



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Mariana Palmela Manco

Sistema *Time-Gated* de  
Tomografia de Projeção Ótica

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Física,  
ramo de Instrumentação, orientada pelo Professor Doutor António  
Miguel Lino Santos Morgado e apresentada ao Departamento de  
Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de  
Coimbra

Setembro 2022

*Esta página foi deixada em branco.*



1 2



9 0

FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Mariana Palmela Manco

# Sistema *Time-Gated* de Tomografia de Projeção Ótica

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Física, ramo de Instrumentação, orientada pelo Professor Doutor António Miguel Lino Santos Morgado e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Setembro 2022

*Esta página foi deixada em branco.*

## Agradecimentos

# Abstract

Optical Projection Tomography (OPT) is a tomographic technique that involves optical microscopy and appears as a solution for the acquisition of high resolution images from optically transparent mesoscopic samples.

The application of the *Time-Gated* acquisition technique to the OPT system requires that the fluorescence or phosphorescence photons emitted by the sample are acquired in successions of temporal windows with delays relative to the light pulse used for excitation. This type of acquisition allows the measurement of fluorescence and phosphorescence lifetimes through algorithms such as Rapid Lifetime Determination (RLD).

The project developed consisted in the implementation of a *Time-Gated* OOPT system for morphological and functional analysis of various samples. Morphological information is obtained using white-light illumination. Functional information relies on fluorescence or phosphorescence processes.

The evaluation of the system was carried out by measuring parameters such as the field of view, by verifying the proper control of the exposure time and by assessing the accuracy in the measurement of decay lifetimes. The measured FOV was 4,048 by 3,084 mm. The relative error of the measurement did not exceed 3%. The system was tested using phantoms. Unfortunately, it was not possible to test the system on biologic samples.

The implemented system is functional and allowed to obtain images using the transmission mode of the OPT technique. It was not possible to test the emission mode. It was demonstrated that the system can measure accurately decay lifetimes in the range of microseconds, proving its ability to measure phosphorescence lifetimes in functional imaging applications.

**Keywords:** *Optical Projection Tomography, Time-Gated Detection, Time-Resolved Luminescence, Image Reconstruction.*



# Resumo

A Tomografia de Projeção Ótica (OPT) é uma técnica tomográfica que envolve microscopia ótica e surge como solução para a aquisição de imagens de elevada resolução a partir de amostras mesoscópicas óticamente transparentes. Esta técnica de aquisição permite a medição de tempos de vida de fluorescência e fosforescência utilizando algoritmos como o *Rapid Lifetime Determination (RLD)*.

A curva de decaimento exponencial resulta das propriedades físicas dos fenômenos de fluorescência e fosforescência. Assim, através de algoritmos como o *Rapid Lifetime Determination*, é possível obter tempos de vida de fluorescência a partir da curva acima mencionada.

O projeto desenvolvido consistiu na implementação de um sistema de Tomografia de Projeção Ótica *Time-Gated* para análise morfológica e funcional de várias amostras. A informação morfológica é obtida usando luz branca. A informação funcional depende de processos de fluorescência ou fosforescência.

A avaliação do sistema foi realizada medindo parâmetros como o campo de visão, verificando o controle adequado do tempo de exposição e avaliando a precisão na medição dos tempos de vida de decaimento. O FOV medido foi de 4.048 por 3.084 mm. O erro relativo da medição não ultrapassou 3%. O sistema foi testado usando fantasmas. Infelizmente, não foi possível testar o sistema em amostras biológicas.

O sistema implementado é funcional e permitiu obter imagens utilizando o modo transmissão da técnica de OPT. Não foi possível testar o modo de emissão. Foi demonstrado que o sistema consegue medir, com precisão, os tempos de vida de decaimento na ordem dos microssegundos, provando a sua capacidade de medir tempos de vida de fosforescência em aplicações de imagem funcional.

**Palavras-chave:** Tomografia de Projeção Ótica, Detecção *Time-Gated*, Luminescência Resolvida no Tempo, Reconstrução de Imagem.



# Lista de Abreviaturas

|             |   |
|-------------|---|
| <b>AC</b>   | Alternating Current (Corrente Alternada)                            |
| <b>BP</b>   | BackProjection (Retroprojeção)                                      |
| <b>CCD</b>  | Charged-Couple Device (Dispositivo de carga-acoplada)               |
| <b>DC</b>   | Direct Current (Corrente Direta)                                    |
| <b>ETL</b>  | Electrically Tunable Lens (Lente Eletricamente Ajustável)           |
| <b>FBP</b>  | Filtered BackProjection (Retroprojeção Filtrada)                    |
| <b>FOV</b>  | Field Of View (Campo de Visão)                                      |
| <b>GOI</b>  | Gated Optical Intensifier   |
| <b>IL</b>   | Intralípido   |
| <b>LED</b>  | Light-Emitting Diode (Diodo Emissor de Luz)                         |
| <b>MCP</b>  | Microchannel Plate (Placa de Microcanais)                           |
| <b>MTF</b>  | Modulation Transfer Function (Função de Transferência de Modulação) |
| <b>nm</b>   | Nanómetros  |
| <b>ns</b>   | Nanossegundos   |
| <b>OPT</b>  | Optical Projection Tomography (Tomografia de Projeção Ótica)        |
| <b>PSF</b>  | Point Spread Function (Função de Espalhamento de Ponto)             |
| <b>RLD</b>  | Rapid Lifetime Determination  |
| <b>USAF</b> | United States Air Force   |





# Lista de Figuras

|      |   |    |
|------|---|----|
| 2.1  | Representação esquemática dos dois modos de funcionamento do sistema de OPT [9]. . . . .  | 7  |
| 2.2  | Representação esquemática de um sistema de OPT padrão [11]. . . . .   | 7  |
| 2.3  | Representação esquemática do filtro de inversão direta [7]. . . . .   | 13 |
| 2.4  | Representação esquemática do teorema das fatias de Fourier conjugado com a PSF. [7] . . . . .   | 14 |
| 2.5  | Esquema do sistema de varrimento focal remoto com ETL [11]. O-lente objetiva, AP-abertura, TL-lente de tubo, R1/R2-Lente de relé, OL-Lente de offset, ETL-lente eletronicamente ajustável, EF-Filtro de emissão. . . . .  | 15 |
| 2.6  | Comparação de resultados experimentais usando contas de pequenas dimensões, entre as técnicas OPT-standard e RFS-OPT [11]. É visível a melhoria na resolução, medida pela FWHM, e na eficiência de detecção, patente no valor dos picos. . . . .  | 16 |
| 2.7  | Layout do sistema de OPT em time-lapse/tempo real (A) e esquema da montagem do sistema (B) [12]. . . . .  | 17 |
| 2.8  | Fluxo de trabalho de OptiJ (A); <i>Set-up</i> do sistema OptiJ (B); Top view do sistema OptiJ (C) [13]. . . . .   | 18 |
| 2.9  | Efeito das correções em imagens com artefactos (b). (i) Correção à iluminação desigual devido a projeções de OPT em modo transmissão; (ii) Correção de inclinação e <i>offset</i> de um artefacto de sombra devido ao mau alinhamento da amostra com o sistema; (iii) Correção do <i>offset</i> dinâmico(iii) [13]. . . . . | 19 |
| 2.10 | Representação de transições eletrônicas que dão origem aos processos de fluorescência e fosforescência. É de notar que a fluorescência ocorre em escalas temporais inferiores comparativamente aos processos de fosforescência. [15] . . . . .  | 20 |
| 2.11 | Princípio de detecção Time-Gated utilizando gates de duração $T_G$ . O início do decaimento do sinal luminoso é $t_0$ . O intervalo de tempo entre gates é $s$ . [19] . . . . .   | 23 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.12 | Componentes de um sistema típico de aquisição <i>Time-Gated</i> . [22]   | 24 |
| 3.1  | Fonte de Luz Visível - Fiber-lite DC-950.[23]  | 26 |
| 3.2  | Câmara CCD - ORCA 100 C4742-95.  | 26 |
| 3.3  | Intensificador de Imagem e o respetivo controlador remoto.[24]   | 27 |
| 3.4  | Objetiva LSM03-BB. [25]  | 28 |
| 3.5  | Suporte Rotativo PRMTZ8 e o controlador remoto K-Cube™ DC Servo.[27]   | 29 |
| 3.6  | Osciloscópio digital - Tektronix TDS 210 [28]  | 29 |
| 3.7  | Gerador de Funções - Wavetek 50 MHz (modelo 81). [29]  | 29 |
| 3.8  | Gerador de Ondas - Rigol DG5102. [30]  | 30 |
| 3.9  | Montagem do Sistema de Projeção Ótica.   | 31 |
| 3.10 | Ambiente de trabalho do <i>imaqtool</i> .  | 33 |
| 3.11 | Fluxograma de Processamento de Imagem.   | 34 |
| 3.12 | Ambiente de trabalho do <i>ImageJ</i> .  | 35 |
| 3.13 | Interface do <i>plugin</i> de Estimativa de <i>background</i> .  | 36 |
| 3.14 | Interface do <i>plugin</i> de Correção de <i>Beer-Lambert</i> .  | 37 |
| 3.15 | Interface do <i>plugin</i> de Estimativa de inclinação e <i>offset</i> .   | 37 |
| 3.16 | Interface do <i>plugin</i> de Criação de Sinograma.  | 38 |
| 3.17 | Interface do <i>plugin</i> de Correção de <i>offset</i> dinâmico.  | 38 |
| 3.18 | Interface do <i>plugin</i> de Reconstrução 2D.   | 39 |
| 3.19 | Diferentes filtros utilizados para a aplicação de FBP no <i>plugin</i> de reconstrução 2D. Filtro de Ram-Lak (a), Filtro de Shepp-Logan (b) e filtro de Hamming (c).[34]   | 40 |
| 3.20 | Interface do <i>plugin 3D Viewer</i> .   | 41 |
| 4.1  | Alvo-teste USAF 1951 usado para a medição do FOV do Sistema de Tomografia de Projeção Ótica.   | 44 |
| 4.2  | Imagem adquirida do alvo-teste USAF 1951 utilizando o sistema. A imagem corresponde ao elemento 0 do grupo 1.  | 45 |
| 4.3  | Largura de uma linha em micrómetros no alvo de teste USAF 1951   | 45 |
| 5.1  | Procedimento para a preparação de um fantoma: (a) pesar o ágar, (b) Medição da quantidade de água destilada, (c) Mistura do ágar com a água destilada sob constante agitação e aquecimento até aos 90°C, (d) Arrefecimento sob constante agitação com um magnete até aos 60°C, (e) Junção do intralípido e agitação até a solução atingir os 40°C. | 51 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 5.2 | Imagem obtida, com o sistema projetado, do fantoma de ágar com inclusão de um tubo capilar. . . . .                                     | 53 |
| 5.3 | Montagem do fantoma no suporte rotativo. . . . .  | 56 |
| 6.1 | Tipos de aberturas na plataforma do suporte rotativo PRMTZ8/M. . . . .  | 57 |
| 6.2 | <i>Design</i> da peça inicialmente idealizada para o alinhamento do sistema. . . . .  | 58 |
| 6.3 | <i>Desing</i> da peça utilizada (a)/(b)e peça obtida após a impressão 3D (c). . . . .   | 59 |
| 6.4 | Imagens utilizadas para testar o alinhamento do sistema. Imagem tirada antes (a), e após terminar o conjunto de 4 rotações (b). . . . . | 59 |
| 6.5 | Montagem para geração do sinal de controlo de <i>gate</i> . . . . .   | 60 |
| 6.6 | Sinais visualizados no osciloscópio. (A) Sinal de <i>gate</i> ; (B) Sinal de decaimento exponencial. . . . .                            | 61 |
| 6.7 | Representação gráfica do número de contagens médias em função do tempo de exposição. . . . .  | 62 |
| 6.8 | Representação esquemática da curva de decaimento do LED visualizada no osciloscópio utilizando um amplificador de fotodíodo. . . . .    | 64 |
| 7.1 | Datasheet Fonte de Luz Visível. . . . .   | 73 |
| 7.2 | Datasheet Controlador Suporte Rotativo. . . . .   | 74 |
| 7.3 | Datasheet Intensificador de Imagem. . . . .   | 75 |
| 7.4 | Datasheet Câmara CCD. . . . .   | 76 |
| 7.5 | Código <i>MATLAB</i> para aquisição de imagens. . . . .   | 77 |
| 7.6 | Código <i>MATLAB</i> para aquisição de imagens (continuação). . . . .   | 78 |



# Lista de Tabelas

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 3.1 | Especificações elétricas da câmara ORCA 100 C4742-95 monocromática da <i>Hamamatsu</i> . . . . .   | 26 |
| 4.1 | Requisitos não-funcionais do sistema. . . . .  | 43 |
| 4.2 | Valores obtidos na medição de parâmetros para a obtenção do FOV do sistema implementado. . . . .   | 45 |
| 4.3 | Valores obtidos na medição da distância ocupada pelas linhas para a obtenção do FOV do sistema implementado. Determinação da dimensão de um único píxel. . . . . | 46 |
| 4.4 | Valores obtidos para o FOV do sistema implementado. . . . .  | 46 |
| 5.1 | Produtos utilizados para a preparação do fantoma de ágar e intralípido e suas respectivas quantidades. . . . .   | 51 |
| 5.2 | Dimensões do tubo capilar inserido no fantoma. . . . .   | 52 |
| 6.1 | Dimensões da peça de alinhamento desenhada utilizando o software <i>Autodesk Inventor</i> . . . . .  | 58 |
| 6.2 | Características da onda de decaimento exponencial gerada. . . . .  | 60 |
| 6.3 | Contagens médias obtidas para diferentes tipos de tempo de exposição. O erro apresentado é o desvio padrão. . . . .  | 62 |
| 6.4 | Características do pulso positivo gerado. . . . .  | 63 |
| 6.5 | Parâmetros de aquisição das imagens utilizadas no 1 <sup>o</sup> teste realizado. É utilizado um tempo de exposição de 0,3s. . . . .                             | 65 |
| 6.6 | Parâmetros de aquisição das imagens utilizadas no 2 <sup>o</sup> teste realizado. É utilizado um tempo de exposição de 0,4s. . . . .                             | 66 |
| 6.7 | Parâmetros de aquisição das imagens utilizadas no 3 <sup>o</sup> teste realizado. É utilizado um tempo de exposição de 0,4s. . . . .                             | 66 |
| 6.8 | Tempos de vida obtidos através do método RLD para os diferentes conjuntos de imagens. . . . .  | 66 |

6.9 Erros relativos percentuais associados às medições obtidas utilizando a técnica de RLD. . . . . 66

# Índice

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introdução</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Objetivos . . . . .   | 1         |
| 1.2      | Contexto e Motivação . . . . .                                  | 1         |
| 1.3      | Organização da Tese . . . . .                                   | 2         |
| <b>2</b> | <b>Estado de Arte</b>   | <b>5</b>  |
| 2.1      | Breve Introdução . . . . .                                      | 5         |
| 2.2      | Tomografia de Projeção Ótica . . . . .                          | 6         |
| 2.2.1    | Princípio de Funcionamento . . . . .                            | 6         |
| 2.2.2    | Reconstrução de Imagem . . . . .                                | 8         |
| 2.2.3    | Tomografia de Projeção Ótica em tempo real . . . . .            | 16        |
| 2.2.4    | OptiJ - Tomografia de Projeção Ótica de fonte aberta . . . . .  | 17        |
| 2.3      | Processos de Luminescência . . . . .                            | 19        |
| 2.3.1    | Fluorescência . . . . .   | 20        |
| 2.3.2    | Fosforescência . . . . .  | 22        |
| 2.4      | Técnica de Aquisição Time-Gated . . . . .                       | 22        |
| 2.4.1    | Sistema Padrão de Aquisição <i>Time-Gated</i> . . . . .         | 23        |
| <b>3</b> | <b>Implementação do Sistema de Tomografia de Projeção Ótica</b> | <b>25</b> |
| 3.1      | Instrumentação . . . . .  | 25        |
| 3.1.1    | Componentes do Sistema . . . . .                                | 25        |
| 3.1.2    | Montagem do sistema . . . . .                                   | 30        |
| 3.2      | Descrição do Software . . . . .                                 | 32        |
| 3.2.1    | Software de Aquisição . . . . .                                 | 32        |
| 3.2.2    | Software de Processamento . . . . .                             | 33        |
| <b>4</b> | <b>Caracterização do Sistema</b>                                | <b>43</b> |
| 4.1      | Requisitos do Sistema . . . . .                                 | 43        |
| 4.2      | Medidas Características . . . . .                               | 44        |
| 4.2.1    | Campo de Visão . . . . .  | 44        |



|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.2.2    | Profundidade de Campo . . . . .                           | 46        |
| 4.2.3    | Resolução Temporal . . . . .                              | 47        |
| <b>5</b> | <b>Estudo de Fantomas</b>                                 | <b>49</b> |
| 5.1      | Introdução . . . . .                                      | 49        |
| 5.2      | Procedimento de Preparação dos Fantomas . . . . .         | 50        |
| 5.2.1    | Design de Fantomas . . . . .                              | 52        |
| 5.3      | Fantoma com material biológico . . . . .                  | 54        |
| 5.3.1    | Processo de <i>Optical Clearing</i> . . . . .             | 54        |
| 5.3.2    | Fantoma com Embrião de Rato . . . . .                     | 54        |
| <b>6</b> | <b>Avaliação do Sistema</b>                               | <b>57</b> |
| 6.1      | Alinhamento do Sistema . . . . .                          | 57        |
| 6.1.1    | Testagem do Alinhamento . . . . .                         | 57        |
| 6.2      | Geração de Sinal de Aquisição <i>Time-Gated</i> . . . . . | 60        |
| 6.3      | Controlo do Tempo de Exposição . . . . .                  | 61        |
| 6.4      | Medição do Tempo de Decaimento . . . . .                  | 63        |
| 6.4.1    | Medição do Tempo de Decaimento no Osciloscópio . . . . .  | 63        |
| 6.4.2    | Medição do Tempo de Decaimento - Técnica de RLD . . . . . | 64        |
| <b>7</b> | <b>Conclusão</b>  | <b>67</b> |
| 7.1      | Conclusão . . . . .                                       | 67        |
| 7.2      | Trabalho Futuro . . . . .                                 | 68        |

*Esta página foi deixada em branco.*



# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Objetivos

Os objetivos deste projeto são a concepção e implementação de um sistema *Time-Gated* de Tomografia de Projeção Ótica (OPT). Este sistema deve ser capaz de analisar morfológica e funcionalmente, através do uso de luz branca e processos de luminescência, amostras mesoscópicas.

O trabalho realizado foi dividido em duas partes. Em primeiro lugar foram estudados os sistemas de OPT existentes de forma a definir qual o melhor projeto para dar resposta ao objetivo acima apresentado. A segunda fase do projeto correspondeu ao teste e caracterização do sistema implementado.

Não tendo sido possível o uso de uma sonda de fosforescência, recorreu-se ao uso de um LED, cuja emissão se situa na região do verde, para testar a capacidade do sistema em obter imagens baseadas em processos de luminescência com tempos de decaimento na ordem de centenas de microssegundos.

### 1.2 Contexto e Motivação

A imagiologia biomédica, onde se enquadra a técnica de OPT, apresenta capacidade de contínua evolução ao nível dos instrumentos e técnicas utilizadas. Esta área permite a avaliação de tecidos e órgãos das mais variadas dimensões.

É possível afirmar que existem lacunas nas técnicas usadas até ao aparecimento da OPT, nomeadamente falhas que dizem respeito à baixa resolução obtida na análise 3D de amostras de tecidos biológicos cujo tamanho se situa na escala mesoscópica [1].

Os sistemas de Tomografia de Projeção Ótica convencionais utilizam processos de fluorescência e fosforescência para obter imagens funcionais de tecidos biológicos.

Neste trabalho utiliza-se a técnica de aquisição *Time-Gated* de modo a aumentar a quantidade de informação obtida a partir da análise dos processos de fluorescência e de fosforescência.

Para além da intensidade de emissão, esta técnica permite ainda medir o tempo de vida de luminescência. A medição de tempos de vida fornece informação sobre o micro-ambiente dos fluoróforos já que este é sensível a diversos factores como o pH, a concentração de oxigénio, a existência de moléculas capazes de provocar a supressão de fluorescência por migração de energia ou a concentração de iões como o ião cálcio ( $Ca^{2+}$ ). As medições de fluorescência no domínio do tempo resultam num conteúdo de informação relativa à cinética dos processos intramoleculares e intermoleculares muito superior ao que é possível obter com as medições de fluorescência resolvidas apenas em intensidade. Desta forma afigura-se como muito provável o aumento da informação funcional passível de ser obtida com um sistema OPT *Time-Gated* relativamente à que é possível recolher com um sistema OPT convencional.

### 1.3 Organização da Tese

Este documento está organizado em sete capítulos.

No capítulo 1 é feita uma introdução, apresentando uma breve explicação do tema, o contexto e a motivação para a realização do projeto, objetivos e a organização da tese.

No capítulo 2 é apresentado o estado da arte relativo a este projeto. Após uma breve introdução é explicado o princípio de funcionamento da Tomografia de Projeção Ótica, como é feita a reconstrução das imagens adquiridas pelo sistema e quais os sistemas existentes para análise de amostras mesoscópicas. São mencionados os processos de luminescência utilizados em OPT e é apresentada a técnica de aquisição *Time-Gated*.

No capítulo 3 é descrita a implementação do sistema. Enfatizando a instrumentação utilizada e suas características. No final, é incluído o software utilizado para aquisição e processamento das imagens.

O capítulo 4 é dedicado à caracterização do sistema, apresentando os requisitos funcionais e não-funcionais do mesmo. Na secção seguinte é feita a apresentação das

medidas características como o campo de visão, profundidade de campo e resolução temporal.

Sendo uma parte importante para a avaliação do sistema, o capítulo 5, é utilizado para apresentar os estudos realizados com fantasmas. São descritos os fantasmas construídos e quais os que foram utilizados para testar o sistema. É explicado também o procedimento para a transparentização de amostras biológicas (*Optical Clearing*).

O teste do sistema é apresentado no capítulo 6. Aqui são descritos os métodos utilizados para provar o funcionamento correto do sistema *Time-Gated* de Tomografia de Projeção Ótica.

Por fim, o capítulo 7, inclui as conclusões do trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.



# Capítulo 2

## Estado de Arte

### 2.1 Breve Introdução

A imagiologia biomédica é uma disciplina que apresenta capacidade crescente de evolução ao nível das técnicas usadas para obter imagens de sistemas biológicos de diversos tamanhos. Para além disso, constitui uma ferramenta importantíssima no diagnóstico precoce de doenças, sendo possível obter não só imagens de estruturas biológicas, como também imagens funcionais de tecidos.

Com o passar do tempo, as técnicas de imagiologia foram evoluindo de modo a preencher lacunas existentes nas técnicas até então usadas, nomeadamente falhas que dizem respeito à baixa resolução obtida na análise 3D de amostras de tecidos biológicos cujo tamanho se situa na escala mesoscópica [2]. Esta escala contempla as dimensões entre aquilo que é considerado microscópico e macroscópico, ou seja, dimensões entre os 1 mm e os 10 mm.

Até ao ano de 2002 eram utilizadas técnicas como microscopia confocal, ressonância magnética (MR), tomografia computadorizada (CT) e tomografia de coerência ótica para a análise de tecidos na escala mesoscópica.

A tomografia de projeção ótica é semelhante à técnica de micro-CT, uma técnica de tomografia computadorizada utilizada para analisar amostras microscópicas. A grande diferença entre estas, para além do tamanho das amostras, reside na existência de restrições no que toca à transparência da amostra e procedimentos de fixação da mesma.

A tomografia de coerência ótica é uma técnica baseada em interferometria de baixa coerência. Uma das suas vantagens relativamente à tomografia de projeção ótica é a possibilidade de analisar e visualizar imagens em tempo real. [11]



## 2.2 Tomografia de Projeção Ótica

A Tomografia de Projeção Ótica (OPT), uma nova técnica tomográfica que envolve microscopia ótica, surge como solução para a aquisição de imagens de elevada resolução, comparativamente às técnicas anteriormente utilizadas. É aplicada quando se pretende analisar a morfologia de amostras óticamente transparentes cujo tamanho se situa na região mesoscópica, sendo possível ao mesmo tempo obter imagens funcionais da amostra em estudo [2].

A OPT foi apresentada pela primeira vez num artigo publicado por J. Sharpe em 2002. Recorrendo a esta técnica, conseguem-se obter imagens de amostras cujo tamanho é muito grande para se fazer uso da microscopia confocal e muito pequeno para usar, por exemplo, técnicas de ressonância magnética [1]. A tomografia de projeção ótica permite obter imagens de resolução superior comparativamente à ressonância magnética, fazendo uso de um sistema cujo campo de visão é mais amplo que o obtido usando a microscopia confocal [2].

Esta nova técnica pode ser vista como uma versão ótica da tomografia computadorizada, uma vez que faz uso dos mesmos métodos para a obtenção de projeções 2D. Estas serão manipuladas usando filtros de reconstrução para originar uma imagem final em 3D [13]. Uma das suas grandes vantagens sobre a microscopia confocal é não haver a necessidade de fazer seccionamento ótico da amostra [1].

Um dos principais requisitos, como mencionado acima, é a transparência ótica da amostra. Isto implica que se possa considerar o efeito de dispersão da luz negligenciável. A transparência é obtida através da submersão da amostra numa solução para reduzir a dispersão da luz na sua superfície [12] levando a que a sua trajetória dos raios através da amostra seja aproximadamente retilínea. Este requisito constitui uma desvantagem perante a técnica de ressonância magnética [1].

### 2.2.1 Princípio de Funcionamento

De acordo com o tipo de iluminação usada, existem dois modos de funcionamento (figura 2.1): modo emissão e modo transmissão [2].

No modo emissão, a amostra é irradiada pela luz responsável pela excitação, emitindo luz por processos de fluorescência ou fosforescência, cuja intensidade vai ser lida num detetor. Esta prática permite obter informação funcional acerca do tecido em análise.[1],[2]

No modo transmissão a amostra é iluminada utilizando radiação visível de modo a obter informações estruturais. Negligencia-se a dispersão da luz na superfície da amostra devido à transparência ótica da mesma. A imagem final é resultado da radiação que chega ao ponto de detecção, ou seja, a parcela de luz que não for absorvida pelo tecido. [1],[2]

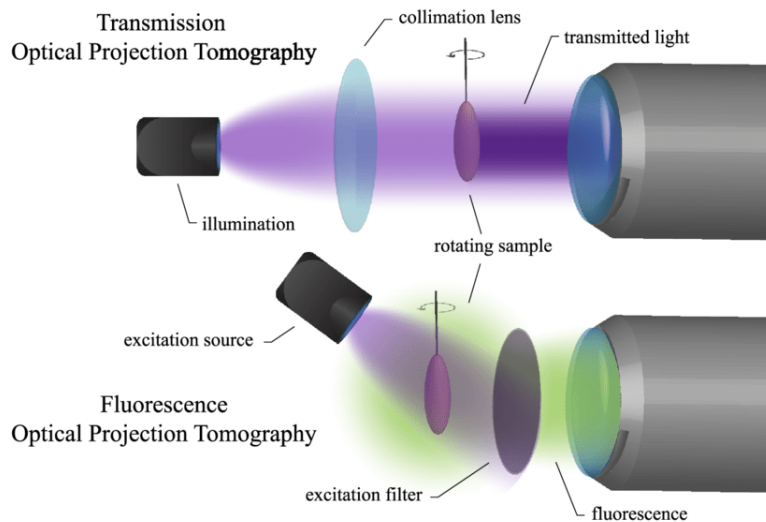


Figura 2.1: Representação esquemática dos dois modos de funcionamento do sistema de OPT [9].

A recolha de dados engloba fazer um varrimento para vários ângulos da amostra colocada num suporte rotativo. As projeções 2D são obtidas devido à emissão de radiação (informação funcional) pela amostra e pela atenuação da radiação que chega ao detetor (imagem estrutural). A detecção da radiação após a interação com a amostra é feita usando uma câmara CCD.

### Sistema Padrão de Tomografia de Projeção Ótica

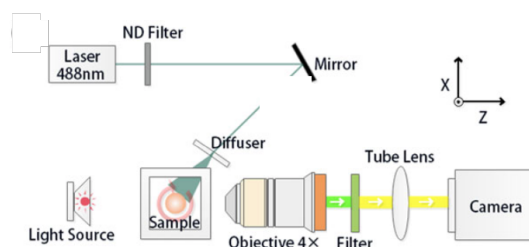


Figura 2.2: Representação esquemática de um sistema de OPT padrão [11].

A figura 2.2 representa a montagem padrão de um sistema de tomografia de projeção ótica. É composto por uma fonte de luz utilizada para o modo transmissão, uma

fonte de excitação para o modo emissão, um suporte rotativo onde é fixada a amostra, componentes óticos (objetiva, filtros, lentes) e uma câmara.

A amostra é irradiada pela luz visível de modo a obter dados estruturais. Como as células, tecidos e organismos são opacos à luz visível, as amostras geralmente precisam de ser quimicamente limpas para as tornar transparentes.

Estas informações são recolhidas sequencialmente produzindo uma projeção final que apresenta informação morfológica e funcional.

## 2.2.2 Reconstrução de Imagem

A imagem 3D é obtida usando algoritmos de reconstrução como a retro-projeção filtrada (FBP). De acordo com estudos realizados, este tipo de algoritmo ignora a difração da luz na face da lente de focagem. Isto conduz à degradação da imagem final diminuindo a qualidade da mesma à medida que a distância ao seu eixo de rotação aumenta.[6]

Para evitar esta diminuição de nitidez da imagem obtida, foi apresentada em 2017 uma nova técnica de reconstrução de imagem tomográfica usando a função de espalhamento de um ponto (PSF)[6]. Neste estudo, são usadas contas fluorescentes e um sistema de tomografia de projeção ótica de elevada resolução operado em modo emissão. Concluiu-se que, comparativamente ao algoritmo de FBP, houve uma grande diminuição do desfoque em todo o campo de visão, melhorando a razão de sinal/ruído.

Outra característica importante do sistema de OPT é a abertura numérica (NA) das objetivas usadas, pois a resolução das imagens (D) obtidas aumenta proporcionalmente com a mesma. Quanto menor for o valor D, maior será a resolução da imagem.

$$D = \frac{0,61\lambda}{NA} \quad (2.1)$$

Por outro lado a profundidade de campo e, conseqüentemente, a nitidez dos pontos fora do foco variam inversamente com o seu aumento.[11] Assim, o sistema é montado de forma a que pelo menos metade da amostra esteja incluída na distância de profundidade de campo do sistema de modo a ser possível usar a aproximação de projeção de raios paralelos [11].

Para obter uma geometria de projeções paralelas, a OPT necessita de objetivas de baixa abertura numérica e elevada profundidade de campo, uma vez que baixas profundidades de campo levam a que não se consiga analisar tecidos de espessuras

mesoscópicas [7]. O uso destas objetivas leva a que a resolução lateral seja menor.

No geral, para melhorar a resolução espacial desta técnica, existem métodos novos e promissores como a função de transferência de modulação [8], a filtragem ad-hoc [7], o varrimento focal [9] e o varrimento focal remoto[13].

### Função Transferência de Modulação

A função de transferência de modulação permite avaliar como varia a resolução espacial de um sistema de imagem. Para definir a mesma são necessários dois conceitos importantes: resolução e contraste.

A resolução corresponde à capacidade do sistema para distinguir detalhes dos objetos em estudo. É expressa em termos de pares de linhas por milímetro (lp/mm) sendo esta medida também conhecida como frequência. Quanto maior a frequência mais detalhada será a imagem. [8]

O contraste é definido usando duas variáveis: o valor máximo ( $I_{max}$ ) e mínimo ( $I_{min}$ ) de intensidade. Pode definir-se a modulação como sendo o quociente entre a diferença e a soma das variáveis mencionadas.

$$Modulação = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (2.2)$$

Assim para determinar a função de transferência de modulação tem de se comparar a modulação das ondas sinusoidais de entrada ( $M_i$ ) e de saída  $M_o$ . Esta comparação é feita através de um quociente.

$$MTF = \frac{M_o}{M_i} \quad (2.3)$$

Para um dado número de frequências conhecidas,  $f$ , com modulações de entrada conhecidas é possível, após a interação com o sistema, obter as modulações de saída. Fazendo o quociente 2.2 para cada uma das frequências e representando esses valores graficamente obtemos a função de transferência de modulação.

Num sistema de tomografia de projeção ótica é possível aplicar um filtro baseado na função de transferência de modulação. Utiliza a frequência de corte da MTF como um filtro adicional durante a reconstrução, ou seja, em adição ao filtro de retroprojeção. Isto restringe a informação das frequências mais altas à região que rodeia o plano focal do sistema de imagem.

Uma das vantagens deste método é a diminuição dos artefactos “*streak*” em dados

adquiridos utilizando poucas projeções, facilitando assim aquisições de OPT mais rápidas. Este tipo de artefactos tem origem na presença de osso ou de metal nos tecidos analisados. Resulta da alteração de densidade das amostras ao longo do percurso do feixe de luz.

Os valores de MTF variam entre zero e um [8]. Assim, conclui-se que quanto maior o valor de MTF, maior será a preservação dos detalhes reais da amostra, para uma dada frequência, na imagem obtida usando o sistema em causa.

### Filtragem ad-hoc após processamento

Corresponde a filtros criados para aplicação em situações específicas depois de terminada a aquisição e o processamento da imagem final. O uso deste tipo de filtros leva a uma diminuição do efeito da função de transferência de modulação [7]. Um dos exemplos deste tipo de aplicação corresponde à utilização da função de espalhamento de ponto juntamente com o algoritmo de FBP para reduzir o desfoque nas imagens.

### Varrimento de plano focal

O varrimento de plano focal é uma alternativa ao modo de aquisição padrão, pois permite usar objetivas com aberturas numéricas maiores limitando o efeito da menor profundidade de campo. Faz o varrimento completo da amostra produzindo um conjunto de pseudo-projeções para a reconstrução da imagem.

Para que esta reconstrução seja fidedigna, é aplicado um filtro de inversão (figura 2.3) que incorpora a função de espalhamento de um ponto (PSF) (figura 2.4). Após aplicar este filtro através de várias deconvoluções 2D é usado o tradicional algoritmo de retroprojeção filtrada.[9]

De acordo com a formulação apresentada em [7], para um objeto 3D,  $f(x,y,z)$ , assumindo que o seu eixo de rotação é o eixo do  $z$ , a projeção obtida para um dado ângulo  $\theta$  é dada por:

$$p(u, v, \theta) = \iiint_{R^3} f(x, y, z) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - u, z - v) dx dy dz \quad (2.4)$$

Na equação acima  $\delta(;;)$  corresponde à função delta de Dirac,  $p(u,v,\theta)$  é a projeção 2D de  $f(x,y,z)$  na direção do ângulo  $\theta$ .

Num sistema de tomografia de projeção ótica a equação 2.3 não pode ser aplicada pois nem sempre a amostra está inteiramente contida na profundidade de campo do

sistema.

Assim, a formação de imagem,  $\tilde{I}(u, v, \theta)$ , em OPT é descrita de forma mais precisa usando um único plano focal. Este resulta da convolução entre o objeto 3D e a PSF. [7]

$$\tilde{I}(u, v, \theta) = (f^*T_\theta(h))(ucos\theta, usin\theta, v) \quad (2.5)$$

$T_\theta$  é o operador de transformação que roda a PSF do sistema (h) com um ângulo  $\theta$  em torno do eixo do z. As variáveis  $u$  e  $v$  são as distâncias à origem.

Tendo em consideração o facto de a amostra não se encontrar totalmente contida na profundidade de campo, foi encontrada uma forma de criar uma pseudo-projeção ( $\tilde{p}$ ) analisando o plano focal através de toda a amostra. Isto pode ser alcançado varrendo linearmente o plano focal durante um único período de integração da câmara ou adquirindo um conjunto de imagens e integrando ao longo da direção da projeção.

$$\tilde{p}(u, v, \theta) = \iiint_{R^3} (f^*T_\theta(h))(x, y, z) \cdot \delta(xcos\theta + ysin\theta - u, z - v) dx dy dz \quad (2.6)$$

Aplicar o algoritmo de retroprojeção filtrada à equação acima não permitirá obter uma reconstrução correta do objeto  $f(x,y,z)$ , mas sim uma versão desfocada devido ao efeito da PSF (h).

O teorema da secção central, representado pela equação 2.6, é um método analítico que permite a reconstrução de imagens em duas ou três dimensões.

Define que ter uma função,  $f(x,y)$ , projetada numa linha e de seguida aplicar a transformada de Fourier é equivalente a ter a mesma função  $f(x,y)$ , mas aplicar primeiro a transformada de Fourier a 2D e só depois tirar a fatia central que passa pela origem. Existem vários operadores importantes como: o operador da transformada de Fourier de dimensão M, ( $F^M$ ), o operador da projeção para um dado ângulo  $\theta$  de N para M dimensões, ( $P_\theta^{N \rightarrow M}$ ), o operador que define uma fatia de M dimensões normal à direção de  $\theta$  ( $\delta_\theta^{N \rightarrow M}$ ) e, por fim, o operador que denota a transformada de Fourier de N dimensões ( $F^N$ ).

$$F^M \circ P_\theta^{N \rightarrow M} = \delta_\theta^{N \rightarrow M} \circ F^N \quad (2.7)$$

Transpondo para o caso da tomografia de projeção ótica, o valor de M será 2 e o valor de N será 3.

Uma vez que a equação 2.5 representa o operador  $P_\theta^{3 \rightarrow 2}$ , ter-se-á então, através do teorema da secção central, que a sua transformada de Fourier é equivalente a uma fatia da transformada de Fourier da imagem obtida com desfoque devido à aplicação da PSF.

$$F^2\{\tilde{p}(u, v, \theta)\} = \delta_\theta^{3 \rightarrow 2}\{F^3\{f^*T_\theta\{h\}(x, y, z)\}\} \quad (2.8)$$

$$F^2\{\tilde{p}(u, v, \theta)\} = \delta_\theta^{3 \rightarrow 2}\{F^3\{f(x, y, z)\}\} \cdot \delta_\theta^{3 \rightarrow 2}\{F^3\{T_\theta\{h\}(x, y)\}\} \quad (2.9)$$

Aplicando novamente o teorema da secção central apenas à parcela que diz respeito à PSF (h), é possível separar a fatia que interessa filtrar utilizando a função inversa de 2.5.

$$\delta_\theta^{3 \rightarrow 2}\{F^3\{f(x, y, z)\}\} = \frac{F^2\{\tilde{p}(u, v, \theta)\} \cdot F^{2*}\{P_\theta^{3 \rightarrow 2}\{T_\theta\{h\}(x, y, z)\}\}}{|F^2\{P_\theta^{3 \rightarrow 2}\{T_\theta\{h\}(x, y, z)\}\}|^2} \quad (2.10)$$

O algoritmo de retroprojeção filtrada define o objeto  $f(x, y, z)$  como sendo resultado do somatório de projeções para os vários ângulos.

$$f(x, y, z) \approx \sum_{k=1}^K Q_{\theta_k}(x \cos \theta_k + y \sin \theta_k, z) \quad (2.11)$$

Assim  $Q_{\theta_k}(u, v)$  é a projeção para um ângulo,  $\theta_k$ , após ser aplicada a filtragem no domínio de *Fourier* utilizando um filtro de rampa ( $W(w_u, w_v)$ ).

$$W(w_u, w_v) = |w_u| \quad (2.12)$$

$$F^2(Q_{\theta_k}(u, v)) = \delta_\theta^{3 \rightarrow 2}\{F^3\{f(x, y, z)\}\} \cdot W(w_u, w_v) \quad (2.13)$$

Substituindo a expressão 2.9 em 2.12 é possível descrever cada retroprojeção filtrada em termos de  $\tilde{p}(x, y, z)$ .

$$F^2(Q_{\theta_k}(u, v)) = F^2\{\tilde{p}(u, v, \theta)\} \cdot \tilde{W}(w_u, w_v) \quad (2.14)$$

$\tilde{W}(w_u, w_v)$  é o resultado da aplicação do filtro de rampa.

$$\tilde{W}(w_u, w_v) = W(w_u, w_v) \cdot H_{inv}(w_u, w_v) \quad (2.15)$$

$$H_{inv}(w_u, w_v) = \frac{F^{2*} \{P_{\theta}^{3 \rightarrow 2} \{T_{\theta}\{h\}(x, y, z)\}\}}{|F^2 \{P_{\theta}^{3 \rightarrow 2} \{T_{\theta}\{h\}(x, y, z)\}\}|^2 + \lambda |F^2 \{r(u, v)\}|^2} \quad (2.16)$$

Nesta equação,  $\lambda$  corresponde a um parâmetro de regularização e  $r$  é um filtro de regularização passa-alto.

O termo de regularização no denominador estabiliza o filtro inverso e evita que ele cresça quando a função de transferência óptica ( $F^3\{h\}$ ) estiver próxima de zero.

Com este resultado, podemos agora aplicar o algoritmo de FBP para estimar a imagem que diz respeito a  $f(x, y, z)$  partindo das projeções desfocadas ( $\tilde{p}(u, v, \theta)$ ).

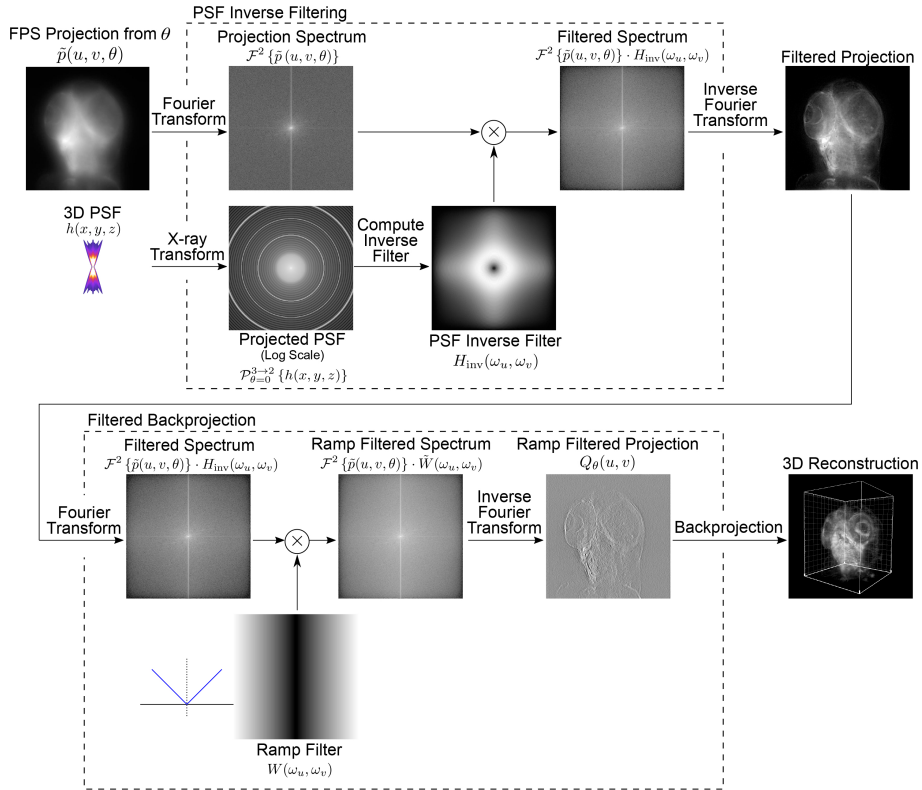


Figura 2.3: Representação esquemática do filtro de inversão direta [7].



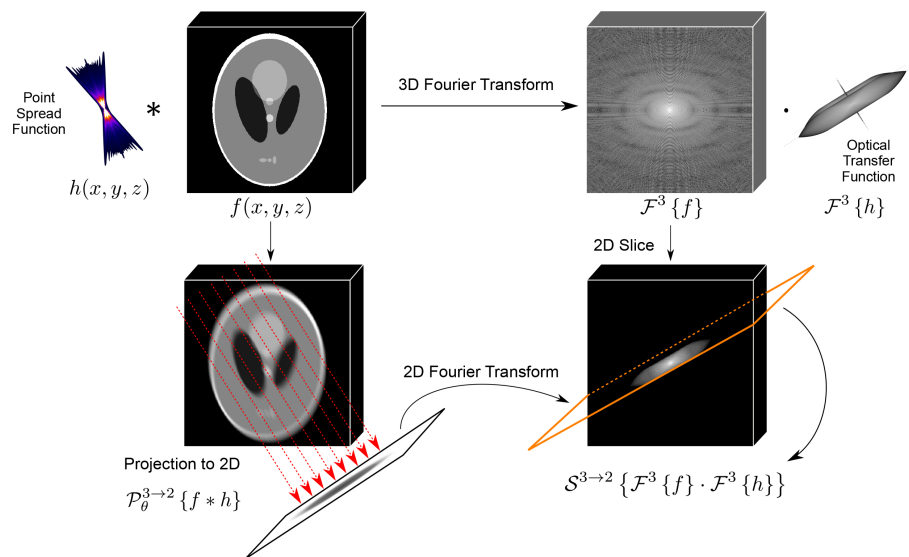


Figura 2.4: Representação esquemática do teorema das fatias de Fourier conjugado com a PSF. [7]

O facto de as pseudo-projeções não serem a melhor opção em regime mesoscópico levou ao aparecimento de uma nova técnica de varrimento focal: varrimento focal remoto.

### Varrimento Focal Remoto

Esta nova técnica de varrimento, representada na figura 2.5, pode ser feita, de acordo com o apresentado em [11], usando uma lente eletronicamente ajustável (ETL).

O uso de lentes eletronicamente ajustáveis [13] tem aumentado devido à redução da complexidade, tamanho, peso, tempo de resposta e consumo de energia relativamente aos sistemas convencionais de focagem.

São lentes compostas por um meio (fluido, gel ou sólido) capaz de utilizar energia elétrica para modificar dinamicamente algumas das suas propriedades internas, como a distância focal, que alteram a forma da frente de onda de luz.

O uso desta lente permite um aumento da abertura numérica comparativamente ao sistema de tomografia de projeção ótica padrão. Assim ocorre um aumento da resolução e eficiência na recolha de luz na câmara CCD.

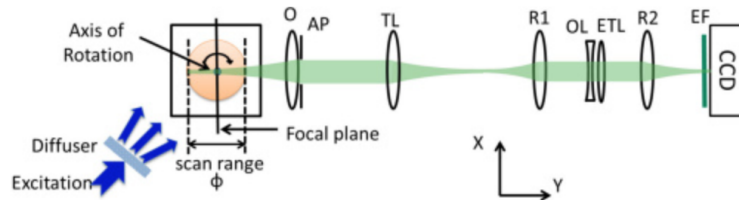


Figura 2.5: Esquema do sistema de varrimento focal remoto com ETL [11]. O-lente objetiva, AP-abertura, TL-lente de tubo, R1/R2-Lente de relé, OL-Lente de offset, ETL-lente eletronicamente ajustável, EF-Filtro de emissão.

A aplicação desta técnica é particularmente importante para amostras de tamanho maior analisadas a baixas ampliações.

Os dados obtidos mostram um aumento claro da resolução, no caso da tomografia de projeção ótica, usando um varrimento focal remoto relativamente à técnica de varrimento de plano focal, como se pode ver na figura 2.6.

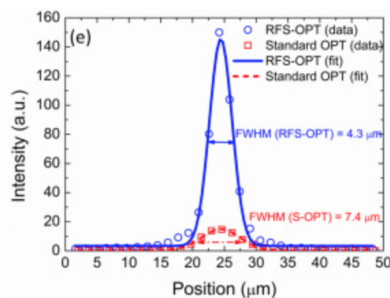


Figura 2.6: Comparação de resultados experimentais usando contas de pequenas dimensões, entre as técnicas OPT-standard e RFS-OPT [11]. É visível a melhoria na resolução, medida pela FWHM, e na eficiência de detecção, patente no valor dos picos.

Com a aplicação de ETL consegue-se obter uma maior resolução comparativamente à OPT padrão.

### 2.2.3 Tomografia de Projeção Ótica em tempo real

Com os avanços tecnológicos foi possível no ano de 2009 transpor o potencial da tomografia de projeção ótica para o campo de imagiologia em tempo real.

Mais recentemente, foi apresentada uma nova técnica conhecida como tomografia de projeção ótica 4D ou *time-lapse OPT* [12] que já se encontra apta a recolher e acumular dados quantitativos fidedignos acerca do desenvolvimento dinâmico embrionário[11].

Este foi um passo importante para a construção de modelos computacionais e para a detecção de novos problemas ao nível biológico. Apresenta, no entanto, uma resolução mais baixa comparativamente à análise estática de tecidos.

A recolha de imagens 3D é feita através de varrimentos longos que se podem tornar tóxicos para o tecido. Contudo, combinando a técnica de OPT com a técnica de cultura ex-vivo é possível obter resultados positivos utilizando varrimentos mais curtos.

#### Montagem

Nem todos os seres vivos reúnem as capacidades necessárias para se desenvolverem fora das condições ideais. No caso dos mamíferos, roedores por exemplo, é bastante difícil conseguir o seu crescimento em mudanças ambientais drásticas.

Assim, o sistema de OPT padrão é alterado, como mostrado na figura 2.7, colocando no suporte rotativo uma câmara de suporte de vida que controla todas as variáveis ambientais necessárias ao correto desenvolvimento do tecido/órgão em questão.

Um dos grandes problemas associados residia na questão de como controlar o ângulo em que a amostra se encontrava relativamente ao eixo de rotação sem abrir a câmara de suporte de vida pois isso iria alterar as condições da análise. A solução encontrada foi a criação de um micro-manipulador com 6 graus mecânicos de liberdade todos controláveis a partir do exterior.

Cumprindo os requisitos e as necessidades impostas pela biologia das amostras, foi possível alcançar 2 grandes conquistas: obter um mapeamento quantitativo do desenvolvimento do órgão em questão e monitorizar variações dinâmicas nos padrões de desenvolvimento de genes em todo o tecido. Para obter informação a 4D, foi feito o seguimento do sinal emitido por uma proteína fluorescente verde ao longo do tempo.

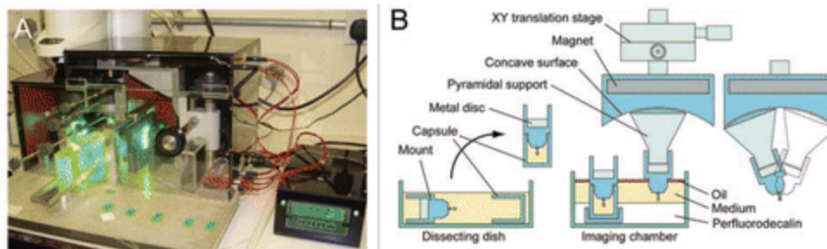


Figura 2.7: Layout do sistema de OPT em time-lapse/tempo real (A) e esquema da montagem do sistema (B) [12].

Privilegiando o estudo do sistema cardiovascular por ser o primeiro sistema de órgãos a ser desenvolvido em embriões de vertebrados, o objetivo futuro desta técnica é conseguir encontrar condições de funcionamento para a imagiologia de fluorescência a 4D. Ao mesmo tempo é necessário prevenir alguns dos artefactos existentes como artefactos de movimento (batimentos cardíacos).

## 2.2.4 OptiJ - Tomografia de Projeção Ótica de fonte aberta

Em 2019 foi apresentado no artigo [13] um sistema que permite uma aplicação mais ampla da tomografia de projeção ótica, o OptiJ.

O OptiJ é um sistema aberto de baixo custo capaz de obter imagens de amostras transparentes de dimensões volumétricas consideradas elevadas com uma resolução próxima de  $50\mu\text{m}$ . Faz uso de componentes óticos fáceis de montar e inclui uma biblioteca para reconstrução de imagens com algoritmos para aumentar a resolução da imagem 3D final através da correção de artefactos.

A sua estrutura permite obtenção de projeções 2D em ambos os modos de operação da tomografia de projeção ótica.

O software inclui rotinas de correção de erros de iluminação não-uniforme e eliminação do *jitter* mecânico. A somar a tudo isto, existem métodos para reconstrução acelerada de grandes conjuntos de dados.

A figura 2.8A representa a forma como funciona o sistema de OPT projetado, os passos que são necessários realizar desde a extração da amostra até à reconstrução das imagens obtidas. Para além disso, com a ajuda da figura 2.8B e 2.8C é possível ter uma ideia da aparência do sistema de OPT montado.

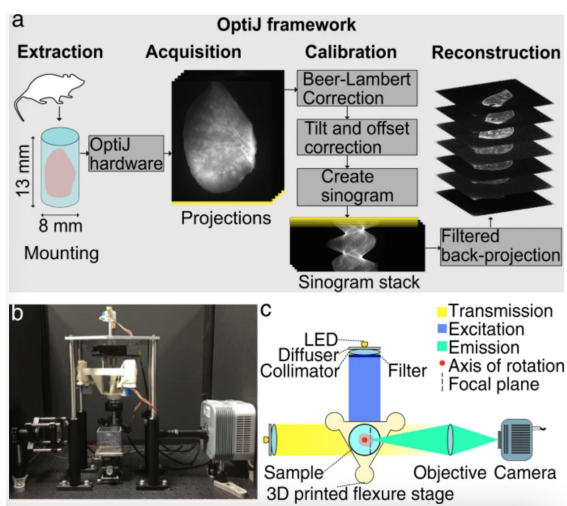


Figura 2.8: Fluxo de trabalho de OptiJ (A); *Set-up* do sistema OptiJ (B); Top view do sistema OptiJ (C) [13].

Ao implementar este tipo de sistema de imagem, os seus criadores focaram-se principalmente em três aspetos: assegurar que o eixo de rotação é paralelo ao plano de imagem da câmara usada, alinhar a amostra com o campo de visão da câmara e executar de forma robusta e repetitiva a rotação da amostra e a aquisição das projeções 2D.

## Reconstrução de Imagem

A reconstrução das imagens 3D de elevada resolução faz-se a partir de projeções 2D obtidas usando a técnica de OPT. É necessário pré-processamento dos dados para que haja eliminação de artefactos.

Um dos artefactos mais comuns surge quando o eixo de rotação da amostra não é paralelo ao FOV da câmara durante as aquisições, provocando o aparecimento de uma sombra em torno de pontos nítidos de elevada resolução.

## Correção de artefactos

Para corrigir os artefactos são usadas técnicas distintas: correção de Beer-Lambert, correção de inclinação e de *offset*, e correção de *offset* dinâmico.

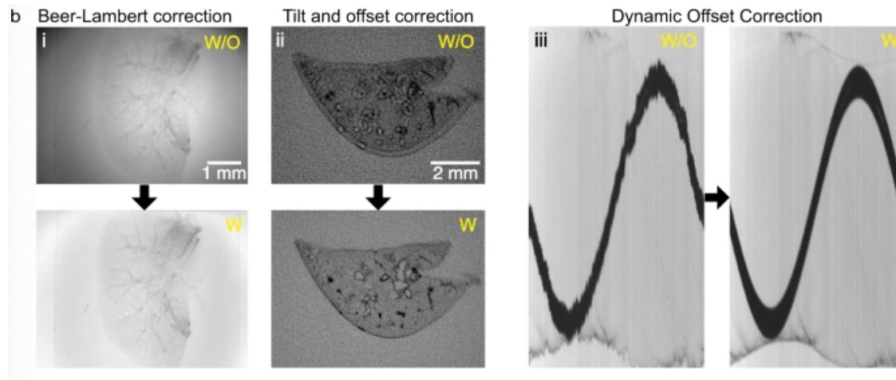


Figura 2.9: Efeito das correções em imagens com artefactos (b). (i) Correção à iluminação desigual devido a projeções de OPT em modo transmissão; (ii) Correção de inclinação e *offset* de um artefacto de sombra devido ao mau alinhamento da amostra com o sistema; (iii) Correção do *offset* dinâmico(iii) [13].

A lei de Beer-Lambert relaciona a absorção da luz pela amostra com as propriedades óticas da mesma. Esta técnica analisa cada projeção 2D de modo obter coeficientes de atenuação linear corrigidos para os pixels de intensidades diferentes. Os resultados esperados estão representados na figura 2.9(i).

A correção de inclinação e *offset* (figura 2.9(ii)) determina se o eixo de rotação é paralelo ao plano do campo de visão da câmara e produz valores de correção para o conjunto de projeções caso tal pré-requisito não seja cumprido. Estes valores de correção podem ser usados para diminuir os artefactos de sombra.

Por fim, criando o sinograma e tendo uma transformada de Radon das projeções 2D, utilizam-se os valores de correção descritos no parágrafo acima para contabilizar os desvios residuais, diminuindo a necessidade de um alinhamento totalmente preciso antes de realizar as aquisições. Esta prática diminui o *jitter* mecânico devido ao uso de motores *low-cost*, como mostrado na figura 2.9(iii).

## 2.3 Processos de Luminescência

A luminescência é a emissão espontânea de luz por uma dada substância [14].

Este processo ocorre após a absorção de energia, por parte do material, proveniente de uma fonte de radiação ultra-violeta, raios-x ou visível. A energia eleva os átomos do material a um estado excitado, por norma instável. Esta instabilidade obriga

a que ocorra uma nova transição atômica para o estado fundamental, libertando a energia absorvida sob a forma de luz, calor ou ambos.

Entre os vários processos de luminescência encontram-se dois de especial importância para este projeto: a fluorescência e a fosforescência, representados na figura 2.10.

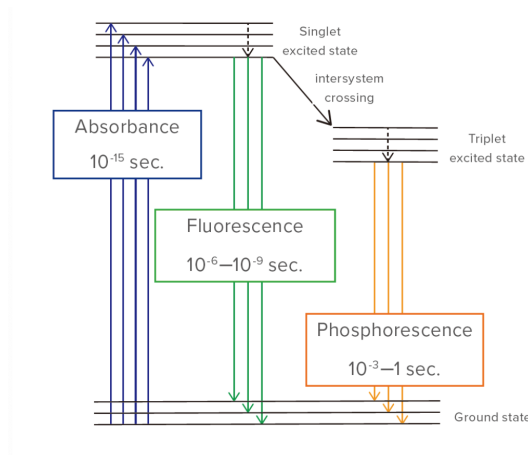


Figura 2.10: Representação de transições eletrônicas que dão origem aos processos de fluorescência e fosforescência. É de notar que a fluorescência ocorre em escalas temporais inferiores comparativamente aos processos de fosforescência. [15]

### 2.3.1 Fluorescência

A fluorescência pode ser definida como a emissão de luz por uma dada substância, composta por moléculas com propriedades fluorescentes (fluoróforos), que absorveu luz ou outro tipo de radiação eletromagnética [16].

Na presença de fluoróforos, assim que a amostra é irradiada, os seus elétrons passam do estado fundamental para um estado singlete excitado. Dependendo da energia do fóton incidente, caracterizada pela lei de *Planck*, o elétron pode passar para o primeiro ou para o segundo estado singlete excitado.

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (2.17)$$

E corresponde à energia de um fóton,  $h$  é a constante de *Planck* de valor  $6,63 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg/s}$ ,  $\nu$  e  $\lambda$  são, respetivamente, a frequência (Hz) e o comprimento de onda (nm) e  $c$  corresponde à velocidade da luz no vácuo cujo valor é de  $3,0 \times 10^8 \text{ m/s}$ .

Logo após a absorção de luz, o elétron que se encontra no estado singlete excitado irá sofrer um processo de conversão interna, normalmente por relaxamento vibracional. O processo denominado fluorescência ocorre quando a molécula excitada regressa ao estado fundamental, emitindo um fóton.

Os fótons emitidos durante este processo terão sempre menos energia que os fótons incidentes devido às perdas energéticas ocorridas durante as transições eletrônicas no regresso ao estado fundamental. Este fenómeno é conhecido como desvio de *Stokes*.

Os três parâmetros que descrevem os diferentes fluoróforos são: o coeficiente de extinção, o tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico.

### **Coefficiente de Extinção**

O coeficiente de extinção,  $\epsilon$ , é determinado através da medição da absorvância, para um dado comprimento de onda, do fluoróforo alvo colocado numa cuvete. É necessário ter uma concentração de produto químico de 1 mol/l e uma a cuvete com 1 cm de espessura.

Este tipo de coeficiente é a medida direta da capacidade que uma substância tem de absorver luz. Portanto, quanto maior o coeficiente de extinção, maior será a probabilidade de emissão de luz por processos de fluorescência.

### **Tempo de Vida de Fluorescência**

O tempo de vida de fluorescência,  $\tau$ , é o tempo que um fluoróforo se mantém num estado excitado antes de regressar ao estado fundamental, emitindo fótons. É calculado recorrendo aos coeficientes de decaimento radiativo,  $k_r$ , e decaimento não-radiativo,  $k_{nr}$ .

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2.18)$$

Durante o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado, este pode sofrer mudanças conformacionais, interagir com outras moléculas e difundir-se. Todos estes processos levam a um decaimento da intensidade de fluorescência.

O decaimento da intensidade,  $I(t)$ , em função do tempo é descrito por uma função exponencial em que  $I_0$  corresponde irradiância em  $t=0$ , após a aplicação do pulso de excitação.

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.19)$$



## Rendimento Quântico

O rendimento quântico,  $\Phi_F$ , é dado pela razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos. Este parâmetro serve para medir a eficiência do processo de fluorescência e apresenta valores entre zero e a unidade.

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2.20)$$

Na maioria das vezes, é desejável um rendimento quântico elevado para aplicações de imagiologia.

### 2.3.2 Fosforescência

O termo fosforescência foi utilizado pela primeira vez para descrever a luminescência persistente de materiais que apresentavam fósforos na sua constituição, ou seja, materiais luminescentes que apresentam um brilho continuado após a excitação com uma fonte de radiação.

A fosforescência é um fenômeno que corresponde ao decaimento radiativo de um estado de tripleto molecular, ou seja, diz respeito a uma transição entre estados de diferentes multiplicidades de spin. Esta multiplicidade é definida como o número de orientações possíveis do spin total relativamente ao momento angular orbital total. [17] Sendo uma propriedade geral das moléculas, o estudo da fosforescência exige um conhecimento aprofundado da estrutura molecular eletrônica do material em uso.

### Intensidade e Tempo de vida

De acordo com a teoria da radiação, a probabilidade de ocorrer emissão espontânea de radiação é medida pela taxa de decaimento, enquanto que a intensidade de emissão é definida pelo rendimento quântico[18].

O tempo de vida de fosforescência é definido como o tempo médio que uma molécula permanece num estado excitado tripleto antes de voltar ao estado fundamental, emitindo um fóton.

## 2.4 Técnica de Aquisição Time-Gated

Na técnica de *Time-Gated* ocorre a excitação da amostra através da aplicação de um pulso de curta duração. A aquisição do sinal luminoso proveniente da amostra é

feita em intervalos de tempo específicos denominados *gates*. Este modo de aquisição encontra-se representado na figura 2.11.

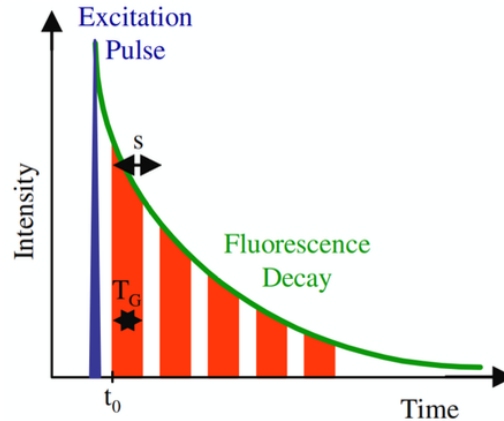


Figura 2.11: Princípio de detecção Time-Gated utilizando gates de duração  $T_G$ . O início do decaimento do sinal luminoso é  $t_0$ . O intervalo de tempo entre gates é  $s$ . [19]

Esta aquisição [20] é um método eficaz para suprimir sinais de fundo relacionados com o pulso de excitação. Isto ocorre porque a aquisição é atrasada relativamente à excitação da amostra. A luz dispersada atinge o detetor em  $t \approx 0$ . Para não ser detetada, uma vez que não é desejável, abre-se a primeira *gate* algumas centenas de picossegundos após o instante inicial. Isto melhora a razão sinal-fundo nas imagens finais sem perda significativa de sinal.

Por outro lado, a existência de *gates*, permite a extinção do sinal de auto-fluorescência de alguns espécimes biológicos. A auto-fluorescência tem um tempo de vida curto comparativamente ao processo de fluorescência. Assim, mais uma vez, é possível não detetar o sinal indesejado, atrasando a *gate* em relação ao pulso de excitação inicial.

### 2.4.1 Sistema Padrão de Aquisição *Time-Gated*

Por norma, um sistema de aquisição *Time-Gated* pressupõe a existência de vários módulos combinados de modo a adquirir imagens [21].

Os componentes essenciais são: um gerador de atrasos temporais, um *Gated Optical Intensifier* (GOI) para a deteção de sinais de fluorescência, uma fonte de excitação, uma câmara CCD e um computador para controlar todo o sistema.

## GOI

Um GOI permite a aquisição de fótons em *gates* bem definidas e a taxas temporais específicas. Este componente é composto por um fotocátodo, um MCP e um ecrã de fósforo. A largura da *gate* é definida com base no pulso de tensão aplicado ao fotocátodo, assim este pulso determina quando irá ocorrer a aquisição de fótons.

Os fótons são convertidos em eletrões no fotocátodo sendo, de seguida, amplificados no MCP de acordo com o ganho definido. Estes eletrões será novamente convertidos em fótons no ecrã de fósforo e, por fim, são detetados na câmara CCD.

## Fonte de Excitação

Na técnica de aquisição *Time-Gated* um sistema de lasers gera um pulso que servirá de *trigger* para iniciar a aquisição do sinal de fluorescência. O utilizador pode gerar atrasos temporais entre a excitação da amostra e a abertura da *gate* de aquisição para evitar a presença de sinais de fundo.

Como mostra a figura 2.12, o sistema de lasers emite um sinal de excitação para a amostra e um sinal de *trigger* para o GOI originando a abertura da *gate* para aquisição do sinal. O computador controla todos os módulos presentes no sistema.

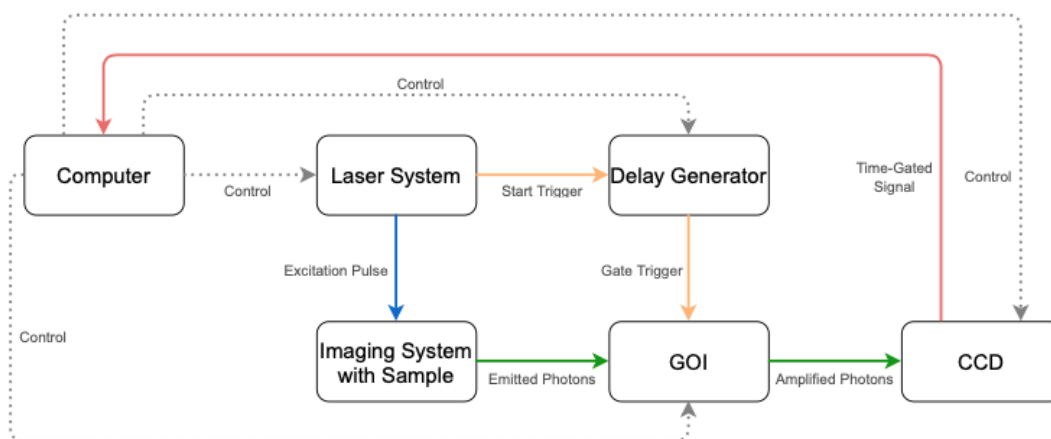


Figura 2.12: Componentes de um sistema típico de aquisição *Time-Gated*. [22]

# Capítulo 3

## Implementação do Sistema de Tomografia de Projeção Ótica

### 3.1 Instrumentação

#### 3.1.1 Componentes do Sistema

O projeto desenvolvido resulta da combinação de instrumentos que nos permitem operar nos dois modos, apresentando as características necessárias à obtenção de imagens fidedignas e de boa qualidade.

O sistema implementado é composto por vários instrumentos, entre os quais, uma fonte de luz visível, uma lente objetiva, uma câmara CCD, um intensificador de imagem, um suporte rotativo, controladores remotos, um osciloscópio e geradores de funções e ondas.

#### Fonte de Luz Visível

A fonte de luz visível (figura 3.1) utilizada foi a *Fiber-lite DC-950*. Tem como base uma lâmpada halogénea de quartzo de 150 W e o seu objetivo é a iluminação da amostra de modo a evidenciar a estrutura da mesma.

Este instrumento apresenta um controlo manual de intensidade, de 0% a 100%, que nos permite criar uma iluminação controlada sobre a amostra de modo a que não sejam causados danos nos restantes componentes. A lâmpada possui uma saída por um *bundle* de fibra ótica. A potência de saída apresenta uma flutuação inferior a 0,4% comparativamente às fontes de luz AC que apresentam uma variância de cerca de 2% [23].



Figura 3.1: Fonte de Luz Visível - Fiber-lite DC-950.[23]

### Câmera CCD

A câmara utilizada é uma ORCA 100 C4742-95 monocromática da *Hamamatsu*. Oferece uma boa relação sinal-ruído e uma resolução de 1,3 milhões de píxeis. Permite um controlo remoto completo através do computador, tem um ruído de leitura típico baixo e um sistema de arrefecimento de *Peltier* com a finalidade de diminuir a corrente no escuro. Para além disto, apresenta ainda as especificações mencionadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Especificações elétricas da câmara ORCA 100 C4742-95 monocromática da *Hamamatsu*.

| Especificações               | Valor                    |
|------------------------------|--------------------------|
| Temperatura de Funcionamento | 5°C                      |
| Número efetivo de píxeis     | 1344(H) × 1024(V)        |
| Ruído de Leitura             | 8 eletrões r.m.s         |
| Tamanho do píxel             | 6,45µm × 6,45µm          |
| Área Sensível                | 8,66 µm × 6,60µm         |
| Resolução ADC                | 12 bits                  |
| Corrente no Escuro           | 0,8 eletrões/píxel/s rms |
| Gama Dinâmica                | 18000 eletrões           |



Figura 3.2: Câmera CCD - ORCA 100 C4742-95.

### Intensificador de Imagem

Um intensificador de imagem tem como principal função intensificar o sinal luminoso proveniente da amostra. Assim, o sinal que chega à câmara CCD é mais intenso

que o existente após a passagem pela amostra. Estes dispositivos são capazes de intensificar um sinal aplicando um ganho elevado e apresentam um *gating* de elevada velocidade. Este último permite a obtenção de imagens de fenómenos rápidos, que ocorrem em períodos de tempo curtos.

O intensificador de imagem utilizado no sistema é o C9546-03 [24] da *Hamamatsu* e está representado na figura 3.3. Apresenta uma eficiência quântica de 15% e uma resposta espectral abrangente entre os 185 nm e os 900 nm, englobando a região do visível. Funciona com uma janela de sinal com duração mínima de 3 ns e um ganho ajustável. Para além disso, possui um circuito de proteção contra iluminação excessiva, prevenindo danos irreparáveis.

O controlador externo do intensificador de imagem permite o controlo do ganho e do modo de aquisição de imagem, sendo possível optar pelo modo contínuo ou modo *gate*.



Figura 3.3: Intensificador de Imagem e o respetivo controlador remoto.[24]

### Objetiva

A objetiva utilizada foi a LSM03-BB- É uma lente otimizada para sistema de tomografia de coerência ótica, mas pode ser utilizada em diversos sistemas óticos. A sua performance está otimizada para dois intervalos de valores de comprimento de onda: entre os 810 nm e os 890 nm e entre os 1000 nm e os 1100 nm.

Apresenta uma distância focal efetiva de 36mm, uma distância de funcionamento de 25mm e um campo de visão máximo de  $9,4 \times 9,4mm^2$ .



Figura 3.4: Objetiva LSM03-BB. [25]

### Suporte Rotativo

De forma que a amostra seja irradiada em todo o seu perímetro é necessária a existência de um suporte rotativo que permita o movimento de  $360^\circ$ . Para este projeto foi escolhido o suporte *PRMTZ8* da Thorlabs (figura 3.5).

Quanto maior for o número de projeções tiradas e, conseqüentemente, quanto menor for o intervalo angular entre as mesmas, mais fidedigna será a imagem 3D final. Existia assim a necessidade de ter um suporte que conseguisse fornecer passos angulares pequenos na ordem de  $1^\circ$ .

O *PRMTZ8* é um suporte rotativo compacto constituído por um motor de passo (DC Servo) e uma plataforma rotativa com marcações angulares. Apresenta na zona dos zero graus um intervalo de limitação de movimento que garante a posição nula precisa com uma variância de  $\pm 0,2^\circ$ . Este ponto é importante uma vez que garante que partindo desta posição para as seguintes os passos angulares são bem medidos.

Como referido no início do capítulo, existe um controlador físico associado ao suporte rotativo. O controlador K-Cube™ DC Servo [42] controla de forma remota o motor de passo do suporte rotativo.

Esta unidade de controlo é bastante compacta e é composta por um ecrã onde é apresentada informação relativa ao movimento, mostrando o passo do motor e a posição angular no momento da leitura. Para além disso tem na sua constituição um painel de controlo manual e portos de entrada que podem ser configurados independentemente.

Existe a possibilidade de exercer um controlo de forma totalmente computadorizada usando o software *kinesis*, da Thorlabs, ou utilizando um conjunto de ferramentas presentes no *MATLAB* conhecido como *Image Acquisition Toolbox*.



Figura 3.5: Suporte Rotativo PRMTZ8 e o controlador remoto K-Cube™ DC Servo.[27]

### Osciloscópio

O osciloscópio digital utilizado é o *Tektronix TDS 210*, apresenta uma largura de banda de 60MHz e uma taxa de amostragem de 1GS/s nos dois canais existentes.

Tem como principal funcionalidade, no sistema projetado, a visualização de sinais que irão controlar a aquisição de imagens.

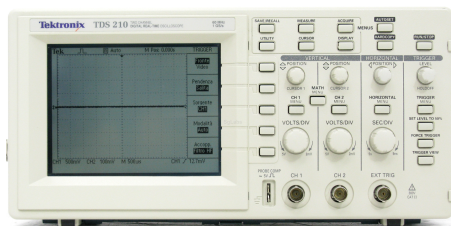


Figura 3.6: Osciloscópio digital - Tektronix TDS 210 [28]

### Gerador de Funções

O gerador de funções utilizado é o Wavetek 50 MHz (modelo 81). Existem diversos modos de operação neste gerador entre os quais o modo *gated*, que será importante no projeto.



Figura 3.7: Gerador de Funções - Wavetek 50 MHz (modelo 81). [29]



## Gerador de Ondas

O gerador de ondas utilizado é o Rigol DG5102. Existe a possibilidade de gerar ondas arbitrárias, entre as quais, a onda de decaimento exponencial aplicada ao LED.



Figura 3.8: Gerador de Ondas - Rigol DG5102. [30]

### 3.1.2 Montagem do sistema

A figura 3.8 representa a montagem do sistema de tomografia de projeção ótica projetado.

Analisando da esquerda para a direita, está apresentado na figura o controlador do motor de passo do suporte rotativo, seguido da fonte de luz visível. Ao centro está a amostra sobre numa cuvete transparente de vidro, de  $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ , e o suporte rotativo colocado acima da mesma. À direita encontra-se a objetiva conectada ao intensificador de imagem que, por sua vez, está ligado à câmara CCD e o controlador externo do intensificador de imagem. Na zona superior, da esquerda para a direita, está o osciloscópio e o gerador de funções sob o anterior.

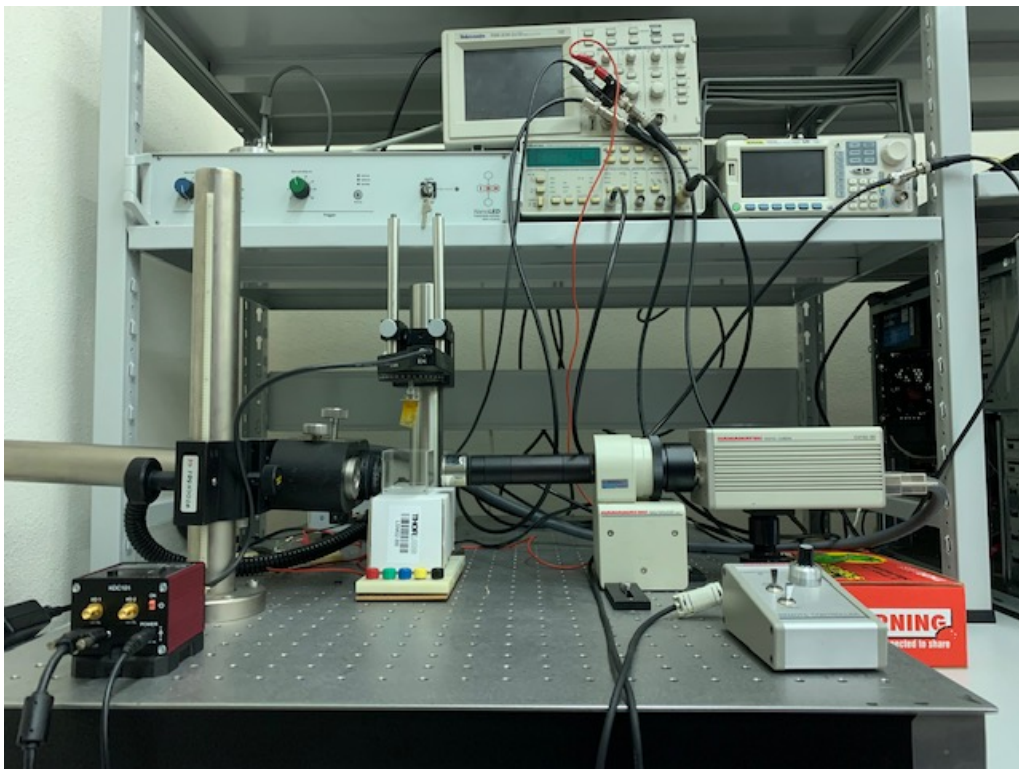


Figura 3.9: Montagem do Sistema de Projeção Ótica.

## 3.2 Descrição do Software

O software utilizado neste trabalho pode ser dividido em duas funções: a aquisição das imagens e o processamento das mesmas.

### 3.2.1 Software de Aquisição

#### Código MATLAB

Para adquirir de forma totalmente remota as projeções desejadas, foi criado um programa *MATLAB* que permite controlar não apenas a câmara e algumas das suas características, como também o movimento do motor de passo.

O código escrito encontra-se em anexo e está dividido em diferentes blocos com funcionalidades distintas.

O bloco inicial diz respeito à conexão do hardware ao computador. É lida informação proveniente dos dispositivos de aquisição de imagem disponíveis utilizando uma função pré-existente: *imaqhwinfo*. De seguida é feita a inicialização do software de controlo do suporte rotativo, o *kinesis*, que irá permitir o controlo do passo angular no movimento de rotação da amostra. É necessário definir algumas propriedades como, por exemplo, a posição inicial do movimento na escala do suporte, utilizando o *device.StartPolling*, e os tempos de espera entre o envio das propriedades definidas ao hardware e o início do movimento.

Após garantir o funcionamento da câmara e do suporte rotativo, é feito o controlo do que irá ser observado quando se iniciar a aquisição de imagens. É inicializado um objeto vídeo com as características obtidas pela função *imaqhwinfo*, sendo definidas propriedades como o *TriggerRepeat* e o *ExposureTime*. A primeira diz respeito ao número de vezes que o *trigger*, que dá início à aquisição de dados, é executado pelo objeto, e a segunda define o tempo de exposição da câmara ao sinal proveniente da amostra.

Uma vez definidas todas as propriedades necessárias, é inicializado o objeto vídeo recorrendo à função *start*, é escolhido o destino das imagens retiradas e o passo angular que irá definir o movimento do suporte rotativo. No final, o objeto é terminado utilizando a função *stop*, é verificada a posição do suporte rotativo e o mesmo é desconectado do computador.

## Image Acquisition Toolbox

A *Image Acquisition Toolbox* [31] (figura 3.9) permite a exploração, configuração e a aquisição de dados a partir de dispositivos de aquisição de imagem suportados pela aplicação.

Uma forma mais rápida de visualizar os dados adquiridos pelo sistema de imagem passa por utilizar o ambiente de trabalho desta aplicação. Este ambiente é composto por uma área dedicada à visualização e aquisição de imagens e uma área composta pelos parâmetros de aquisição possíveis de serem controlados.

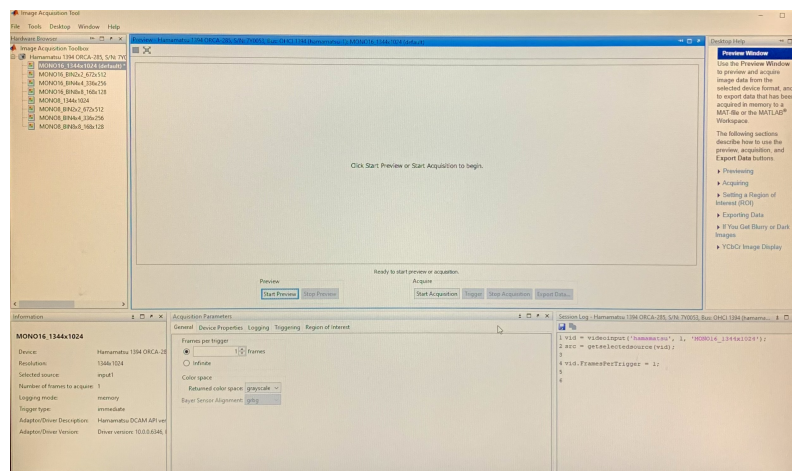


Figura 3.10: Ambiente de trabalho do *imaqtool*.

Comparativamente ao código escrito, esta aplicação permite alterar as configurações da aquisição e ver as alterações aplicadas de forma dinâmica aos dados da imagem.

### 3.2.2 Software de Processamento

O *ImageJ* é um software de domínio público baseado em java e destinado ao processamento de imagens científicas. É extensível e amplamente usado tendo a seu favor inúmeros *plugins*, representados na figura 3.11, para que seja possível realizar as mais diversas tarefas de acordo com as necessidades de cada utilizador.

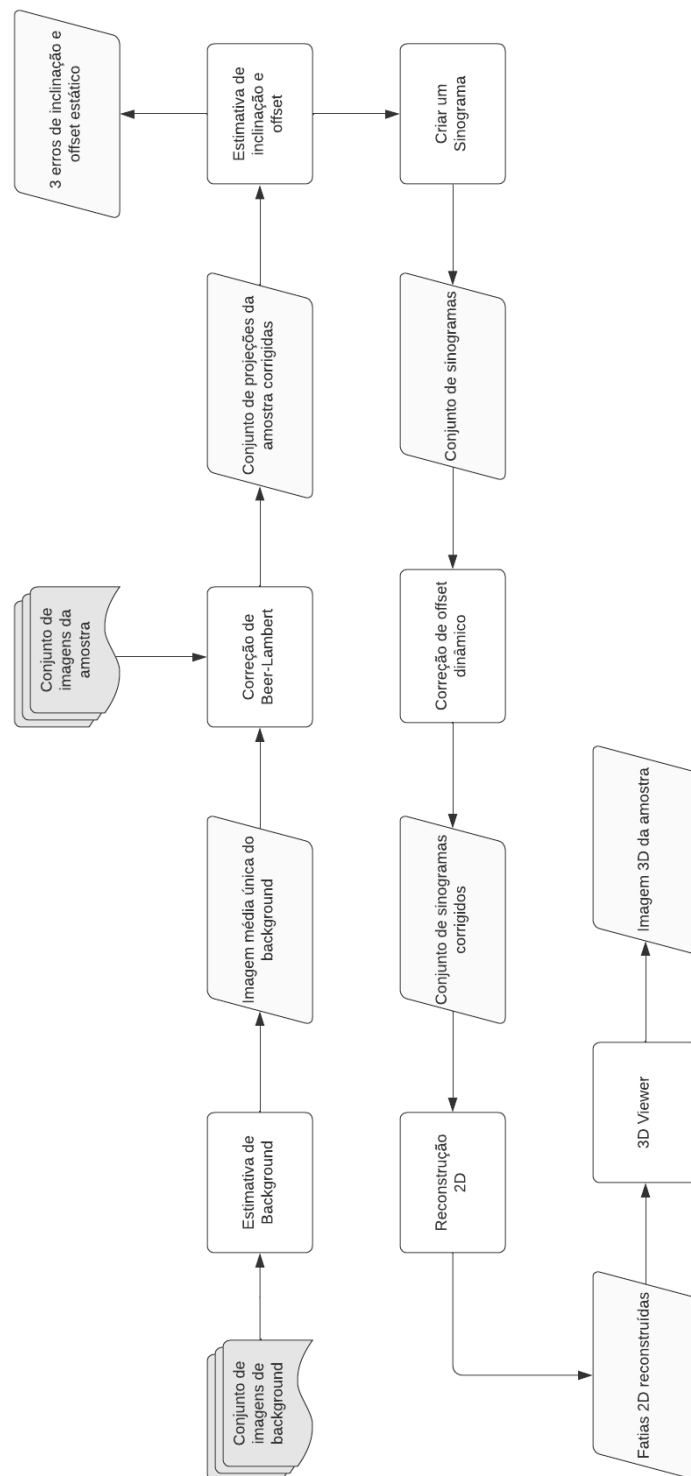


Figura 3.11: Fluxograma de Processamento de Imagem.

## Conceitos Básicos

O *ImageJ* [32] surge no ambiente de trabalho como uma janela que, de acordo com as instruções básicas, não deve ser maximizada (figura 3.11). Esta é composta por um separador que contém o menu, um que apresenta as ferramentas disponíveis e um último que mostra o estado e o progresso do processamento das imagens. Tudo o que sejam imagens ou gráficos são exibidos em janelas adicionais. Os resultados das medições são exibidos na janela "Resultados" que abrirá após os mesmos serem obtidos.

A janela do *ImageJ* é composta por três separadores: o que diz respeito ao menu, o de ferramentas de análise disponíveis e, por fim, o que mostra o progresso e o estado do processamento da imagem.

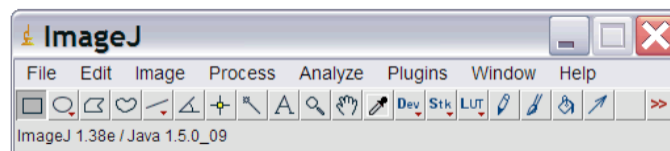


Figura 3.12: Ambiente de trabalho do *ImageJ*.

O software em causa permite a apresentação, em simultâneo, de várias imagens no ecrã em diversas janelas. O *ImageJ* suporta imagens em escala de cinza (8bit, 16bit e 32 bit) e imagens a cores (8 bits e 32 bits). As imagens de 16 bit e 32 bit não conseguem ser diretamente mostradas nos ecrãs dos computadores uma vez que os monitores apresentam, tipicamente, apenas 256 tons de cinzento. Devido a este pormenor, as imagens são todas mapeadas para uma imagem de 8 bit.

As funcionalidades do *ImageJ* podem ser aumentadas através da instalação de mais *plugins*. Estes permitem o suporte de novos formatos de imagem, fornecem novos filtros de análise e novos algoritmos de reconstrução.

Para este trabalho, em concreto, foi escolhido instalar um conjunto de *plugins* de processamento de imagem presentes em [13]. Este conjunto de ferramentas tem o nome de *OptiJ*.

## Processamento de Imagem

Antes de iniciar o processamento dos conjuntos de imagens adquiridos, é importante realçar que, para utilizar o *OptiJ*, é necessário ter um conjunto de imagens de fundo (sem a amostra) e um conjunto de imagens da amostra em análise, ambos retirados nas mesmas circunstâncias.

Após a aquisição dos conjuntos de imagens mencionados, é iniciado o processamento para obter uma reconstrução final da amostra.

Inicialmente é feito o *upload* do conjunto de imagens de fundo, sendo aplicado logo de seguida o *plugin* de estimativa de fundo (figura 3.12). Este faz a média das imagens introduzidas e apresenta como saída uma única imagem de fundo, ou seja, atua como um filtro passa-baixo.

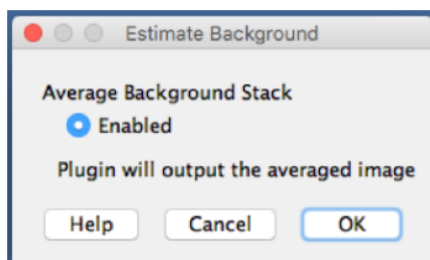


Figura 3.13: Interface do *plugin* de Estimativa de *background*.

Introduzindo no software o conjunto de imagens da amostra, é aplicada a Correção de *Beer-Lambert*. Este segundo *plugin* (figura 3.13) tem em consideração a projeção, ou conjunto de projeções da amostra, e a imagem única de fundo, ou conjunto de imagens de fundo, e aplica a lei de *Beer-Lambert*.

A lei de *Beer-Lambert* descreve a forma como a atenuação da luz se relaciona com as propriedades do meio que está a atravessar. Para aplicar a lei é assumido que o feixe que irradia a amostra é monocromático, colimado e orientado ortogonalmente à amostra, que deve ser homogénea, não dispersando a radiação.

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon(\lambda) \cdot d \cdot c \quad (3.1)$$

$A(\lambda)$  é a absorvância,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção em  $cm^{-1}M^{-1}$ ,  $d$  é a espessura da amostra e  $c$  é a concentração molar do meio em M.[33]

De acordo com [13], o *plugin* de correção de *Beer-Lambert* corrige heterogeneidades na iluminação das projeções, ou seja, obtém os coeficientes de atenuação linear corrigidos para os píxeis de intensidade não uniforme.

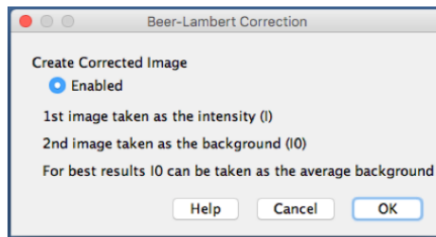


Figura 3.14: Interface do *plugin* de Correção de *Beer-Lambert*.

A aplicação da estimativa de inclinação e *offset* (figura 3.14) é opcional, pois é necessária a presença de um marcador fiducial na amostra, que pode estar ou não disponível. No caso deste projeto seria importante considerar esta correção, uma vez que o *hardware* não é 100% fiável. Podem existir erros provenientes de pequenos deslocamentos da amostra no momento de aquisição devidos ao *jitter* mecânico do motor de passo. Em suma, este *plugin* ao seguir um marcador fiducial no conjunto de imagens da amostra está a determinar se o eixo de rotação é paralelo ao campo de visão da câmara durante todo o movimento. Caso não o seja, são extraídos valores de correção de modo a corrigir os desvios, minimizando artefactos de sombra na reconstrução final.

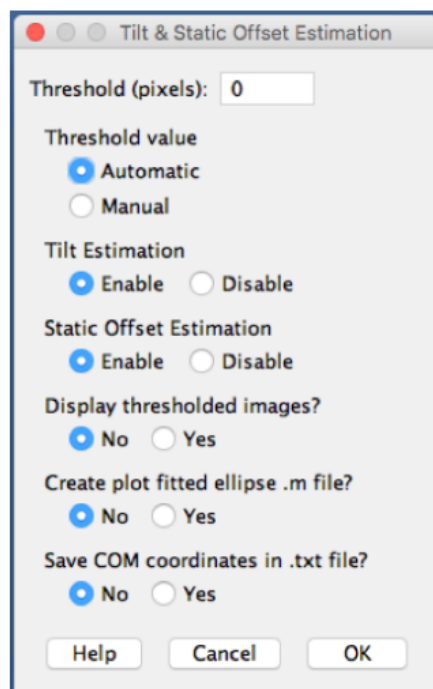


Figura 3.15: Interface do *plugin* de Estimativa de inclinação e *offset*.



O *plugin* de criação de sinograma pode ser usado como um *plugin* independente para qualquer conjunto de projeções que seja utilizado como entrada. De forma geral, é introduzido um conjunto de imagens e aplicada uma transformada de *Radon* a cada uma das projeções resultando num conjunto de sinogramas. Na aplicação deste *plugin* introduzem-se os valores de correção de inclinação e *offset* (figura 3.15).

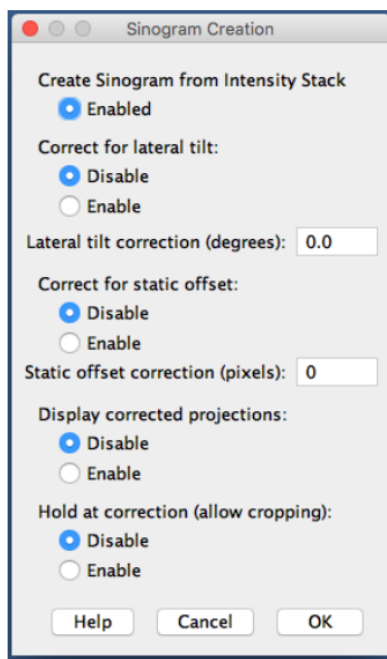


Figura 3.16: Interface do *plugin* de Criação de Sinograma.

A correção de *offset* dinâmico (figura 3.16) é viável apenas se o *plugin* de correção de inclinação e *offset* for aplicado primeiro. Esta correção tem como ponto de partida o conjunto de sinogramas e as coordenadas espaciais do marcador fiducial.

Aqui o software calcula uma tendência sinusoidal do movimento do marcador fiducial e usa a diferença entre a tendência ideal e o movimento real do mesmo para produzir um sinograma livre de *jitter*. Este *plugin* serve para diminuir as bordas irregulares presentes nos sinogramas iniciais.

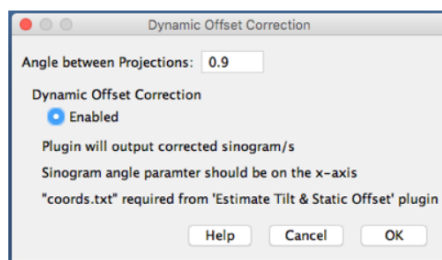


Figura 3.17: Interface do *plugin* de Correção de *offset* dinâmico.

Na reta final de processamento, é aplicado o *plugin* de reconstrução 2D fazendo uso de filtros de reconstrução presentes no software como retroprojeção filtrada (FBP) ou retroprojeção (BP) para obter fatias 2D reconstruídas e corrigidas da amostra.

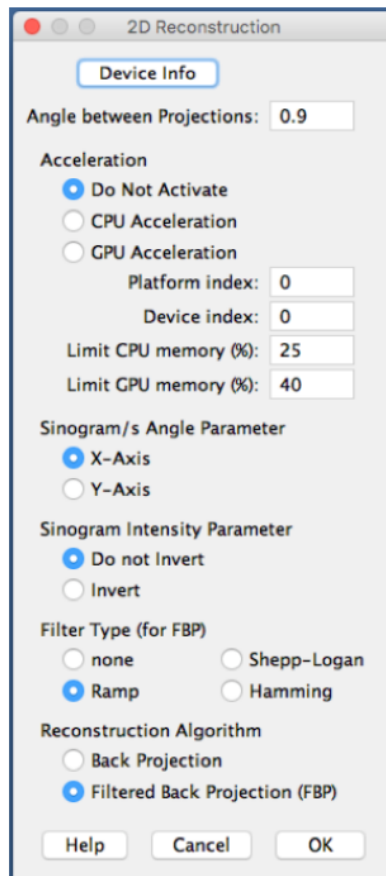


Figura 3.18: Interface do *plugin* de Reconstrução 2D.

Neste ponto, é necessário introduzir alguns dados e definir algumas propriedades para a reconstrução (figura 3.17). Deve introduzir-se o valor do ângulo entre as projeções, ou seja, o passo angular de rotação definido para o motor de passo; decidir se o processamento das imagens será feito em série ou em paralelo, diminuindo o tempo de processamento; definir qual o eixo do sinograma em que se encontra o parâmetro angular.

Para além destes é ainda importante definir se há necessidade de inverter os valores de intensidade do sinograma.

Nas propriedades que dizem respeito aos filtros de reconstrução, a escolha das características depende do algoritmo utilizado. Caso se escolha utilizar o algoritmo de retroprojeção filtrada (FBP), pode ser escolhido um de três filtros existentes: Ram-Lak, *Shepp-Logan* e Hamming.

Estes três filtros [34] realçam as altas frequências presentes nas projeções, diferindo na forma como apresentam o contorno das mesmas após o processamento. O filtro de Ram-Lak apresenta um contorno mais definido, enquanto que o filtro de Hamming apresenta contornos mais suaves e menos ruído associado.

Na figura 3.18 estão representações gráficas do ganho,  $G(q)$ , em função da frequência,  $q$ , para os diferentes tipos de filtros acima mencionados. É possível observar a diminuição de definição dos contornos dos mesmos.

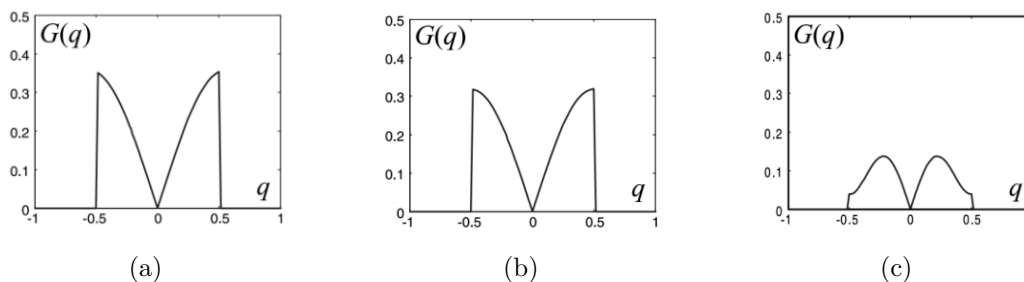


Figura 3.19: Diferentes filtros utilizados para a aplicação de FBP no *plugin* de reconstrução 2D. Filtro de Ram-Lak (a), Filtro de Shepp-Logan (b) e filtro de Hamming (c).[34]

### Visualização 3D

O *3D Viewer* [35] é um *plugin* do *ImageJ* que oferece uma visualização acelerada de conjuntos de imagens utilizando a biblioteca java 3D.

Os conjuntos de imagens podem ser exibidos sob a forma de volumes ou superfícies, após a conclusão do processamento.

Após serem obtidas as projeções 2D finais, inicia-se o *plugin 3D Viewer* e, na primeira interface disponível (figura 3.19), é escolhida a forma como o conjunto de imagens deve ser mostrado. Neste caso, será escolhido o modo volume.

De seguida abrirá uma janela composta pelo nome do ficheiro; a cor, que deve ser a original do conjunto das imagens; o fator de reamostragem, que no caso de existir um número elevado de projeções deve ser aplicado para tornam a renderização mais eficiente; e os canais de cor que devem ser apresentados no volume final.

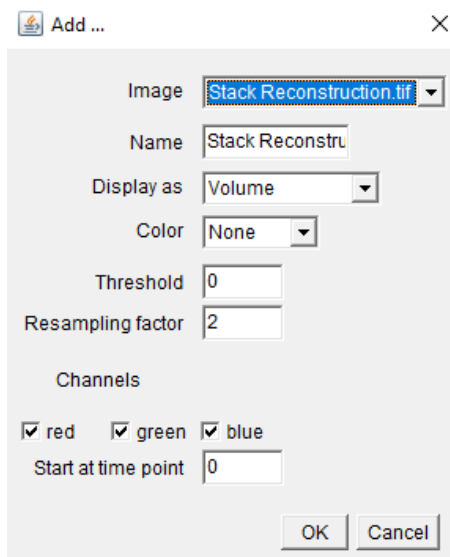


Figura 3.20: Interface do *plugin 3D Viewer*.



# Capítulo 4

## Caracterização do Sistema

### 4.1 Requisitos do Sistema

Os requisitos do sistema são definidos fazendo uma análise assertiva e direcionada ao objetivo do trabalho.

Estes requisitos são divididos em duas categorias: funcionais e não-funcionais. Os primeiros dizem respeito à função para a qual o sistema foi desenhado, ou seja, representam aquilo que o sistema irá permitir fazer; os segundos incluem as medidas características do sistema que podem representar limitações no seu desempenho. Estes últimos encontram-se sintetizados na tabela 4.1.

O principal requisito funcional do sistema diz respeito à obtenção de imagens 3D utilizando amostras de tamanho mesoscópico.

Tabela 4.1: Requisitos não-funcionais do sistema.

| Parâmetro                              | Valor Numérico          |
|--|-------------------------|
| Campo de Visão                         | $4 \times 3mm^2$        |
| Profundidade de Campo                  | $20mm - 30mm$           |
| Resolução Temporal para Fluorescência  | $10^{-6} s - 10^{-9} s$ |
| Resolução Temporal para Fosforescência | $10^{-3} s - 1 s$       |

## 4.2 Medidas Características

### 4.2.1 Campo de Visão

Para a caracterização do sistema ótico foi realizada a medição do campo de visão da câmara CCD. Para este efeito utilizei um alvo teste (USAF 1951) de modo a obter a imagem de um padrão bem definido que me permitisse a medição fidedigna do tamanho do FOV.

#### Alvo de Teste USAF 1951

O alvo de teste *USAF 1951*, figura 4.1, permite inferir acerca da resolução ótica microscópica de um sistema de imagem fazendo uso do padrão MIL-STD-150A da força aérea americana.

Este é composto por 9 grupos cada um com 6 elementos, perfazendo no total 54 elementos-alvo possíveis de serem analisados. Individualmente, apresentam uma frequência espacial precisa e característica.

Para obter um valor numérico para o campo de visão do sistema em causa poderiam ser consideradas duas medições: o número de pares de linhas por milímetro ou a largura de uma linha em micrómetros. Neste caso em específico optei pela segunda opção.

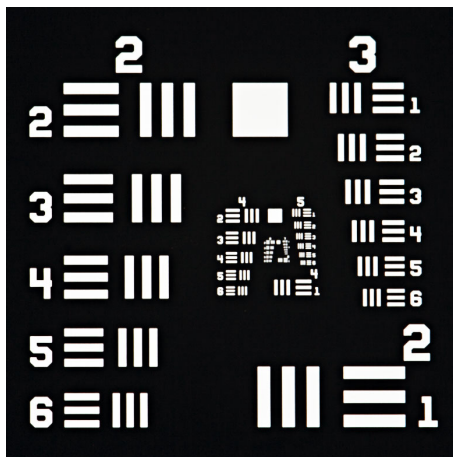


Figura 4.1: Alvo-teste USAF 1951 usado para a medição do FOV do Sistema de Tomografia de Projeção Ótica.

## Medição

Para obter um valor para o FOV é necessário, usando o sistema ótico, obter uma imagem das linhas do elemento que melhor resolução individual aparente. Ou seja, deve-se escolher, ao observar a imagem obtida, o que apresente as linhas completamente distinguíveis entre si. O alvo-teste deve ser colocado no plano focal da objetiva de detecção para uma medição o mais correta possível.

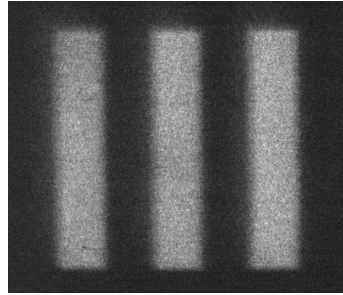


Figura 4.2: Imagem adquirida do alvo-teste USAF 1951 utilizando o sistema. A imagem corresponde ao elemento 0 do grupo 1.

| Element | Group Number |         |        |        |        |       |       |       |      |      |      |      |
|---------|--------------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|------|------|------|------|
|         | -2           | -1      | 0      | 1      | 2      | 3     | 4     | 5     | 6    | 7    | 8    | 9    |
| 1       | 2000.00      | 1000.00 | 500.00 | 250.00 | 125.00 | 62.50 | 31.25 | 15.63 | 7.81 | 3.91 | 1.95 | 0.98 |
| 2       | 1781.80      | 890.90  | 445.45 | 222.72 | 111.36 | 55.68 | 27.84 | 13.92 | 6.96 | 3.48 | 1.74 | 0.87 |
| 3       | 1587.40      | 793.70  | 396.85 | 198.43 | 99.21  | 49.61 | 24.80 | 12.40 | 6.20 | 3.10 | 1.55 | 0.78 |
| 4       | 1414.21      | 707.11  | 353.55 | 176.78 | 88.39  | 44.19 | 22.10 | 11.05 | 5.52 | 2.76 | 1.38 | 0.69 |
| 5       | 1259.92      | 629.96  | 314.98 | 157.49 | 78.75  | 39.37 | 19.69 | 9.84  | 4.92 | 2.46 | 1.23 | 0.62 |
| 6       | 1122.46      | 561.23  | 280.62 | 140.31 | 70.15  | 35.08 | 17.54 | 8.77  | 4.38 | 2.19 | 1.10 | 0.55 |

Figura 4.3: Largura de uma linha em micrómetros no alvo de teste USAF 1951

Após a obtenção da imagem da figura 4.2 realizei a medição do tamanho do conjunto de linhas usando as ferramentas presentes no *ImageJ*. Para além disso registei a dimensão da janela onde surge a imagem.

Tabela 4.2: Valores obtidos na medição de parâmetros para a obtenção do FOV do sistema implementado.

| Parâmetro                      | Tamanho (píxel) |
|--------------------------------|-----------------|
| Dimensão do Conjunto de riscas | 415             |
| Janela de visão                | 672x512         |



O campo de visão foi calculado conhecendo as coordenadas do elemento que se observa na figura 4.2 e sabendo as suas dimensões de acordo com a tabela da figura 4.4.

Tabela 4.3: Valores obtidos na medição da distância ocupada pelas linhas para a obtenção do FOV do sistema implementado. Determinação da dimensão de um único píxel.

| Parâmetro                       | Valor ( $\mu m$ ) |
|---------------------------------|-------------------|
| Largura de 1 linha              | 500               |
| Tamanho do conjunto de 5 linhas | 2500              |
| Dimensão de 1 píxel             | 6,024             |

Tendo em conta que a dimensão de cada píxel, para determinar o tamanho do FOV basta multiplicar esse valor por cada um dos valores da dimensão da janela de visão (tabela 4.2). Obtém-se assim um campo de visão com as seguintes dimensões:

Tabela 4.4: Valores obtidos para o FOV do sistema implementado.

| Dimensão x | Dimensão y |
|------------|------------|
| 4,048 mm   | 3,084 mm   |

Com esta informação, é seguro inferir acerca do tamanho da amostra a usar. A amostra não deve ter dimensões muito inferiores às do FOV, uma vez que isso resultaria numa menor visualização dos detalhes e iria contra todo o objetivo do sistema implementado.

Assim foi concluído que a amostra a usar deve ter dimensões similares às do campo de visão.

## 4.2.2 Profundidade de Campo

A profundidade de campo é um valor limitado pelas características do sistema. É definida como a distância, entre a posição mais próxima e mais distante da amostra, relativamente à objetiva, que possibilita a obtenção de uma imagem nítida.

No sistema de tomografia de projeção ótica, de modo a obter projeções nítidas, a profundidade de campo deve ser suficiente para incluir pelo menos metade da amostra em análise. Por outro lado, esta propriedade é limitada pelas características da objetiva utilizada.

### 4.2.3 Resolução Temporal

De acordo com o objetivo deste sistema, para adquirir informações funcionais da amostra são utilizados processos de fosforescência. Assim, é necessário ter em conta o tempo médio de vida da substância luminescente usada, pois este deve ser maior que a resolução temporal do sistema de tomografia em uso.

Durante a avaliação do sistema serão medidos tempos de decaimento representativos de processos de fosforescência. Logo, é necessário que o sistema permita medir tempos de decaimento na ordem dos  $10^{-6}$  s.



# Capítulo 5

## Estudo de Fantomas

### 5.1 Introdução

Na área da investigação biomédica é necessário o estudo e avaliação de amostras, que imitem os tecidos alvo, de modo a ajustar o desempenho de sistemas ou dispositivos de imagem.[35]

Para facilitar este ajuste, os fantomas, desenhados especificamente para imitar um dado tecido biológico, podem ser utilizados para garantir que os sistemas estão a funcionar corretamente fornecendo informações fidedignas.

Os fantomas são importantes para o desenvolvimento de técnicas de aquisição de imagem e para a calibração dos sistemas de medição. Permitem a obtenção de informações quantitativas antes de, por exemplo, ensaios clínicos.[37]

Para além destas aplicações, as amostras tem um papel importante na compreensão das características óticas de tecidos biológicos e na descrição da forma como a luz se propaga através dos mesmos.

Apesar de bastante utilizados, a criação destes fantomas tem limitações como um curto tempo de vida útil, ou seja, degradam-se e perdem as suas características óticas iniciais rapidamente. Desta forma, dependendo dos materiais usados, o processo de criação de fantomas pode tornar-se dispendioso.

A necessidade de criar fantomas de baixo custo levou à procura de materiais mais fáceis de adquirir, mais baratos e que, em simultâneo, garantissem a qualidade necessária no momento do uso.

Surgiu, como resposta, um material denominado ágar, um pó seco composto por polissacarídeos de algas marinhas vermelhas.

A escolha deste polímero não é feita ao acaso, é escolhido pela sua capacidade de formar matrizes estáveis que permitem a inclusão de outras substâncias de modo a simular as propriedades óticas e bioquímicas do tecido que se deseja imitar [37].

Não existe ainda um procedimento padrão para a fabricação de fantasmas de ágar, sendo um dos grandes objetivos a concretizar. A existência de um modelo iria permitir uma criação mais rápida e com menos erros associados.

## 5.2 Procedimento de Preparação dos Fantasmas

A preparação dos fantasmas foi baseada no trabalho de *R. Cubeddu et al*, com pequenas adaptações retiradas de [38].

Para dar início ao fabrico dos fantasmas foi necessário verificar a disponibilidade de todo o material necessário e definir as quantidades dos produtos a utilizar.

Tendo por base os estudos apresentados, preparou-se uma solução de ágar. Utilizando uma balança de precisão (PFB, Kern, Germany) pesaram-se 0,5g de ágar (Agarose A9414, Sigma, USA) (figura 5.1a) sendo, de seguida, misturados com 50 ml de água destilada (figura 5.1b).

Depois da mistura ser feita, o gobelé foi colocado sobre uma placa de aquecimento e agitação (1000, Jenway, UK). A mistura é aquecida até aos 90°C de forma lenta e controlada, através de um termómetro integrado num medidor de pH (3510 pH Meter, Jenway, UK), para que o ágar não queime (figura 5.1c). Definem-se os 90°C como temperatura máxima ao longo do procedimento uma vez que o ponto de fusão do ágar numa solução aquosa se encontra no intervalo de 85°C a 95°C.

Após atingir os 90°C, o calor da placa é desligado com o intuito de que a solução arrefeça até à temperatura ótima de 60°C (figura 5.1d) para ser possível adicionar o intralípido (Intralipid 20%, Fresenius Kabi, Portugal)(figura 5.1e).

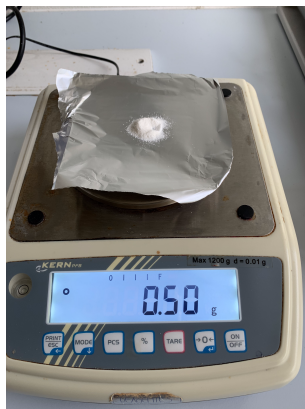
De seguida, continuando o arrefecimento, a solução ao atingir os 40°C é colocada no molde correspondente ao fantoma pretendido. Este último valor corresponde à temperatura de gelificação da solução de ágar, ou seja, é a temperatura a que o polímero em solução aquosa se torna gelatinoso.

Após ser colocada num molde, a solução é deixada a solidificar à temperatura ambiente. Normalmente levará entre 3 a 4 horas até solidificar completamente.

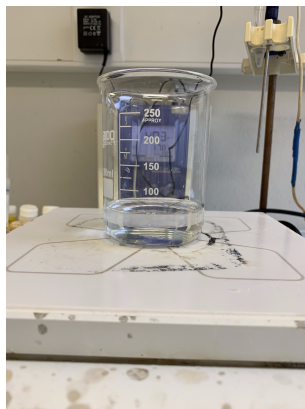
Tabela 5.1: Produtos utilizados para a preparação do fantoma de ágar e intralípido e suas respectivas quantidades.

Composição do Fantoma

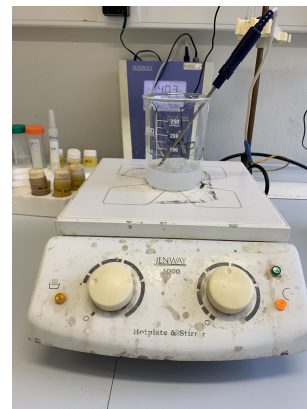
|                 |       |
|-----------------|-------|
| Ágar            | 0,5 g |
| Intralípido 20% | 5 ml  |
| Água Destilada  | 50 ml |



(a)



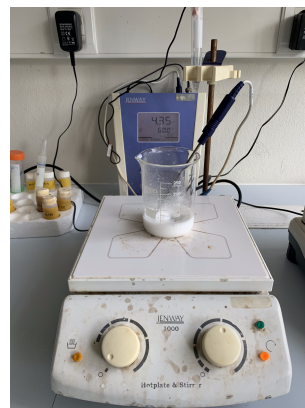
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 5.1: Procedimento para a preparação de um fantoma: (a) pesar o ágar, (b) Medição da quantidade de água destilada, (c) Mistura do ágar com a água destilada sob constante agitação e aquecimento até aos  $90^{\circ}\text{C}$ , (d) Arrefecimento sob constante agitação com um ímã até aos  $60^{\circ}\text{C}$ , (e) Junção do intralípido e agitação até a solução atingir os  $40^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2.1 Design de Fantomas

Para servirem o propósito deste projeto, como descrito no capítulo 3, os fantomas não devem ter dimensões muito inferiores ao campo de visão da câmara CCD usada.

Sabendo que o campo de visão da câmara é de cerca de 4mm x 3mm, o fantoma desejado deverá ter dimensões semelhantes. Deste modo, foi decidido utilizar uma cuvette quadrangular de 5mm de lado e 50 mm de altura para satisfazer os requisitos do sistema.

#### Fantoma com Intralípido 20% Não-Homogéneo

O intralípido adicionado à solução de ágar serve como agente dispersor da luz que passa através do fantoma. Este produto adicional torna ainda maior a semelhança entre a amostra usada para testes e um tecido biológico real.

Como o objetivo do sistema é visualizar as estruturas presentes nas amostras, foram incluídos nos fantomas tubos capilares e, mais tarde, missangas.

Tabela 5.2: Dimensões do tubo capilar inserido no fantoma.

| Parâmetro        | Valor           |
|------------------|-----------------|
| Diâmetro Interno | 1,1 mm - 1,2 mm |
| Diâmetro Externo | 1,5 mm - 1,6 mm |
| Comprimento      | 7,5 mm          |

No caso do uso dos tubos capilares, devido à sua dimensão (tabela 5.2), para o sistema projetado, concluí que a concentração de intralípido utilizada era excessiva e não permitia observar as estruturas colocadas no fantoma.

Contudo, no caso do uso de missangas, o procedimento foi feito de maneira diferente. Depois de selecionadas as missangas cujo tamanho seria o mais próximo possível às dimensões do campo de visão, a solução de ágar e intralípido foi colocada num molde de maiores dimensões. Após solidificar à temperatura ambiente, foi cortada uma parte do fantoma com as dimensões desejadas para ser analisada.

Este novo molde corresponde a um tubo de centrifugação de 2,9cm de diâmetro e 11,5cm de altura.

A visualização das estruturas foi bastante complicada e nada nítida. O problema de visualização poderia estar relacionado com a elevada concentração de IL na amostra, que estaria a tornar a mesma opaca, não permitindo a passagem de luz.

Um terceiro tipo de inclusão que poderia ter sido abordada seria a criação de buracos no fantoma homogêneo enchendo esse espaço vazio com soluções com propriedades óticas diferentes. Isto seria interessante para imitar, por exemplo, uma massa envolvida por tecido biológico saudável.

### **Fantoma de Solução de Ágar**

Uma vez que se tornou complicada a análise de fantomas com intralípido, surgiu a ideia de criar uma fantoma baseado apenas na solução ágar.

Este fantoma foi fabricado tendo por base a receita apresentada inicialmente não acrescentando o intralípido aos 60°C. Com o propósito de analisar esta amostra e verificar o funcionamento correto de parte do sistema, foi introduzido um tubo capilar no interior da cuvete antes da solidificação completa do fantoma. O capilar foi vedado na base de modo a que a solução não invadisse o seu interior.

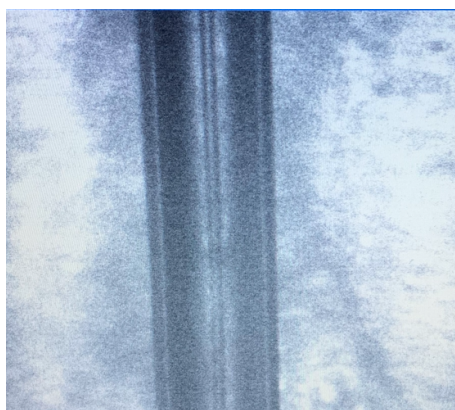


Figura 5.2: Imagem obtida, com o sistema projetado, do fantoma de ágar com inclusão de um tubo capilar.

Na figura 5.2 é possível observar com clareza as estruturas pretendidas. Vê-se com boa definição o tubo capilar e a diferença entre a solução de ágar e o vazio.



## 5.3 Fantoma com material biológico

Qualquer amostra biológica, para ser analisada utilizando um sistema de tomografia de projeção ótica, deve ser óticamente transparente. Isto significa que todas elas devem passar por um processo químico de *clearing*.

### 5.3.1 Processo de *Optical Clearing*

O processo de *clearing* é um processo químico chave para a transparentização do fantoma. Este processo consiste em diminuir a dispersão de luz que ocorre nos tecidos de modo a igualar os índices de refração do meio com o índice de refração do tecido. [38]

Para este efeito usa-se o protocolo BABB [40], também conhecido como clareamento de *Murray*. Consiste na desidratação dos tecidos utilizando etanol e a subsequente utilização de BABB, um composto químico constituído por duas partes de benzoato de benzilo e uma parte de álcool benzílico, para fazer a transparentização da amostra.

Este protocolo deve ser aplicado com cuidado, uma vez que os tecidos tratados apresentam um efeito destrutivo de proteínas fluorescentes. Isto poderá levar a uma drástica diminuição ou extinção de qualquer tipo de fluorescência, o que não seria desejável neste tipo de amostras.

O BABB apresenta uma elevada eficiência na transparentização de vários tipos de tecidos. Após a sua aplicação, é verificado um aumento do fator de encolhimento das amostras, devido à desidratação realizada.

### 5.3.2 Fantoma com Embrião de Rato

De acordo com [10], a transparentização da amostra é feita em oito passos.

Inicia-se o processo cortando uma seringa de 10ml pela marca de 1ml de modo a obter um cilindro plástico com a extremidade aberta. Esta é colocada num suporte com o êmbolo para baixo.

De seguida prepara-se uma solução a 2% de agorose de baixo ponto de fusão, em água pura, proveniente do sistema *milli-Q*. Este sistema permite produzir água ultra-pura através de processos de trocas iónicas. A mistura é mantida no estado líquido através do aquecimento até aos 60°C.

Após alcançar a temperatura desejada, a solução é cuidadosamente colocada na

seringa cortada e é deixada a arrefecer por 10 minutos para que um gel se comece a formar.

Utilizando uma pinça de extremidades suaves, para não danificar o embrião, este é colocado no interior do gel de agarose em arrefecimento. Deve ser prestada especial atenção neste ponto, pois é necessário ajustar o posicionamento da amostra caso haja algum deslocamento.

Depois de encher um recipiente com 200ml de BABB, uma placa de *Petri* com água ultra-purificada e de verificar se a mistura de agarose está completamente solidificada, é reitrado o bloco que contém o embrião da seringa.

O fantoma é cuidadosamente introduzido no interior do recipiente que contém o BABB e coberto com uma folha de alumínio. Deve ser colocado no frigorífico por 72h, mudando a solução de BABB a cada 24h.

### **Montagem do Fantoma no Sistema**

Para se conseguir analisar o fantoma com base em movimentos rotativos, é necessário que este se encontre fixo ao suporte de maneira correta. Para isso, foi utilizada cola (Super Cola 3 Original 3g), um anel metálico e um íman forte de pequenas dimensões. No centro do suporte rotativo, foi colocado um parafuso m6 para servir de ponto de contacto com o íman.

Antes de realizar a colagem do anel metálico ao bloco de agarose é preciso, utilizando um papel sem fibras, limpar o excesso de BABB da amostra para que exista aderência entre ambas as partes. De seguida o anel deve ser pincelado com a super-cola e posto rapidamente no topo da amostra, esperando o tempo necessário para que o conjunto seque.

Após garantir que está tudo fixo e no local correto, o íman é colocado em contacto com o anel metálico. Este procedimento deve ser realizado com cuidado para não danificar o fantoma.

O conjunto acima mencionado é introduzido no sistema de imagem utilizando o parafuso existente no suporte rotativo.

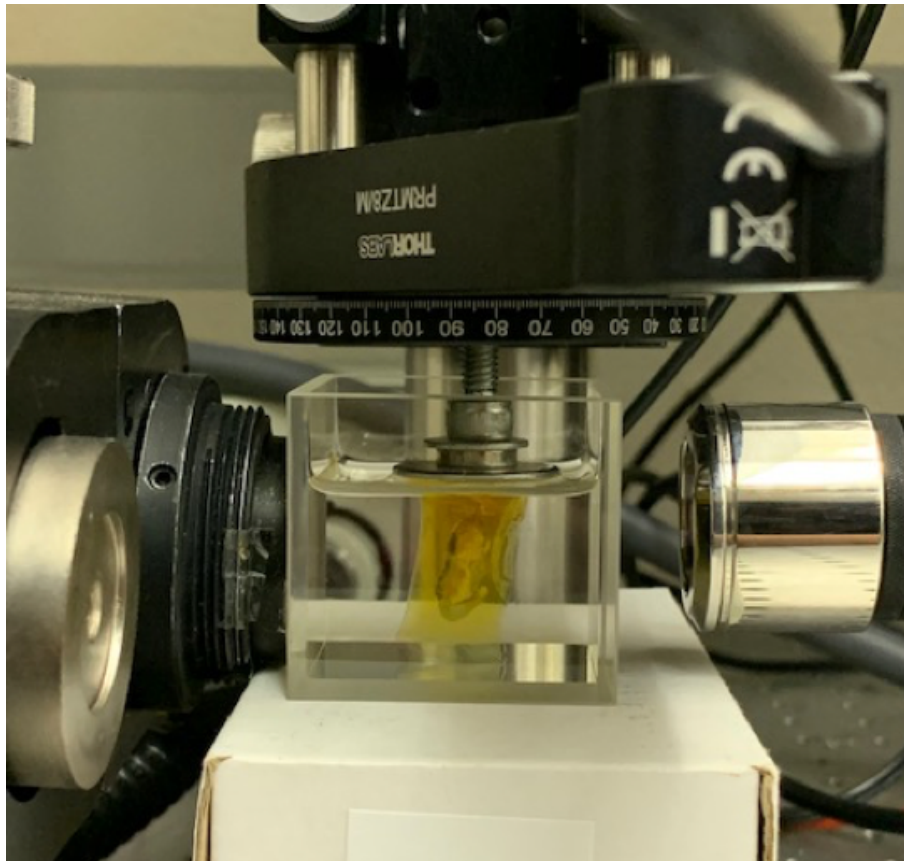


Figura 5.3: Montagem do fantoma no suporte rotativo.

### Método de Aquisição de Imagens

Para adquirir as projeções correspondentes ao fantoma com a inclusão do embrião, é necessária a existência de tinas quadradas que possam ser enchidas com o BABB. A forma quadrada não é um acaso, pois permitirá diminuir o efeito de dispersão de luz que ocorre nas superfícies curvas, diminuindo assim a probabilidade de existência de artefactos nas imagens.

No momento que antecede a obtenção das imagens, a tina é enchida com uma quantidade suficiente de líquido, de modo a submergir a amostra por completo. A amostra é colocada no seu interior e são aplicados movimentos de pequenos passos angulares, adquirindo uma imagem por casa posição angular.

# Capítulo 6

## Avaliação do Sistema

### 6.1 Alinhamento do Sistema

O alinhamento do *hardware* do sistema de tomografia de projeção ótica é essencial para uma aquisição de imagens bem sucedida.

É importante entender se a câmara CCD está alinhada com a fonte luz e se o suporte rotativo permite o alinhamento da amostra com a câmara.

#### 6.1.1 Testagem do Alinhamento

Para conseguir perceber se os componentes mencionados estão alinhados foi decidido desenhar uma peça para o efeito.

O objetivo consistia em ter algo de dimensões similares ao campo de visão da câmara e que pudesse ser colocado no suporte rotativo facilmente. Não existindo ainda um objeto para a realização destes testes, recorreu-se à utilização da impressora 3D.

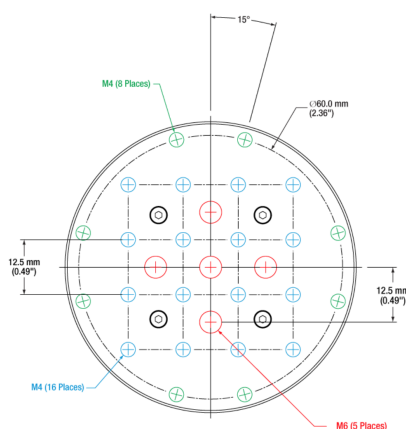


Figura 6.1: Tipos de aberturas na plataforma do suporte rotativo PRMTZ8/M.

O esquema do suporte rotativo é mostrado na figura 6.1.

A ideia inicial passou por colocar um peça cilíndrica no orifício central do suporte rotativo. Sendo uma entrada M6, a base do cilindro deveria ter um diâmetro interno de cerca de 6mm com uma zona de 1mm de diâmetro ao nível do percurso de aquisição (figura 6.2). Devido a limitações da impressora 3D utilizada, esta seria uma peça muito frágil e dificilmente poderia ser concretizada por falta de robustez.

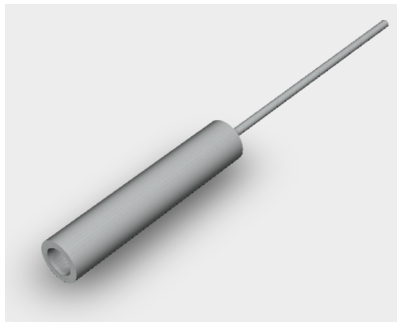


Figura 6.2: *Design* da peça inicialmente idealizada para o alinhamento do sistema.

Com o intuito de criar uma peça mais robusta surgiu a ideia de um desenho composto por duas partes: uma base em forma de prisma quadrangular e uma haste cilíndrica de 1mm de diâmetro (figura 6.3).

De modo a colocar a peça de alinhamento no suporte rotativo foram utilizados quatro parafusos M6 colocados nas posições marcadas a vermelho na figura 6.1. Das cinco posições existentes foram utilizadas as quatro que permitiam formar a base quadrada do prisma.

De acordo com as medidas apresentadas na *datasheet* do suporte rotativo PRMTZ8 e na figura 6.1, foram calculadas as dimensões da peça.

Tabela 6.1: Dimensões da peça de alinhamento desenhada utilizando o software *Autodesk Inventor*.

| Parâmetro                        | Valor  |
|----------------------------------|--------|
| Dimensão Lado da Base            | 30 mm  |
| Altura do Prisma                 | 50 mm  |
| Diâmetro Interno Entrada da Base | 6,6 mm |
| Comprimento Entrada da Base      | 20 mm  |
| Diâmetro da Haste                | 1 mm   |
| Altura da Haste                  | 60 mm  |

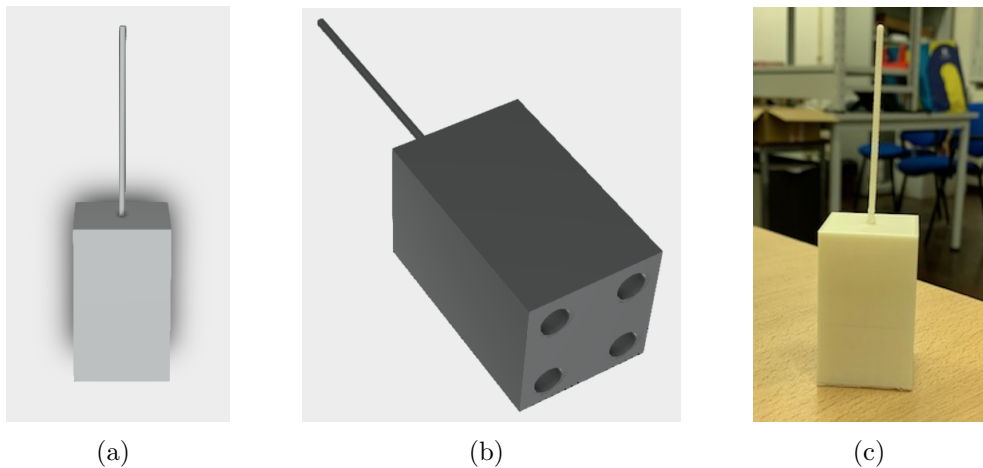


Figura 6.3: *Desing* da peça utilizada (a)/(b) e peça obtida após a impressão 3D (c).

### Método Utilizado

Para testar o alinhamento do sistema ótico, o método utilizado consistiu em colocar a peça no suporte rotativo, rodar o mesmo várias vezes tirando uma imagem antes da rotação (figura 6.4a) e no final da mesma (figura 6.4b). Para verificar que a aquisição está a ser feita de forma correta, não devem ser observadas grandes diferenças, a não ser ao nível da intensidade, entre as imagens obtidas.

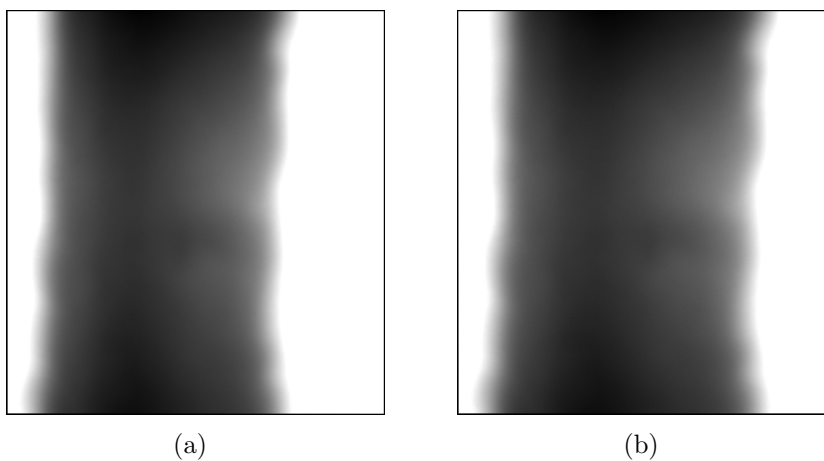


Figura 6.4: Imagens utilizadas para testar o alinhamento do sistema. Imagem tirada antes (a), e após terminar o conjunto de 4 rotações (b).

Após obter as imagens apresentadas em 6.4, foi utilizado o software de processamento para verificar se o eixo de rotação do objeto era paralelo ao campo de visão da câmara utilizada.

Para isso, foi selecionada uma zona da imagem que funcionou como marcador de posição. Este teste gerou um valor de inclinação do eixo de rotação em relação à sua

posição ideal de 7,017°. Este valor pode ser corrigido no momento de processamento da imagem.

## 6.2 Geração de Sinal de Aquisição *Time-Gated*

É pretendido que o sistema meça tempos de vida de fosforescência. Para avaliar essa capacidade seria necessário ter disponível uma sonda fosforescente conveniente.

Optou-se pela utilização de um LED com emissão no verde de modo a simular o funcionamento da sonda fosforescente. Para testar o sistema, foi necessário garantir que a emissão de LED apresentava um perfil de decaimento exponencial.

O processo de medição do tempo de vida de fosforescência obriga a que a câmara seja utilizada no modo *gated*. Para tal, é necessário gerar o sinal de *gate*. É também necessário que o início desse mesmo sinal possa ser definido de forma livre relativamente ao início do perfil de decaimento exponencial da emissão do LED.

Para o teste do sistema no modo *Time-Gated* foram conjugados três instrumentos: um osciloscópio e dois geradores de sinais, já apresentados na secção 3.1.1 (figura 6.5).

Tabela 6.2: Características da onda de decaimento exponencial gerada.

| Característica | Valor |
|----------------|-------|
| Frequência     | 1 MHz |
| Amplitude      | 3,0 V |
| Offset         | 1,5 V |
| Fase           | 0°    |

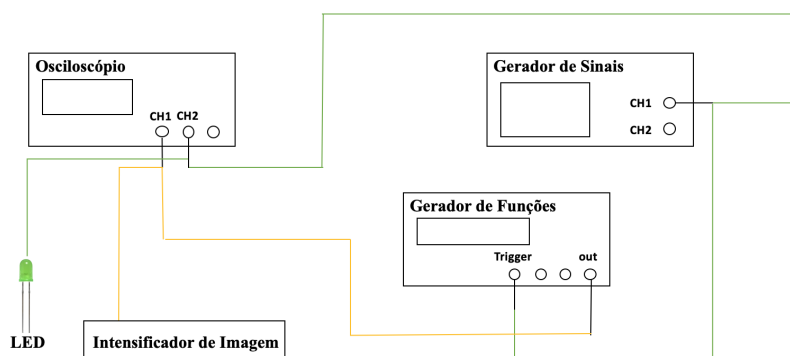


Figura 6.5: Montagem para geração do sinal de controlo de *gate*.

O funcionamento da montagem apresentada na figura 6.5 baseia-se na interação entre os geradores. A onda de decaimento exponencial é o sinal de saída do gerador de sinais e vai servir de *trigger* para o gerador de funções. Ao mesmo tempo será aplicada ao LED, de modo a que este inicie um decaimento possível de ser observado com o sistema montado.

Ao receber o sinal de *trigger*, o gerador de funções emite um pulso positivo. Este é o sinal de *gate* que é transmitido ao intensificador de imagem garantindo o controlo da aquisição e que esta ocorre apenas durante o tempo correspondente à largura do pulso gerado.

Tanto o gerador de sinais como o gerador de funções estão conectados ao osciloscópio para que, durante todo o procedimento, seja possível observar os sinais existentes (figura 6.6) e efetuar as medições necessárias.

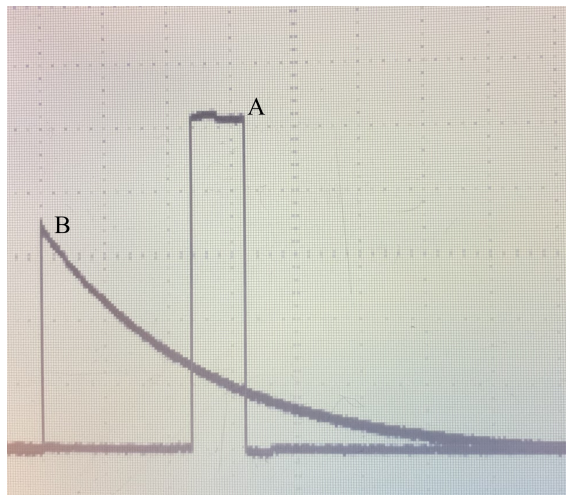


Figura 6.6: Sinais visualizados no osciloscópio. (A) Sinal de *gate*; (B) Sinal de decaimento exponencial.

### 6.3 Controlo do Tempo de Exposição

De modo a saber se o tempo de exposição da câmara está a ser bem controlado, foi definido um método de teste. Este método baseia-se em adquirir várias imagens com tempos de exposição diferentes, utilizando uma *gate* fixa.

Alterando o tempo de exposição na interface do *imaqtool*, foram adquiridas 8 imagens e tempos de exposição crescentes (tabela 6.4) e igualmente espaçados até se atingir a saturação luminosa.



Devido ao ganho do intensificador de imagem estar no seu valor mais alto, o tempo de exposição máximo utilizado foi de 0,45 segundos. De acordo com as especificações da câmara, o tempo de exposição máximo permitido é de 10 segundos. Este pode ser aplicado utilizando o ganho mínimo do intensificador.

Tabela 6.3: Contagens médias obtidas para diferentes tipos de tempo de exposição. O erro apresentado é o desvio padrão.

| Tempo de Exposição (s) | Contagens Médias |
|------------------------|------------------|
| 0,10                   | 548,47           |
| 0,15                   | 720,73           |
| 0,20                   | 892,36           |
| 0,25                   | 1065,10          |
| 0,30                   | 1248,20          |
| 0,35                   | 1407,30          |
| 0,40                   | 1570,30          |
| 0,45                   | 1750,20          |

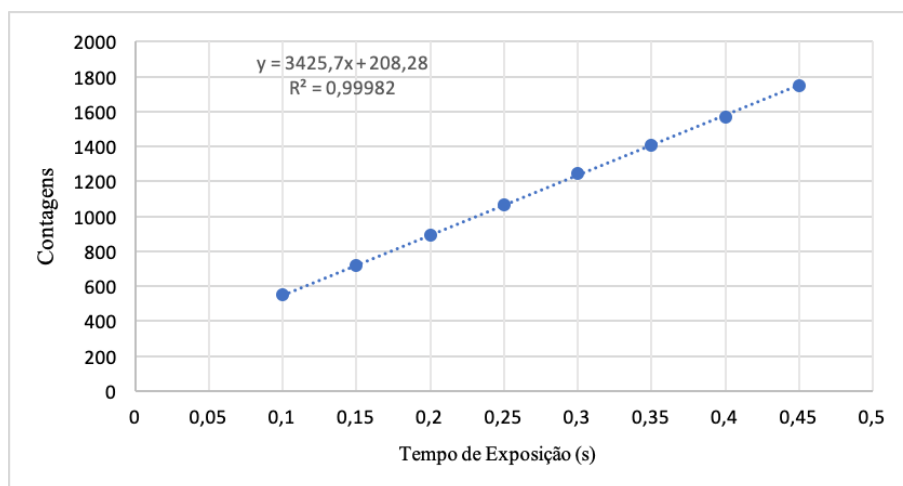


Figura 6.7: Representação gráfica do número de contagens médias em função do tempo de exposição.

Com base nos valores da figura 6.7, pode concluir-se que, aumentando o tempo de exposição, o número médio de contagens aumenta linearmente. É possível afirmar que o tempo de exposição da câmara está a ser corretamente controlado utilizando o *MATLAB*.

## 6.4 Medição do Tempo de Decaimento

O gerador de sinais permite gerar vários tipos de ondas, incluindo a de decaimento exponencial utilizada neste projeto.

Nele são definidas características como a amplitude do sinal, o *offset* e a frequência (tabela 6.2).

Tabela 6.4: Características do pulso positivo gerado.

| Característica | Valor        |
|----------------|--------------|
| Amplitude      | 7,40 V       |
| Largura        | 0,84 $\mu s$ |

Para realizar a medição do tempo de decaimento utilizou-se um fotodíodo de modo a monitorizar directamente a emissão do LED. O sinal do fotodíodo foi convertido em tensão e visualizado no osciloscópio.

O valor de tempo de decaimento medido no osciloscópio é considerado como sendo o valor de referência (*ground-truth*).

Para verificar a exactidão do sistema na medição de tempos de vida, usou-se o sistema para medir o tempo de decaimento da emissão do LED, usando para tal o método RLD.

### 6.4.1 Medição do Tempo de Decaimento no Osciloscópio

De modo a medir o tempo de decaimento da curva exponencial gerada pelo sistema foi utilizado um amplificador de fotodíodo (Thorlabs PDA 200C). Permitindo observar no osciloscópio a curva de decaimento da luz (figura 6.8).

Para obter um tempo de decaimento com o qual fosse possível comparar as medições obtidas com o software, recorreu-se à leitura e análise de valores do osciloscópio.

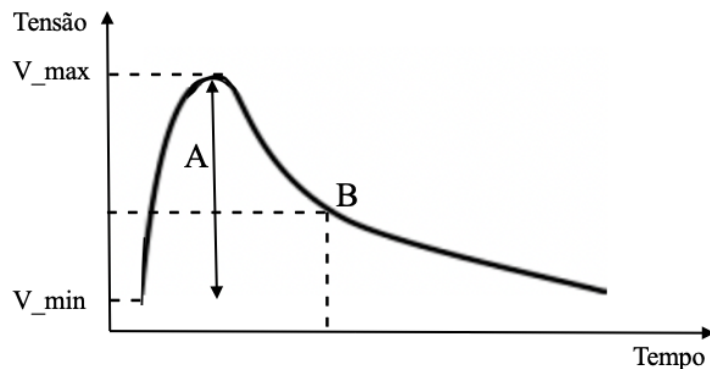


Figura 6.8: Representação esquemática da curva de decaimento do LED visualizada no osciloscópio utilizando um amplificador de fotodíodo.

O valor obtido utilizando este método de leitura foi de  $112\mu s$ . Este tempo será considerado o valor verdadeiro do tempo de decaimento do LED, sendo utilizado como referência para medições posteriores.

#### 6.4.2 Medição do Tempo de Decaimento - Técnica de RLD

Este método tem por base a análise de imagens e a aplicação da técnica de *Rapid Lifetime Determination*.

Para medir o tempo de decaimento da luz do LED foi obtido um conjunto de medidas para várias posições da janela de aquisição.

Com um dado intervalo temporal e conhecendo com precisão o instante em que a *gate* inicia, são adquiridas imagens ao longo da curva de decaimento. As aquisições devem ser feitas com *gates* sempre da mesma largura podendo haver sobreposição entre as mesmas.

Antes de iniciar o processo é adquirida uma imagem de *background*, sem a presença da luz proveniente do LED, que servirá para eliminar as contagens relativas à iluminação.

Inicia-se a aquisição da primeira imagem com a *gate* posicionada o mais próxima possível do pico, escolhendo um tempo de exposição que garanta que não ocorre saturação. De seguida a janela de aquisição é movida ao longo de toda a curva de modo a obter um conjunto de imagens em que cada uma corresponde a uma *gate* diferente.

### ***Rapid Lifetime Determination***

A RLD é uma técnica matemática que permite avaliar, de forma rápida, tempos de vida em decaimentos exponenciais. [41]

Trata-se de um conjunto de algoritmos que utiliza zonas da curva exponencial para obter os parâmetros relativos ao decaimento como, por exemplo, o tempo de vida. Assim o tempo de vida de fluorescência,  $\tau$ , associado a uma curva de decaimento,  $F(t, \tau)$ , pode ser determinado utilizando duas imagens ( $I_A$  e  $I_B$ ). Estas imagens correspondem a duas *gates* de igual largura ( $\Delta t$ ) colocadas em diferentes pontos da curva.

$$F(t, \tau) = F_0 \left( e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (6.1)$$

$$\tau = \frac{-\Delta t}{\ln I_B / I_A} \quad (6.2)$$

### **Medições**

Após escolher as posições das *gates*, que correspondem a diferentes fases do pulso quadrado, é possível adquirir as imagens mencionadas anteriormente. É necessário reduzir as mesmas à sua região de interesse, ou seja, à região da imagem onde existe informação relativa ao LED. Este processo é realizado em dois passos: primeiro é necessário encontrar a posição do valor máximo de contagens na matriz da imagem e, de seguida, deve ser realizada uma limitação da mesma em torno do ponto máximo. Neste caso foi delimitada uma matriz de dimensão  $200 \times 200$ .

Introduzindo a equação 6.2 e os parâmetros necessários à sua resolução no MATLAB obtêm-se os tempos de vida da luz emitida pelo LED verde. Todo o processamento das imagens é feito trabalhando com variáveis do tipo *.mat* e o resultado final corresponde à média dos valores gerados pela técnica *Rapid Lifetime Determination*.

Para estas medições o ganho externo do intensificador de imagem foi colocado no máximo e foram obtidos três pares de imagens ( $Im_0/Im_1$ ,  $Im'_0/Im'_1$  e  $Im_2/Im_3$ ).

Tabela 6.5: Parâmetros de aquisição das imagens utilizadas no 1º teste realizado. É utilizado um tempo de exposição de 0,3s.

| $Im_i$ | Fase | Início de Gate ( $\mu s$ ) | Média de Contagens |
|--------|------|----------------------------|--------------------|
| $Im_0$ | 70   | 44                         | 949,6              |
| $Im_1$ | -90  | 444                        | 234,5              |

Tabela 6.6: Parâmetros de aquisição das imagens utilizadas no 2º teste realizado. É utilizado um tempo de exposição de 0,4s.

| $Im_i$  | Fase | Início de Gate ( $\mu s$ ) | Média de Contagens |
|---------|------|----------------------------|--------------------|
| $Im'_0$ | 70   | 40                         | 1253,4             |
| $Im'_1$ | -90  | 444                        | 234,5              |

Tabela 6.7: Parâmetros de aquisição das imagens utilizadas no 3º teste realizado. É utilizado um tempo de exposição de 0,4s.

| $Im_i$ | Fase | Início de Gate ( $\mu s$ ) | Média de Contagens |
|--------|------|----------------------------|--------------------|
| $Im_2$ | 80   | 12                         | 1296,7             |
| $Im_3$ | -90  | 444                        | 234,5              |

Tabela 6.8: Tempos de vida obtidos através do método RLD para os diferentes conjuntos de imagens.

| Imagens           | Tempo de Vida ( $\mu s$ ) | Desvio Padrão ( $\mu s$ ) |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| (A) $Im_0/Im_1$   | 110,3910                  | 4,6696                    |
| (B) $Im'_0/Im'_1$ | 108,6697                  | 4,5317                    |
| (C) $Im_2/Im_3$   | 114,3051                  | 4,9715                    |

Os pares de imagens A e B correspondem a posições iguais da janela de aquisição. Esta questão está relacionada com a precisão com que se mediu o instante de início da *gate* no osciloscópio, uma vez que a diferença de tempos entre os inícios ( $\Delta t$ ) influencia fortemente o resultado.

Os resultados obtidos apresentados na tabela 6.8 e mostram que, tanto o sistema de tomografia de projeção ótica montado como o software de aquisição de imagens permitem a medição de tempos de vida na ordem das centenas de microssegundos.

Esta premissa pode ser reforçada comparando os valores obtidos ( $x_0$ ) neste ponto com o valor de referência. Considerando os  $112\mu s$  como sendo o valor mais provável da variável ( $x$ ) em questão, é possível determinar o erro relativo presente na medição realizada neste segundo método.

$$Erro_{Relativo} = \frac{x_0 - x}{x} \cdot 100 \quad (6.3)$$

Tabela 6.9: Erros relativos percentuais associados às medições obtidas utilizando a técnica de RLD.

| Imagens           | Erro Relativo |
|-------------------|---------------|
| (A) $Im_0/Im_1$   | -1,4366 %     |
| (B) $Im'_0/Im'_1$ | -2,9735 %     |
| (C) $Im_2/Im_3$   | 2,0581 %      |

# Capítulo 7

## Conclusão

### 7.1 Conclusão

O sistema foi construído com o intuito de adquirir imagens morfológicas, no modo transmissão, e imagens funcionais, no modo emissão. Ou seja, é pretendido que se faça uso de luz branca para a avaliação das estruturas presentes na amostra e de processos de fosforescência para a visualização de propriedades funcionais dos tecidos biológicos.

O desempenho do sistema ótico foi avaliado testando os diferentes elementos do sistema. O campo de visão obtido foi de  $(4,048 \times 3,064) \text{ mm}^2$  cumprindo o requisito imposto inicialmente. Tanto a resolução temporal como a profundidade de campo foram respeitadas, sendo possível obter imagens nítidas com aquisição *Time-Gated*.

A aptidão do sistema para obter imagens de fosforescência e fluorescência foi testada utilizando, em substituição de uma sonda de fosforescência, um LED que emite luz verde com um perfil de decaimento exponencial. Foi possível concluir que o sistema está apto para medir tempos de vida na ordem das centenas de microssegundos.

Em suma, o objetivo do projeto foi cumprido. Contudo não foi possível realizar testes com tecidos biológicos, nem foi possível testar a reconstrução de imagens de fantasmas físicos. Um dos problemas recorrente neste projeto foi a incapacidade de, ao colocar o fantoma no suporte rotativo, garantir o seu alinhamento com a montagem durante o movimento de rotação para a aquisição de imagens.

## 7.2 Trabalho Futuro

O sistema implementado é relativamente recente, pois engloba a técnica de aquisição *Time-Gated* e utiliza processos de fosforescência para a análise da amostra em questão.

A montagem realizada precisa de ser melhorada para obter, de facto, imagens de maior resolução para realizar a reconstrução 3D utilizando os métodos mencionados nesta tese.

Antes de iniciar a aquisição de imagens, seria interessante medir a profundidade de campo real do sistema, utilizando um alvo, para garantir um posicionamento da amostra o mais correto possível, originando assim imagens ainda mais nítidas que as apresentadas.

Para além da profundidade de campo, de modo a caracterizar de forma mais fidedigna o sistema ótico, pode ser medida a resolução lateral e axial. Para o efeito podem ser utilizadas contas fluorescentes introduzidas num fantoma.

É importante alinhar a posição do fantoma, ou seja, é necessário garantir que o eixo de rotação do fantoma é paralelo ao FOV da câmara CCD. Isto é possível introduzindo no fantoma apenas uma conta fluorescente e aplicando o *plugin* de correção de inclinação e *offset* existente no software de processamento de imagem.

Por fim, uma vez que não me foi possível fazê-lo, o software de processamento de imagem baseado em [1] deverá ser testado para a reconstrução de imagens 3D de amostras biológicas. Isto será o derradeiro teste para ser possível afirmar o correto funcionamento de todo o sistema de OPT.

# Bibliografia

- [1] Sharpe, J. (2003). Optical projection tomography as a new tool for studying embryo anatomy. *Journal of anatomy*, 202(2), 175–181.
- [2] [www.idtools.com.au/optical-projection-tomography/](http://www.idtools.com.au/optical-projection-tomography/)
- [3] E.A. Genina et al. (2016). *Handbook of Optical Biomedical Diagnosis*. Second Edition. Biophotonics, Vol 2, SPIE Editors.
- [4] Marcos Vidal, A., Ripoll, J. (2020). Recent advances in optical tomography in low scattering media. *Optics and Laser in Engineering*, 135, 106191.
- [5] Liu, A., Xiao, W., Li, R., Liu, L. and Chen, L. (2019). Comparison of optical projection tomography and light-sheet fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 275(1), 3-10.
- [6] K. Trull, A., van der Horst, J., Jan Palenstijn, W., J. van Vilet, L., van Leeuwen, T. and Kalkman, J. (2017). Point spread function based image reconstruction in optical projection tomography. *Physics in Medicine Biology*, 62(19), 7784.
- [7] G. Chan, K., Liebling, M. (2017). Direct inversion algorithm for focal plane scanning optical projection tomography. *Biomed. Opt. Express* 8, 5349-5358.
- [8] Williams, Don. What is an MTF? ... and why you should care?. Image Science Associates.
- [9] Miao, Q., Hayenga, J., Meyer, M. G., Neumann, T., C. Nelson, A. and J. Seibel, E. (2010). Resolution improvement in optical projection tomography by the focal scanning method. *Opt. Lett.*, 35, 3363-3365.



- [10] Chen L, Ghilardi M, Busfield JJC, Carpi F. (2021). Electrically Tunable Lenses: A Review. *Front Robot AI*.
- [11] Lingling Chen, Sunil Kumar, Douglas Kelly, Natalie Andrews, Margaret J. Dallman, Paul M. W. French, and James McGinty, (2014). "Remote focal scanning optical projection tomography with an electrically tunable lens". *Biomed. Opt. Express* 5. 3367-3375.
- [12] Colas, J. F. and Sharpe, J. (2009). *Live optical projection tomography*. Taylor & Francis online, 5(4), 211-216.
- [13] Vallejo Ramirez, P.P., Zammit, J., Vanderpoorten O. et al. (2019). OptiJ: Open-source optical projection tomography of large organ samples. *Sci Rep* 9.
- [14] [www.britannica.com/science/luminescence](http://www.britannica.com/science/luminescence).
- [15] [www.jasco-global.com/solutions/phosphorescence-measurement/](http://www.jasco-global.com/solutions/phosphorescence-measurement/)
- [16] [www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro/](http://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro/)
- [17] Baryshnikov Gleb, Minaev Boris, Ågren Hans. (2017). Theory and Calculation of the Phosphorescence Phenomenon. *Chemical Reviews* 117 (9), 6500-6537.
- [18] Frederick A. Villamena. (2017). Fluorescence Technique. *Reactive Species Detection in Biology*, 87-162.
- [19] J McGinty, J Requejo-Isidro, I Munro, C B Talbot, P A Kellett, J D Hares, C Dunsby, M. A. A. Neil, P. M. W. French. (2009). Signal-to-noise characterization of time-gated intensifiers used for wide-field time-domain FLIM. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 42 135103.
- [20] Gerritsen, Hans. Heuvel, DJ. Agronskaia, Alexandra. (2004). High-speed fluorescence lifetime imaging. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*. 5323.
- [21] Figueiredo e Silva, Susana. Time-Gated Fluorescence Lifetime Microscopy Methods and Instrumentation for Metabolic Imaging. Tese de Doutoramento-Eng. Biomédica, Coimbra, Agosto de 2018.
- [22] Dias Machado, Ana Íris. Time-Gated Fluorescence Lifetime Microscope with Light-Sheet Illumination. Tese de Mestrado-Engenharia Física, Coimbra, Outubro

de 2021.

- [23] <https://dolan-jenner.com/products/fiber-lite-dc950-illuminator>
- [24] [www.hamamatsu.com/content/dam/hamamatsu-photonics/sites/documents/99\\_SALES\\_LIBRARY/etd/II\\_TII0007E.pdf](http://www.hamamatsu.com/content/dam/hamamatsu-photonics/sites/documents/99_SALES_LIBRARY/etd/II_TII0007E.pdf)
- [25] [www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=2910&pn=LSM03-BB](http://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=2910&pn=LSM03-BB)
- [26] [www.ucl.ac.uk/centre-for-advanced-biomedical-imaging/imaging/techniques/optical-projection-tomography](http://www.ucl.ac.uk/centre-for-advanced-biomedical-imaging/imaging/techniques/optical-projection-tomography)
- [27] [www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=KPRMTE/M](http://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=KPRMTE/M)
- [28] [www.aa.washington.edu/files/faculty/ojhw/3x3Tunnel/UGinfo/Datasheets/TDS210%20Manual.pdf](http://www.aa.washington.edu/files/faculty/ojhw/3x3Tunnel/UGinfo/Datasheets/TDS210%20Manual.pdf)
- [29] [https://nscainc.com/wp-content/uploads/pdf/WAVE\\_81.pdf](https://nscainc.com/wp-content/uploads/pdf/WAVE_81.pdf)
- [30] [www.manualslib.com/products/Rigol-Dg5102-9093939.html](http://www.manualslib.com/products/Rigol-Dg5102-9093939.html)
- [31] [www.mathworks.com/help/imaq/imageacquisitiontool-app.html](http://www.mathworks.com/help/imaq/imageacquisitiontool-app.html)
- [32] <https://imagej.nih.gov/ij/docs/concepts.html>
- [33] Ilze Oshina, Janis Spigulis. (2021). Beer–Lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations. *J. Biomed. Opt.* 26(10).
- [34] Das Neves Dias Carramate, Lara Filipa. Utilização da MHSP para aplicação à Tomografia Computorizada. Tese de Mestrado-Engenharia Física, Aveiro, 2010.
- [35] <https://imagej.net/plugins/3d-viewer/index>
- [36] [www.spect.com/blog/what-is-a-phantom-how-does-it-work/](http://www.spect.com/blog/what-is-a-phantom-how-does-it-work/)
- [37] Lindokuhle Ntombela, Bamise Adeleye, Naven Chetty. (2020). Low-cost fabrication of optical tissue phantoms for use in biomedical imaging, *Heliyon*, Volume 6, Issue 3.
- [38] Cristina Sérgio Lima, Bruna. Time-Gated System for Measuring Optical Parameters of Dispersive Media. Tese de Mestrado-Engenharia Física, Coimbra, 2019.
- [39] Russo, Ana Alexandra Baptista Martins Moutinho. 3D visualization of tissue

specific vascular patterns for endothelial cell polarity analysis. Tese de Mestrado-Biologia Molecular e Genética, Lisboa, 2016.

[40] Yanjing Zhan, Haoyan Wu, Linfeng Liu, Jie Lin, Shiwen Zhang.(2021). Organic solvent-based tissue clearing techniques and their applications, Journal Of Biophotonics.

[41] Silva, Susana. Domingues, José P.. Morgado, António Miguel., "Accurate Rapid Lifetime Determination on Time-Gated FLIM Microscopy with Optical Sectioning", Journal of Healthcare Engineering, vol. 2018, Article ID 1371386, 7 pages, 2018.

# Anexos

## Anexo A

### Model DC-950 Fiber Optic Illuminator

**Dolan-Jenner**

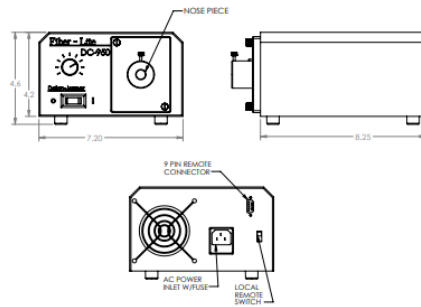
#### ORDERING INFORMATION

| Model  | Power Cord          | Nosepiece         | Filter               |
|--------|---------------------|-------------------|----------------------|
| DC-950 | 0 115V (N. America) | H 25mm            | No Filter            |
|        | 1 230V (Euro)       | HB 15mm           | F IR Filter Included |
|        | 4 230V (UK)         | HR 25mm with Iris |                      |

#### GENERAL SPECIFICATIONS

| Performance Data   |  |
|--|--|
| Lamp   | EKE 150 Watt, 21 V, quartz halogen                                       |
| Lamp Output  | 1750 Lumens, at fiber optic intersection plane                           |
| Electrical Data  |  |
| Input  | 100-240 VAC 50/60 Hz Univ. AC  |
| Fuse   | 3 AMP, 250V, Slo-Blow  |
| Physical Description                                       |  |
| Dimension  | 7.25" x 9.50" x 4.69"  |
| Weight   | 11.5 lbs.  |
| Intensity Control  | Solid State 0 - 100%   |
| Lighting Properties  |  |
| Lamp Life  | 200 hrs. at full intensity / up to 10,000 hrs. at lower levels           |
| Color Temp.  | 3250° Kelvin at max. intensity   |
| Fiber Optic Interface                                      | DC950H - 1.0 in. dia.<br>DC950HB - 15.0 mm. dia.                         |
| Light Output Regulation                                    | ± 0.5% or better   |
| Output Ripple  | 0.4% or better   |
| Remote Intensity Control                                   | 0-5 VDC analog, optional 8-bit digital, see operating manual for details |
| Replacement Lamp Socket                                    | (Quick Disconnect) 68600902770   |
| Certifications   |  |
| CE, RoHS<br>BV (Curtis Straus) 61010-1 3 <sup>rd</sup> ed. |  |

#### DIMENSIONS



#### FIBER OPTIC INTERFACE OPTIONS

| DC-95x-                              | -H       | -HF      | -HB          | -HBF         | -HR          |
|--------------------------------------|----------|----------|--------------|--------------|--------------|
| Fiber Input Diameter                 | 25mm     | 25mm     | 15mm         | 15mm         | 25mm w/ Iris |
| Manual Iris                          | NO       | NO       | NO           | NO           | YES          |
| IR Filter & Holder Included          | NO       | YES      | NO           | YES          | YES          |
| Accepts Fiber Adapters               | SX-, MX- | SX-, MX- | SX-5B, SX-6B | SX-5B, SX-6B | SX (non B)   |
| Direct Fit for 15mm "M" Fiber Optics | No       | No       | Yes          | Yes          | No           |

Phone: 800-257-3872 • Fax: 978-264-0292 • setra.com © Setra Systems, Inc. All rights reserved. The Setra Systems name and logo are registered trademarks of Setra Systems, Inc.

Figura 7.1: Datasheet Fonte de Luz Visível.

# Anexo B

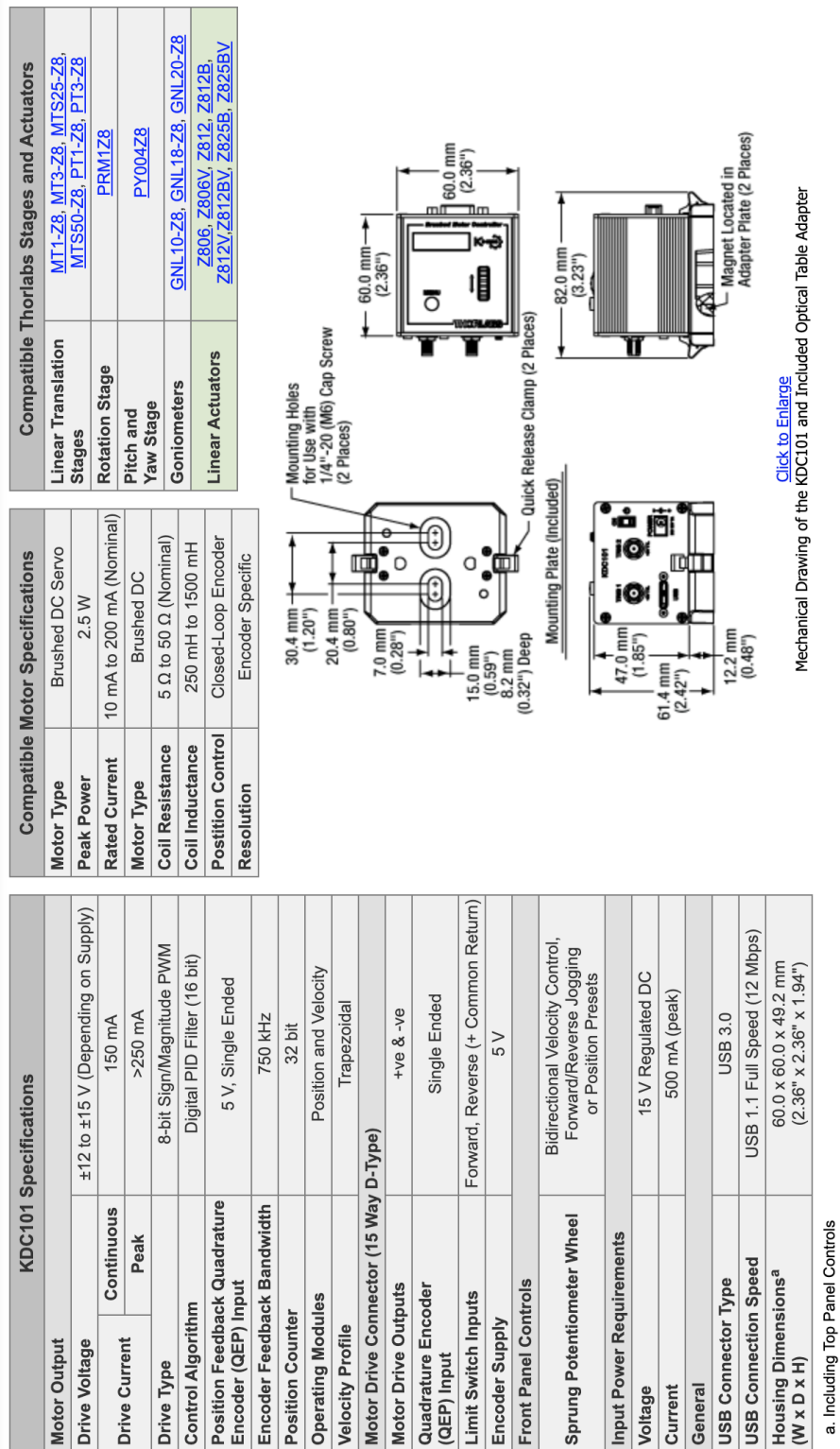


Figura 7.2: Datasheet Controlador Suporte Rotativo.

## Anexo C

### High-speed gated image intensifier units

High-speed gated Image Intensifier (I.I.) unit comprises I.I., high voltage power supply and gate driver circuit. Depending on application, a best gated I.I. unit can be selected from among various models.

The built-in I.I. is available with GaAsP photocathode, multialkali photocathode or GaAs photocathode. The GaAsP photocathode type delivers very high quantum efficiency in visible region ideal for bio-/fluorescence imaging application under a microscope. The multialkali photocathode type offers a wide spectral range from UV (Ultra Violet) to NIR (Near Infrared Region). The GaAs photocathode type has high sensitivity from visible region to NIR. All of gated I.I. units can be operated and controlled from a remote controller or a PC (Personal Computer) via the USB interface.

Input: C-mount, Output: Hamamatsu's relay mount. Screw hole for a tripod can be used for holding.



#### SELECTION GUIDE

| Type No.              | C9546-01, -02          | C9546-03, -04 | C9546-05, -06 | C9547-01, -02 | C9547-03, -04          | C9547-05, -06 | Unit |
|-----------------------|------------------------|---------------|---------------|---------------|------------------------|---------------|------|
| Effective area        | $\phi 17$ <sup>①</sup> |               |               |               | $\phi 25$ <sup>②</sup> |               | mm   |
| Gate time             | 3 ns                   |               |               | 5 ns          | 10 ns                  | 5 ns          | —    |
| Gate repetition rate  | 30 kHz                 |               |               | 30 kHz        |                        |               | —    |
| Spectral response     | 280 to 720             | 185 to 900    | 370 to 920    | 280 to 720    | 185 to 900             | 370 to 920    | nm   |
| Photocathode material | GaAsP                  | Multialkali   | GaAs          | GaAsP         | Multialkali            | GaAs          | —    |

**NOTE:** <sup>①</sup>Effective output area is 12.8 mm × 9.6 mm. Take the effective area of the camera and reduction rate of the relay lens to be used into account.

<sup>②</sup>Effective output area is 16 mm × 16 mm. Take the effective area of the camera and reduction rate of the relay lens to be used into account.

Figura 7.3: Datasheet Intensificador de Imagem.

## Anexo D

| 1 1 Specifications and Other Data        |  |
|--|--|
| 1 1-1 Camera specifications              |  |
| (1) Electrical specifications            |  |
| Imaging element                          | Progressive-scan interline CCD fixed imaging element     |
| Effective no. of pixels                  | 1344 (H) x 1024 (V)                                      |
| Pixel size                               | 6.45 $\mu$ m x 6.45 $\mu$ m square pixels                |
| Sensitive area                           | 8.66 mm x 6.60 mm (2/3-inch size)                        |
| Frame rate                               |  |
| Normal mode                              | 8.3 Hz   |
| 2x2 Binning mode                         | 16 Hz  |
| 4x4 Binning mode                         | 29 Hz  |
| 8x8 Binning mode                         | 45 Hz  |
| Mean readout noise                       | 8 electron r.m.s (Note 1)                                |
| A/D converter resolution                 | 12 bits  |
| Cooling method                           | Electronic cooling + air cooling                         |
| Lens mount                               | C-mount  |
| Amp gain conversion coefficient (Note 2) |  |
|  | 4.6 electrons/AD count      12 bits<br>(18000 electrons) |
| Contrast enhancement gain                | 1~10   |

Note 1) This value is the measured value in normal readout mode. To find this value, the CCD was placed in darkened conditions and the exposure time set to the minimum level. Two images were then read under these conditions and subtraction carried out between the images. The standard deviation of the results was measured and that value was multiplied by the conversion coefficient divided by the square root.

Note 2) The amp gain conversion coefficient is the coefficient used to convert the count value for the measured image to electrons. When the conversion is carried out, dark subtraction must always be done first. The value noted in parentheses below the conversion coefficient indicates the amount of load placed on the CCD if the A/D converter overflows.

Figura 7.4: Datasheet Câmara CCD.

## Anexo E

```

% configure the stage
motorSettings = device.LoadMotorConfiguration(serial_num);
motorSettings.DeviceSettingsName = 'PRM1-Z8';
% update the RealToDeviceUnit converter
motorSettings.UpdateCurrentConfiguration();

% push the settings down to the device
MotorDeviceSettings = device.MotorDeviceSettings;
device.SetSettings(MotorDeviceSettings, true, false);

device.StartPolling(0); %posição de inicio de escala do stage

pause(0.5); %wait to make sure device is enabled

device.Home(timeout_val); %coloca a zero a posição do motor
fprintf('Motor homed.\n');

vid = videoinput('hamamatsu',1); %retirei , 'MON016_1344x1024'

%propriedades do vídeo
vid.TriggerRepeat = inf;
vid_src = getselectedsource(vid); %Access the currently selected video source object
vid_src.Tag = 'motion detection setup';

start(vid)
figure;
preview(vid)

%Informações câmara hamamatsu
imaqhwinfo;
info=imaqhwinfo('hamamatsu');
dev_info=imaqhwinfo('hamamatsu',1);

%Load assemblies
NET.addAssembly('C:\Program Files\Thorlabs\Kinesis\Thorlabs.MotionControl.DeviceManagerCLI.dll');
NET.addAssembly('C:\Program Files\Thorlabs\Kinesis\Thorlabs.MotionControl.GenericMotorCLI.dll');
NET.addAssembly('C:\Program Files\Thorlabs\Kinesis\Thorlabs.MotionControl.KCube.DCServoCLI.dll');

%Initialize Device List
import Thorlabs.MotionControl.DeviceManagerCLI.*
import Thorlabs.MotionControl.GenericMotorCLI.*
import Thorlabs.MotionControl.KCube.DCServoCLI.*

%Initialize Device List
DeviceManagerCLI.BuildDeviceList();
DeviceManagerCLI.GetDeviceListSize();

%Should change the serial number below to the one being used.
serial_num='27259165';
timeout_val=60000; %Não pode ser mais baixo porque não dá tempo de colocar stage na posição de 0º

%Set up device and configuration
device = KCubeDCServo.CreateKCubeDCServo(serial_num);
device.Connect(serial_num);

```

Figura 7.5: Código *MATLAB* para aquisição de imagens.



```
step=36.0; %intervalo angular
ImageFolder = 'C:\Users\GEI\Desktop\Volume_teste_2'; %Pasta para guardar as imagens

for pos = 0.0:step:(360.0-step) %mover desde 0 a 360 em steps definidos
    device.MoveTo(pos, timeout_val);

    im = getsnapshot(vid);
    image(im);

    file_name = sprintf('Image%d.tiff', pos);% name Image with a sequence of number, ex Image1.png , Image2.png...
    imgName = [ImageFolder, '\Image_', num2str(pos), '.tiff'] ;

    imwrite(im, imgName);
    imshow(im)
drawnow
end

stop(vid)

%Check Position
pos = System.Decimal.ToDouble(device.Position);
fprintf('The motor position is %d.\n', pos);

device.StopPolling()
device.Disconnect()
```

Figura 7.6: Código *MATLAB* para aquisição de imagens (continuação).