Optics*, v. 20, n. 11, p. 116006, 2015. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.11.116006>
- BOREMAN, G. D. Modulation Transfer Function in Optical and Eletro-Optical Systems. In:

- SPIE - The International Society for Optical Engineering. [s.l: s.n.]. p. 370.
- CAI, W. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnology, Science and Applications*, v. Volume 1, p. 17–32, 2008. <https://doi.org/10.2147/NSA.S3788>
- CUCCIA, D. et al. Quantitation and mapping of tissue optical properties using modulated imaging. *Journal of ...*, v. 14, n. 2, p. 1–31, 2009. <https://doi.org/10.11117/1.3088140>
- CUCCIA, D. J. et al. Modulated imaging: quantitative analysis and tomography of turbid media in the spatial-frequency domain. *Optics Letters*, v. 30, n. 11, p. 1354–1356, 2005. <https://doi.org/10.1364/OL.30.001354>
- CUCCIA, D. J. et al. Quantitation and mapping of tissue optical properties using modulated imaging. *Journal of Biomedical Optics*, v. 14, n. 2, p. 24012, 2009. <https://doi.org/10.11117/1.3088140>
- DI ROCCO, H. O. et al. Determination of optical properties of slices of turbid media by diffuse CW laser light scattering profilometry. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, v. 105, n. 1, p. 68–83, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2006.10.003>
- DIMOFTE, A.; FINLAY, J. C.; ZHU, T. C. A method for determination of the absorption and scattering properties interstitially in turbid media. *Physics in Medicine and Biology*, v. 50, n. 10, p. 2291–2311, 2005. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/50/10/008>
- 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/10.1007/BF00592960>
- DONTU, S. P. Tissue optics applied in medical diagnosis. *Applied Mathematics and Physics*, v. 69, n. 2, p. 61–72, 2007.
- DYKMAN, L. A.; KHLEBTSOV, N. G. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta naturae*, v.3, n.2, p.34–55, 2011. <https://doi.org/10.32607/20758251-2011-3-2-34-56>
- FANTINI, S. FRANCESCHINI, M. A. Frequency-domain techniques for tissue spectroscopy and imaging. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, v. 1, p. 1–52, 2002.

FISHKIN, J. B.; GRATTON, E. Propagation of photon-density waves in strongly scattering media containing an absorbing semi-infinite plane bounded by a straight edge. *Journal of the Optical Society of America A*, v.10, n.1, p.127, 1993. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.10.000127>

FOSTER, K. R.; SCHWAN, H. P. Dielectric properties of tissues. [s.l.] CRC press Boca Raton, FL, 1995. v. 2

FUKUTOMI, D.; ISHII, K.; AWAZU, K. Determination of the scattering coefficient of biological tissue considering the wavelength and absorption dependence of the anisotropy factor. *Optical Review*, v. 23, n. 2, p. 291–298, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10043-015-0161-y>

GARCIA-URIBE, A. et al. In-vivo characterization of optical properties of pigmented skin lesions including melanoma using oblique incidence diffuse reflectance spectrometry. *Journal of biomedical optics*, v. 16, n. February, p. 1–3, 2011. <https://doi.org/10.1117/1.3536509>

GATINEL, D. PSF - POINT SPREAD FUNCTION. Disponível em: <<https://www.gatinel.com/en/recherche-formation/acuite-visuelle-definition/psf/>>. Acesso em: 3 out. 2018.

GIOUX, S. et al. First-in-human pilot study of a spatial frequency domain oxygenation imaging system. *Journal of Biomedical Optics*, v. 16, n. 8, p. 86015, 2011. <https://doi.org/10.1117/1.3614566>

GRAFF, C. G.; SIDKY, E. Y. Compressive sensing in medical imaging. *Applied Optics*, v. 54, n. 8, p. C23, 2015. <https://doi.org/10.1364/AO.54.000C23>

GÜRSES, A. et al. Dyes and Pigments. [s.l.] Springer; 1st ed. 2016 edition (May 5, 2016, 2016. v. 103. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33892-7_1

HAMDY, O. et al. Estimation of optical parameters and fluence rate distribution in biological tissues via a single integrating sphere optical setup. *Optik*, v. 140, p. 1004–1009, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2017.05.039>

HEAD, S. C. T. P. IS200 Series Integrating Spheres. Disponível em:

<<https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=IS200>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

HEGGIE, J. C. P.; LIDDELL, N. A.; MAHER, K. P. *Applied imaging technology*. 3rd ed. ed. [s.l.] Melbourne : St. Vincent's Hospital, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Monitoramento das ações de controle do câncer de pele. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/informativos/informativo-deteccao-precoce-no-3-2016>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

INSTRUMENTS, N. O que é o LabVIEW? Disponível em: <<http://www.ni.com/newsletter/51141/pt/>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

ISHIMARU, A. Diffusion of light in turbid material. *Applied optics*, v. 28, n. 12, p. 2210–5, 1989. <https://doi.org/10.1364/AO.28.002210>

JACQUES, S. L. ; PRAHL, S. A. Definition and units of scattering coefficient μ_s . Disponível em: <<https://omlc.org/classroom/ece532/class3/musdefinition.html>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

JACQUES, S. Optical absorption of melanin. Disponível em: <<https://omlc.org/spectra/melanin/extcoeff.html>>. Acesso em: 22 maio. 2016.

JACQUES, S. L. Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine and Biology*, v. 58, n. 11, p. R37–R61, 2013. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/11/R37>

JACQUES, S. L.; PRAHL, S. A. Absorption spectra for biological tissues. Disponível em: <<https://omlc.org/classroom/ece532/class3/muaspectra.html>>. Acesso em: 15 abr. 2016.

KIM, H.; CHANG, J. H. Increased light penetration due to ultrasound-induced air bubbles in optical scattering media. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16444-9>

LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy*. [s.l: s.n.].

LAMOUCHE, G. et al. Review of tissue simulating phantoms with controllable optical, mechanical and structural properties for use in optical coherence tomography. *Biomedical*

- optics express, v. 3, n. 6, p. 1381–1398, 2012. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.001381>
- LEANDRO, F. Z. et al. Evaluation of theranostic nanocarriers for near-infrared imaging and photodynamic therapy on human prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 154, p. 341–349, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.042>
- LIN, A. J. et al. Visible spatial frequency domain imaging with a digital light microprojector. *Journal of Biomedical Optics*, v. 18, n. 9, p. 96007, 2013. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.9.096007>
- LISTER, T.; WRIGHT, P. A.; CHAPPELL, P. H. Optical properties of human skin. *Journal of Biomedical Optics*, v. 17, n. 9, p. 909011, 2012. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.9.090901>
- LORENZO, J. R. *Principles of Diffuse Light Propagation: Light Propagation in Tissues with Applications in Biology and Medicine*, by Jorge Ripoll Lorenzo. [s.l.] Word Scientific Publishing Co.Pte.Ltd, 2013. v. 54. <https://doi.org/10.1142/9789814293860>
- MACHADO, K. D. *Teoria do Eletromagnetismo*, vol. 1. volume III ed. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2000. v. 1
- MANSON, E. N. et al. Comparison of Modulation Transfer Function Measurements for Assessing the Performance of Imaging Systems . *Medical Physics International Journal*, v. 5, n. 2, p. 188–191, 2017.
- MARTINI, S.; CORVAGLIA, L. Splanchnic NIRS monitoring in neonatal care: rationale, current applications and future perspectives. *Journal of Perinatology*, v. 38, n. 5, p. 431–443, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41372-018-0075-1>
- MAZHAR, A. et al. Implementation of an LED based Clinical Spatial Frequency Domain Imaging System. *Proceedings of SPIE*, v. 8254, n. FEBRUARY, p. 82540A–82540A–7, 2012. <https://doi.org/10.1117/12.909813>
- MEHNATI, P. et al. Assessing Absorption Coefficient of Hemoglobin in the Breast Phantom Using Near-Infrared Spectroscopy. *Iranian Radiological Society*, v. 13, n. 4, 2016. <https://doi.org/10.5812/iranjradiol.31581>
- MOFFITT, T.; CHEN, Y.-C.; PRAHL, S. A. Preparation and characterization of polyurethane

optical phantoms. *Journal of biomedical optics*, v. 11, n. 4, p. 41103, 2006. <https://doi.org/10.1117/1.2240972>

MONTE, A. F. G. et al. Preparation and quantitative characterization of polydimethylsiloxane optical phantoms with zinc-phthalocyanine dye absorbers. *Applied Optics*, v. 20, n. 160, 2018. <https://doi.org/10.1364/AO.57.005865>

MOSHELL, N. A. *The Science of Photomedicine*. [s.l: s.n.]. v. 249. <https://doi.org/10.1001/jama.1983.03330460071042>

NACHABÉ, R. Diagnosis with near infrared spectroscopy during minimally invasive procedures. [s.l: s.n.].

NADEAU, K. P. et al. Quantitative assessment of renal arterial occlusion in a porcine model using spatial frequency domain imaging. *Optics Letters*, v. 38, n. 18, p. 3566, 2013. <https://doi.org/10.1364/OL.38.003566>

NANDY, S. et al. Application of spatial frequency domain imaging for characterizing wide field tissue optical heterogeneity. *Biomedical Optics Congress 2016*, v. 2016, n. Dmd, p. 10–12, 2016. <https://doi.org/10.1364/CANCER.2016.JM3A.1>

NEUKAM, F. W.; STELZLE, F. Laser tumor treatment in oral and maxillofacial surgery. *Physics Procedia*, v. 5, n. PART 1, p. 91–100, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2010.08.125>

NIEMZ, M. H. *Laser-Tissue Interactions : Fundamentals and Applications*. 3rd Editio ed. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2007. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-72192-5>

NUNES, S. M. T.; SGUILHA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 2, p. 273–284, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000200016>

O'SULLIVAN, T. D. et al. Diffuse optical imaging using spatially and temporally modulated light. *Journal of Biomedical Optics*, 2012. Disponível em: <<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.17.7.071311>>

<https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.7.071311>

PALMER, G. M.; RAMANUJAM, N. Monte Carlo-based inverse model for calculating tissue optical properties. Part I: Theory and validation on synthetic phantoms. *Applied optics*, v. 45, n. 5, p. 1062–71, 2006. <https://doi.org/10.1364/AO.45.001062>

POGUE, B. W.; PATTERSON, M. S. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *Journal of Biomedical Optics*, v. 11, n. 4, p. 41102-41102–16, 2006. <https://doi.org/10.1117/1.2335429>

PRAHL, S. Everything I think you should know about Inverse Adding-Doubling. Disponível em: <<http://omlc.ogi.edu/software/iad/>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

PRAHL, S. A.; VAN GEMERT, M. J. C.; WELCH, A. J. Determining the optical properties of turbid media by using the adding–doubling method. *Applied Optics*, v. 32, n. 4, p. 559, 1993. <https://doi.org/10.1364/AO.32.000559>

PRAHL, S. A.; VAN GEMERT, M. J. C.; WELCH, A. J. Determining the optical properties of turbid media by using the adding–doubling method. *Applied Optics*, v. 32, n. 4, p. 559, 1993. <https://doi.org/10.1364/AO.32.000559>

PRASAD, P. N. *Introduction to Biophotonics*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. <https://doi.org/10.1002/0471465380>

PRIMOT, J.; CHAMBON, M. Modulation transfer function assessment for sampled imaging systems: effect of intensity variations in periodic thin-line targets. *Applied optics*, v. 36, n. 29, p. 7307–7314, 1997. <https://doi.org/10.1364/AO.36.007307>

PROFIO, A. E. Light Transport in Tissue. *Applied Optics*, v. 28, n. 12, 1988. <https://doi.org/10.1364/AO.28.002216>

RAGHAVENDRA, R. et al. Diagnostics And Therapeutic Application of Gold Nanoparticles. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, n. February, 2014.

REIF, R.; A'AMAR, O.; BIGIO, I. J. Analytical model of light reflectance for extraction of the optical properties in small volumes of turbid media. *Applied Optics*, v. 46, n. 29, p. 7317, 2007. <https://doi.org/10.1364/AO.46.007317>

REIS, A. F.; MONTE, A. F. G.; ALVES, G. A. Evidence of resonant energy transfer between CdSe/ZnS quantum dots and Neutral Red dye molecules. *Journal of Luminescence*, v. 204, n. August, p. 349–353, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.08.023>

RETROPERITONEAIS, T. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 64, n. 1, p. 119–120, 2018. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2018v64n1.115>

ROY, T. et al. Point spread function of the optical needle super-oscillatory lens. *Applied Physics Letters*, v. 104, n. 23, p. 1–5, 2014. <https://doi.org/10.1063/1.4882246>

SANDELL, J. L.; ZHU, T. C. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. *Journal of Biophotonics*, v. 4, n. 11–12, p. 773–787, 2011. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100062>

SANNINO, A. TISSUE MIMICKING PHANTOM. Disponível em: <<http://bioslab.unile.it/phantom.html>>.

SHARMA, D. et al. Active and passive control of zinc phthalocyanine photodynamics. *Faraday Discussions*, v. 163, n. July 2015, p. 433, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3fd20156b>

SKOOG, D. A. . et al. Fundamentos de Química Analítica. Tradução d ed. São Paulo-SP: Editora Thomson, 2008.

SPRING, K. .; DAVIDSON, M. . . Modulation Transfer Function. Disponível em: <<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/modulation-transfer-function>>. Acesso em: 8 out. 2018.

SRINIVASAN, R.; KUMAR, D.; SINGH, M. OPTICAL TISSUE-EQUIVALENT PHANTOMS FOR MEDICAL IMAGING. v. 15, n. 2, p. 42–47, 2002.

STACK, J. Best of Edmund Optics™ Application Notes. Barrington, NJ: [s.n.]. Disponível em: <[https://perswww.kuleuven.be/~u0004696/visie/bestofeoappnotes2004\[1\].pdf](https://perswww.kuleuven.be/~u0004696/visie/bestofeoappnotes2004[1].pdf)>.

SVAASAND, L. O. et al. Reflectance measurements of layered media with diffuse photon-density waves: A potential tool for evaluating deep burns and subcutaneous lesions. *Physics in Medicine and Biology*, v. 44, n. 3, p. 801–813, 1999. <https://doi.org/10.1088/0031->

9155/44/3/020

TANZI, E. L.; LUPTON, J. R.; ALSTER, T. S. Lasers in dermatology: Four decades of progress. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 49, n. 1, p. 1–31, 2003. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.582>

TARVAINEN, T.; VAUHKONEN, M.; ARRIDGE, S. R. Modeling photon migration in tissues with the coupled radiative transfer equation and diffusion approximation. *Journal of the Optical Society of America*, p. 49–51, 2006. <https://doi.org/10.1364/BIO.2006.SH49>

TUCHIN, V. Tissue Optics and Photonics: Light-Tissue Interaction II. In: *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. [s.l: s.n.]. v. 2p. 30201. <https://doi.org/10.18287/JBPE16.02.030201>

TUCHIN, V. V. Tissue Optics and Photonics: Biological Tissue Structures. In: *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. [s.l: s.n.]. v. 1p. 3–21. <https://doi.org/10.18287/JBPE-2015-1-1-3>

UENO, L. T.; MACHADO, A. E. H.; MACHADO, F. B. C. Theoretical studies of zinc phthalocyanine monomer, dimer and trimer forms. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 899, n. 1–3, p. 71–78, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2008.12.013>

UMAPATHY, T.; PREMKISHORE, K.; MITHESH, D. Oral and General Findings: Management of Prader-Willi Syndrome. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*, v. 1, n. 25, p. 30–34, 2013. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10011-1335>

VO-DINH, T. Biomedical Photonics. p. 1787, 2003. <https://doi.org/10.1201/9780203008997>

VO-DINH, T.; MASTERS, B. R. Biomedical Photonics Handbook. *Journal of Biomedical Optics*, 2004. <https://doi.org/10.1201/9780203008997>

WANG, L. V; LIANG, G. Absorption distribution of an optical beam focused into a turbid medium. *Applied Optics*, v. 38, n. 22, p. 4951, 1999. <https://doi.org/10.1364/AO.38.004951>

WELCH, A. J.; VAN GEMERT, M. J. C. Optical-thermal response of laser-irradiated tissue. 2. ed. [s.l.] Springer Netherlands, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-8831-4>

WINSLOW, T. Estágios do melanoma. Disponível em: <<https://gbm.org.br/o-melanoma/#1497020078871-d159fe25-1c68>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

YUN, S. H.; KWOK, S. J. J. Light in diagnosis, therapy and surgery. *Nature Biomedical Engineering*, v. 1, n. 1, p. 8, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41551-016-0008>

Z. HUANG, H. XU, A. D. M. ET AL. Measurement of the Penetration Depth in Biological Tissue for Different Optical. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 22, n. 4, p. 1095–1100, 2018.

ZHANG, X. et al. Measuring the modulation transfer function of image capture devices: what do the numbers really mean? p. 829307, 2012. <https://doi.org/10.1111/12.912989>

ZUBAREV, A. Y.; ISKAKOVA, L. Y.; ABU-BAKR, A. F. Magnetic hyperthermia in solid magnetic colloids. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, v. 467, p. 59–66, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2016.10.045>

12. ANEXO

a) Transformando imagens da reflexão em dados (convert_HC1_data.m)

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

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

color = {'810','780', '750', '680', '650', '530'};
s_freq = {'0','50','100','200','400'}; % x0.001/mm
    % Melhorar o programa para fazer a leitura das frequências 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 = 1:6 % wavelengths {810, 780, 750, 680, 650, 532}
    for j = 1:5 % spatial frequencies{0, 50, 100, 200, 400}
        for k = 1:3 % phases {0, 120, 240}
            temp = imread([dir_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 '_parameters.txt'];
save(dir_HC1_data, 'img_size', 'int_time', '-ascii', '-tabs');
fclose(fid);

```

b) Script para obter os mapas de absorção e espalhamento da amostra (test_script_for_HC1.m)

```

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

% data processing parameters
process.method = 'diff'; % processing method --> 'lut', 'diff', 'mc'
    % if 'diff' is selected, specify which 2 spatial frequencies are to be used
LUTfreqsidx=[1 5]; % specify by index of frequency e.g. 1st and 5th freq...
    if strcmp(process.method,'lut')
        binsize=1;
    else

```

```
    binsize=4; % bin pixels to speed up fitting for optical properties (e.g. "4" bins
4x4 pixels)
```

```
end
```

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

```
system_type = 'HC1'; % system type: HC1
```

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

```
%file_filter=strrep(mfilename('fullpath'),mfilename,'RawSFDIData/*.*');
% Save Name
savefile = 'Canal01lut';
cd(strrep(mfilename('fullpath'),mfilename,""));
%-----
```

% PROCESSING FLOW

```
%%
```

```
% Load Tissue Data: other options: predefined 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: predefined 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

M1stackplot(cal_reflectance); %visualize calibrated reflectance data - Figure 1 is here
[cal_roi, ~]=selectroi(cal_reflectance,'Fig.2 - Select one rectangular ROI');

%%

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

[op_fit_maps] = LUTfitops(cal_roi(:,:,:LUTfreqsidx),wv,freqs(LUTfreqsidx),n_sample);
else

%[ave_op]=ave_fit_ops(cal_roi(:,:,:freq.used),wv,freqs(freq.used),n_sample,process.method,
%binsize);
[op_fit_maps,
ave_op]=fit_ops(cal_roi(:,:,:freq.used),wv,freqs(freq.used),n_sample,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 3")
[spec_roi,spec_roi_std,av_chrom,rect]=opticalspectra(op_fit_maps, chrom_map, cal_roi, wv,
binsize);

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