

Universidade de Coimbra

Faculdade de Ciência e Tecnologia

Departamento de Física



Fluorómetro Ocular – *Upgrade*

Manuel Francisco da Costa Vitor

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Coimbra, Setembro de 2009

Universidade de Coimbra

Faculdade de Ciência e Tecnologia

Departamento de Física



Fluorómetro Ocular – *Upgrade*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para completar os requerimentos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, sob a orientação do Professor Doutor José Paulo Domingues do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Manuel Francisco da Costa Vitor

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Coimbra, Setembro de 2009

Agradecimentos

Ao longo deste extenso trabalho de permanente procura e descoberta, o esforço, a dedicação e a vontade de atingir resultados foram indispensáveis mas seriam insuficientes se para tal não houvesse ainda um conjunto de pessoas a quem, genuinamente, expressarei em seguida o meu agradecimento:

Começo por referir o nome do meu orientador de Projecto, o Prof. Dr. José Paulo Domingues, cujo acompanhamento constante, disponibilidade e saber, me permitiram cumprir os propósitos do trabalho.

Ao Eng. Nuno Varelas pela gentileza e prontidão quando consultado em matéria técnica relativa ao equipamento em desenvolvimento.

À minha família, em particular aos meus Pais e irmã, que sempre me deram todo o apoio e acreditaram nas minhas capacidade. Impecáveis.

Ao meu grande amigo de longa data, Pedro Brochado, pela generosidade e disponibilidade no esclarecimento de questões técnicas de electrónica.

Aos amigos que conheci ao longo do meu percurso académico em Coimbra. Aqui destaco o Fred e o Meneses, pela partilha constante de opiniões, críticas e sugestões no âmbito dos estudos por cada um desenvolvidos durante o presente ano.

Exprimo por fim o meu profundo agradecimento à Patrícia, pelo apoio, companheirismo e pelas vivências proporcionadas e partilhadas, que me permitiram alcançar a paz de espírito e a estabilidade emocional, claramente uma mais-valia ao longo de todo este exigente trabalho.

Resumo

O aspecto central do trabalho apresentado nesta dissertação consiste na efectivação de um *upgrade* ao fluorómetro ocular PAF (*Photodiode Array Fluorometer*). A estrutura do seu desenvolvimento tem por base três grandes subdivisões.

Numa primeira fase tem lugar a apresentação da técnica, fluorometria ocular, o seu fundamento clínico e os objectivos do trabalho (Cap.1).

Num segundo momento - o de matéria mais densa - são descritos com algum detalhe os aspectos técnicos do dispositivo optimizado, o PAF. É de salientar o processo de evolução deste fluorómetro em relação à versão inicial, a descrição do sistema de aquisição de dados, com os seus componentes centrais - *hardware*, os três sensores de imagem utilizados (NMOS SSPDA de 128 píxeis e 256 píxeis; câmara FFT-CCD) e o sistema óptico com os respectivos melhoramentos. O software, como parte integrante do sistema PAF, é descrito ainda nesta fase do trabalho. Com recurso ao MATLAB, desenvolveu-se a interface gráfica existente e criaram-se novos menus, de apoio à calibração dos sensores e de tratamento estatístico dos dados adquiridos pelo sistema. Simplicidade operacional e economia de tempo no processo de calibração foram os maiores proveitos. Um outro programa, o MPLAB, serviu de base às alterações efectuadas no projecto do microcontrolador no sentido de o tornar compatível com todos os sensores usados (na parte que remete à CCD, o código foi gerado de raiz). O OSLO foi a ferramenta utilizada para simular o sistema de lentes do PAF que serviu de apoio à implementação de um desviador (estrutura de alumínio) para a correcção do posicionamento angular dos sensores (Cap.2).

O terceiro grande ponto deste estudo é a discussão dos resultados, concretamente: testes de linearidade, reprodutibilidade e nível mínimo de detecção para os sensores SSPDA; o estudo prático do posicionamento angular do sensor com emprego do desviador angular; testes em pacientes (Cap.3).

A conclusão e o trabalho futuro são os dois capítulos finais e traduzem, respectivamente, a medida de concretização dos objectivos propostos e a

projecção das possíveis evoluções do fluorómetro PAF com vista a uma futura aplicação clínica real, de elevada portabilidade e fiabilidade (Cap. 4 e Cap. 5).

Palavras-chave: Fluorometria Ocular; PAF.

Abstract

The central aspect of the present work in this dissertation consists of an upgrade to the ocular fluorometer PAF (Photodiode Array Fluorometer). The structure of its development is based on three main under divisions.

At first it is presented the technique, ocular fluorometry, its clinical purpose and the goals of the work (Chap. 1).

On a second approach – of denser content - the technical aspects of the optimized device, the PAF, are explained with some detail. Special attention is drawn on the process of evolution of the system in relation to its first version, description of the data acquisition system with its main components – hardware, the three image sensors used (NMOS SSPDA 128 pixels and 256 pixels; FFT-CCD detector) and the optical system with the improvements related. Software, as part of the system PAF, is still described in this phase of the work. Using MATLAB, the existent graphical user interface was improved and new menus were created, to support the sensors calibration and for statistical treatment of data acquired by the system. Operational simplicity and economy of time in the calibration process were the great profits. The MPLAB was the program chosen to do the improvements in the microcontroller project, in order to make it compatible with all sensors used (referring to CCD, the source code was made from zero). OSLO was the tool chosen to simulate the PAF lens system that served as support to the implementation of a deviator (an aluminium structure) for correction of the angular position of the sensors (Chap. 2).

The third main point of this study is the discussion on the results, specifically: linearity, reproducibility and low level of detection tests for the SSPDA sensors; the practical study of the angular position using the angular deviator; tests in patients (Chap. 3).

The conclusion and future work are the last two chapters and they reflect, respectively, the measure of achievement of the goals proposed and the projection of the possible evolutions of the PAF fluorometer in order to a future real clinical application, with high degree of portability and reliability (Chap. 4 and Chap. 5).

Keywords: Ocular Fluorometry; PAF.

Índice

Índice	xiii
Índice de figuras	xvi
Índice de Tabelas	xviii
1. Introdução	1
1.1. <i>Fluorometria ocular</i>	1
1.1.1. Fluorescência	3
1.1.1.1. Fluoróforos – fluoresceína.....	5
1.1.2. Retinopatia diabética.....	7
1.1.3. Instrumentação médica - Oftalmologia – PAF.....	8
1.1.4. Objectivos.....	9
2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF.....	11
2.1. <i>O sistema anterior</i>	11
2.2. <i>Hardware – a nova arquitectura</i>	13
2.2.1. Circuito de amplificação	13
2.2.2. Conversão analogico-digital (ADC).....	16
2.2.3. Microcontrolador – o dsPIC30, principais recursos aplicados.....	17
2.2.4. Comunicação entre o SAD e o PC	18
2.2.5. Alimentação	19
2.3. <i>Sensores</i>	19
2.3.1. NMOS: 128 píxeis e 256 píxeis (SSPDA)	19
2.3.2. Câmara FFT-CCD.....	22
2.3.3. Sensor SSPDA VS FFT-CCD.....	27
2.4. <i>Sistema óptico</i>	28
2.4.1. Optimização do posicionamento angular do sensor SSPDA	30
2.5. <i>Software</i>	36
2.5.1. MATLAB	36
2.5.1.1. Interface gráfica	36
2.5.1.1.1. A versão existente e sua optimização	37
2.5.1.1.1.1. Modo de gravação automática	38
2.5.1.1.1.2. Parâmetros default.....	40
2.5.1.1.1.3. Barra de progressão	41
2.5.1.1.1.4. Ajuste automático da janela de visualização do número de píxeis	41

2.5.1.1.2. Janela de análise de dados.....	42
2.5.1.1.3. Janela de Linearidade/Calibração	48
2.5.1.1.4. Filtro digital	49
2.5.2. MPLAD IDE – O Software do dsPIC	50
2.5.2.1. Estrutura básica.....	50
2.5.2.1.1. Header files	50
2.5.2.1.2. Source files.....	52
2.5.2.2. Principais módulos funcionais	54
2.5.2.2.1. Drive/leitura do SSPDA.....	54
2.5.2.2.2. Drive/ leitura da câmara FFT-CCD	55
2.5.2.2.3. Estrutura de comandos.....	56
2.5.2.2.4. Inicialização/programação de parâmetros	57
3. Resultados	59
3.1. <i>Testes de calibração dos sensores SSPDA (128 píxeis e 256 píxeis)</i>	59
3.1.1. Linearidade.....	63
3.1.2. Reprodutibilidade	69
3.1.3. Nível mínimo de detecção (LMD)	71
3.2. <i>Estudo comparativo entre aquisições com utilização do desviador para optimização do posicionamento angular do sensor SSPDA e sem o uso deste</i>	72
3.3. <i>Testes em pacientes</i>	73
4. Conclusão	74
5. Trabalho em curso e futuro	76
6. Bibliografia	77

Índice de figuras

FIGURA 1 – OLHO HUMANO [1]	1
FIGURA 2 – DIAGRAMA DE JABLONSKI. [12]	4
FIGURA 3 - ESPECTRO DE EXCITAÇÃO E EMISSÃO DA FLUORESCÉINA. [55]	6
FIGURA 4 – VISÃO NORMAL; VISÃO COM RETINOPATIA DIABÉTICA GRAVE. [22]	7
FIGURA 5 – PLACA DO SISTEMA DE AQUISIÇÃO (SAD) DO PAF.	11
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DO CIRCUITO DE AMPLIFICAÇÃO DO SAD DO PAF.	13
FIGURA 7 – ESQUEMA DO AMPLIFICADOR SOMADOR INVERSOR (OPA2613)	14
FIGURA 8 - AMPLIFICADOR SEGUIDOR DE GANHO (OPA2613).....	14
FIGURA 9 – ESQUEMA DO PGA (AD526)	15
FIGURA 10 – ESQUEMA DO <i>BUFFER</i> (OPA2822).....	15
FIGURA 11-ESQUEMA DA ENTRADA DIFERENCIAL DO ADC: SEGUIDOR DE TENSÃO (OPA 2822) E TERRA.	16
FIGURA 12 – MÓDULO DE COMUNICAÇÃO SÍNCRONA (SPI) ENTRE PIC E ADC. [34].....	17
FIGURA 13 - DIMENSÕES DO SSPDA	20
FIGURA 14 – FOTO-SENSIBILIDADE DO SSPDA EM FUNÇÃO DO λ	20
FIGURA 15 – DIAGRAMA DE IMPULSOS DO SSPDA. ADAPTADO DE [38].....	21
FIGURA 16 – CÂMARA FFT-CCD	23
FIGURA 17 - ESTRUTURA DA FFT-CCD. <i>BINNING</i> VERTICAL. [32].....	24
FIGURA 18 – ESQUEMA DOS IMPULSOS CLK E START GERADOS PELO PIC.....	25
FIGURA 19 – ESQUEMA DE IMPULSOS DA CÂMARA FFT-CCD. ADAPTADO DE [33].	26
FIGURA 20 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO SISTEMA ÓPTICO DO PAF. ADAPTADO DE [24].	29
FIGURA 21 – CURVA CARACTERÍSTICA DE UMA AQUISIÇÃO TIPO, COM $A=90^\circ$ E [FLUORESCÉINA] = 100NG/ML.....	30
FIGURA 22 – TRANSMISSÃO DA LUZ ATRAVÉS E UMA CUVETTE. [56].....	31
FIGURA 23 – TRAJECTO DOS RAIOS LUMINOSOS ATRAVÉS DO SISTEMA ÓPTICO DO NOVO PAF. POSICIONAMENTO ANGULAR DO SENSOR. ADAPTADO DE [53] E [44].	32
FIGURA 25 – FOTOGRAFIA DO DESVIADOR ANGULAR DO NOVO PAF.	33
FIGURA 24 – RELAÇÃO DO ÂNGULO DO OBJECTO COM O ÂNGULO DA IMAGEM. [25] ..	33
FIGURA 26 – SIMULAÇÃO DO SISTEMA DE LENTES DO NOVO PAF.	34
FIGURA 27 – RESPOSTA DO DETECTOR EM UNIDADES RELATIVAS DE ADC EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE PÍXEIS DO SENSOR SSPA DE 128 PÍXEIS. A LINHA A TRACEJADO REPRESENTA-SE A CURVA DE AQUISIÇÃO COM A UTILIZAÇÃO DO DESVIADOR ANGULAR NO PAF (ÂNGULO OBJECTO: 30° , ÂNGULO IMAGEM: 55°); A LINHA SÓLIDA REPRESENTA A CURVA DE AQUISIÇÃO SEM O EMPREGO DO DESVIADOR ANGULAR (ÂNGULO OBJECTO: 30° , ÂNGULO IMAGEM: 90°).	35

FIGURA 28 – JANELA DE AQUISIÇÃO E VISUALIZAÇÃO DE DADOS OPTIMIZADA.	38
FIGURA 29 – JANELA GUARDAR FICHEIRO COM AUTOMATIZAÇÃO DO NOME DO FICHEIRO E LOCALIZAÇÃO (PASTA: AQUISICOES).	40
FIGURA 30 – JANELA DE CONFIGURAÇÃO DE PARÂMETROS COM PARÂMETROS DEFAULT PARA SSPDA (À ESQUERDA) E FFT-CCD (À DIREITA).	40
FIGURA 31 – BARRA DE PROGRESSO DA AQUISIÇÃO.	41
FIGURA 32 - BOTÕES DE SELECÇÃO DO NÚMERO DE PÍXEIS DO SENSOR.	41
FIGURA 33 – JANELA DE TRATAMENTO ESTATÍSTICO COM A OPÇÃO DE VISUALIZAÇÃO DE AQUISIÇÃO ESCOLHIDA.	42
FIGURA 34 – OPÇÕES DE VISUALIZAÇÃO NA JANELA DE TRATAMENTO ESTATÍSTICO: NO CANTO SUPERIOR ESQUERDO É ILUSTRADO O GRÁFICO DE VISUALIZAÇÃO DA ZONA DE INTERESSE; NO CANTO SUPERIOR DIREITO MOSTRA-SE O HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES LIDOS À SAÍDA DO ADC; EM BAIXO, É REPRESENTADO O GRÁFICO DO FILTRO APLICADO À CURVA DE AQUISIÇÃO.	43
FIGURA 35 - JANELA DE LINEARIDADE. GRÁFICO DA LINEARIDADE TRAÇADO PARA UM CONJUNTO DE AQUISIÇÕES COM CONCENTRAÇÕES DE FLUORESCÉINA CONHECIDAS.	48
FIGURA 36 - JANELA DE CONVERSÃO DE UNIDADES ADC PARA O VALOR DE CONCENTRAÇÃO DE FLUORESCÉINA CORRESPONDENTE E RESPECTIVA VARIÂNCIA.	49
FIGURA 37 - ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DA DRIVE/LEITURA DO SSPDA. INTERACÇÃO SSPDA – PIC – MATLAB.	54
FIGURA 38 - ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DA DRIVE/LEITURA DA CÂMARA CCD. INTERACÇÃO CCD – PIC – MATLAB.	55
FIGURA 39 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ACÇÃO DOS COMANDOS <i>PIX</i> E <i>NAQ</i> E T_{EXP} NO SINAL PROVENIENTE DOS SENSORES, PARA 1 VARRIMENTO (NSCAN=1).	58
FIGURA 40 – A - REPRESENTAÇÃO DO ÂNGULO DA LÂMPADA DE FENDA A 90° ("CONVENTIONAL RIGHT-ANGLE"); B - REPRESENTAÇÃO DO ÂNGULO DA LÂMPADA DE FENDA A 45° ("FRONT FACE ILLUMINATION").	59
FIGURA 41 - CURVA DE AQUISIÇÃO COM $A=45^\circ$ E [FLUORESCÉINA]=100NG/ML.	60
FIGURA 42- CURVA DE AQUISIÇÃO COM $A=90^\circ$ E [FLUORESCÉINA]=100NG/ML.	62
FIGURA 43- LINEARIDADE COM $A=45^\circ$	65
FIGURA 44- CURVA CARACTERÍSTICA DE AQUISIÇÃO COM [FLUORESCÉINA] = 0NG/ML E 300 VARRIMENTOS.	70
FIGURA 45 - HISTOGRAMA DA REPRODUTIBILIDADE (300 SCANS).	70
FIGURA 46 – SOBREPOSIÇÃO DE DUAS AQUISIÇÕES. A QUE TEM O PICO MAIS ELEVADO (≈ 40000 UN.ADC) E É MAIS ESTREITA (CERCA DE 20 PÍXEIS NA BASE) CORRESPONDE À NÃO UTILIZAÇÃO DO DESVIADOR ANGULAR; A CURVA MAIS	

LARGA (CERCA DE 50 PÍXEIS NA BASE) E COM UM MÁXIMO INFERIOR (≈ 33500 UN.ADC) É CARACTERÍSTICA DO USO DO DESVIADOR ANGULAR.....	72
FIGURA 47 – AQUISIÇÃO FEITA NUM PACIENTE.....	73

Índice de Tabelas

TABELA 1- VALORES DE A_0 E VALORES CORRESPONDENTES DE A_1 . [25].....	33
TABELA 2 - PARÂMETRO DE CONFIGURAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO SISTEMA DE LENTES DO PAF NO SOFTWARE OSLO.	34
TABELA 3 - DESCRIÇÃO DOS COMANDOS DE CONTROLO DOS SENSORES. ADAPTADO DE [24].	56
TABELA 4 - VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO PARA CÁLCULO DA LINEARIDADE PARA O SENSOR SSPDA DE 128 PÍXEIS.....	64
TABELA 5 - VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO PARA CÁLCULO DA LINEARIDADE PARA O SENSOR SSPDA DE 128 PÍXEIS.....	67
TABELA 6 - VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO PARA CÁLCULO DA LINEARIDADE PARA O SENSOR SSPDA DE 256 PÍXEIS.....	68

1. Introdução

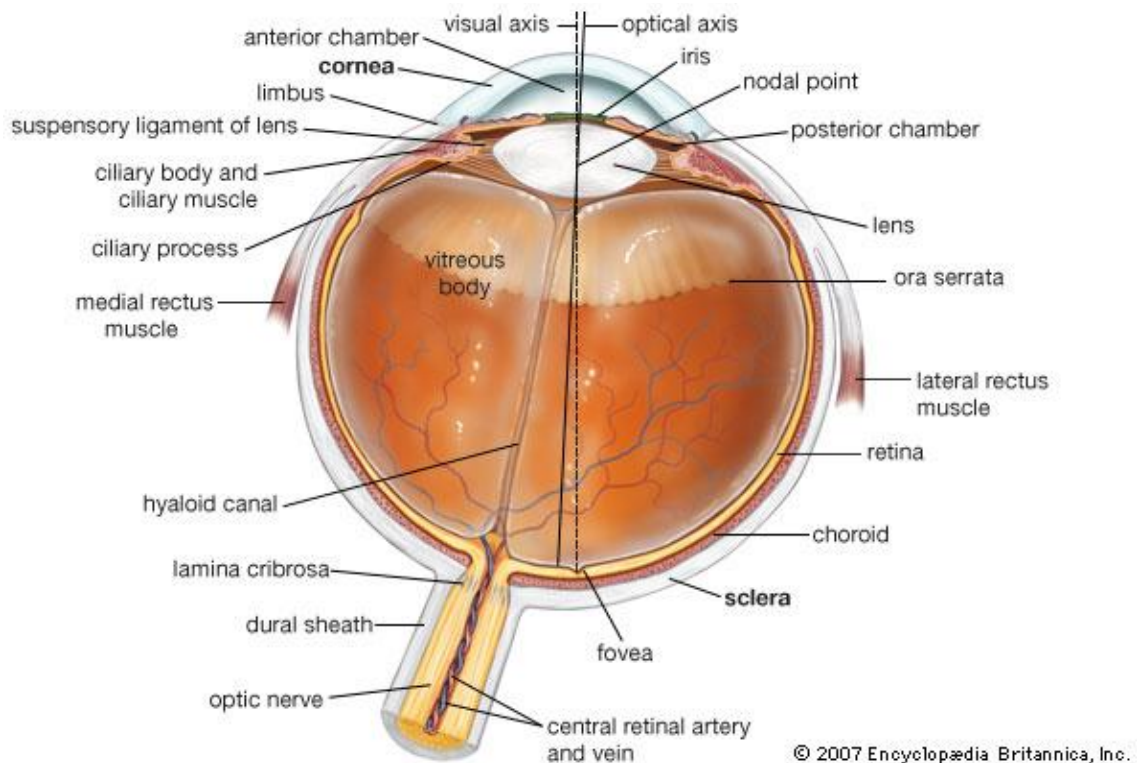


Figura 1 – Olho humano [1]

1.1. Fluorometria ocular

A fluorometria, como o próprio nome indica, consiste na medição de fluorescência. Nas últimas décadas este procedimento tem vindo a ser explorado com finalidades clínicas, na quantificação de fluoróforos, tanto endógenos, produzidos pelo próprio organismo, como exógenos, administrados no organismo por via oral ou intravenosa [2].

Especificando, no que toca ao uso da fluorometria em oftalmologia, este método assume actualmente uma grande importância uma vez que através dele é possível estabelecer correlações entre a quantidade de certos fluoróforos (endógenos e/ou exógenos) presente nos tecidos e fluidos oculares com a idade e patologias do indivíduo sob observação [3]. Destas patologias, destaca-se a retinopatia diabética, principal causa de cegueira em países desenvolvidos. Esta doença pode ser diagnosticada ainda em fase precoce do seu desenvolvimento através da avaliação, por fluorometria ocular, do estado

de permeabilidade das barreiras hemato-oculares (BHR e BHA) [4] [5]. Esta avaliação permite orientar o tratamento, seguir e controlar a evolução da doença.

De uma forma resumida e abrangente, podemos dizer que a fluorometria ocular é uma técnica não invasiva de diagnóstico de patologias oculares, baseada na medição *in vivo* de fluorescência, que permite a detecção e a quantificação de diversas substâncias, endógenas e/ou exógenas, em tecidos e fluidos oculares.

Dos fluoróforos quantificáveis através da fluorometria, destacam-se os cromóforos naturais, flavoproteínas e NAD(P)H, importantes para a quantificação da fluorescência endógena da córnea [6], a lipofuscina associada à autofluorescência da retina e a fluoresceína, um fluoróforo usado como marcador de fluorescência, que é produzido fora do organismo (usado, por exemplo, para medir a fluorescência no vítrio). [7]

No âmbito deste trabalho, a fluoresceína em particular assume um papel de grande importância pois foi o fluoróforo escolhido e utilizado para os testes “*in vitro*” de calibração do novo fluorómetro PAF (Photodyode Array Fluorometer). Esta escolha recaiu no facto de ser esta a substância clinicamente mais administrada para a determinação de patologias oculares como a retinopatia diabética.

Existem actualmente vários instrumentos médicos altamente sofisticados e complexos destinados à quantificação da fluorescência emitida pelo olho humano, como é o caso do FM (Fluorotron™ Master) ou o Zeiss-CSLO (*Confocal scanning Laser Ophthalmoscope*) [7] [8]. No entanto, o seu elevado preço e baixa portabilidade revelam-se inconvenientes para a proliferação destas poderosas ferramentas de diagnóstico ocular.

O novo PAF (*Photodyode Array Fluorometer*), pelo contrário, pretende ser um instrumento simples, de fácil adaptação a uma lâmpada de fenda e de elevada portabilidade. Poderá assim contribuir para a disseminação clínica da Técnica.

O PAF está ainda longe das performances dos fluorómetros comercializados mas caminha no sentido de se tornar um elemento viável no campo da instrumentação de aplicação clínica e uma ferramenta útil no apoio ao diagnóstico de patologias oculares.

1.1.1. Fluorescência

Uma das principais razões do uso da fluorescência em aplicações médicas deve-se ao facto de ser possível marcar com elevado grau de sensibilidade e selectividade um determinado analito com recurso a marcadores de fluorescência não-tóxicos. Noutros casos, utiliza-se a fluorescência, natural ou exógena, para a simples quantificação da concentração de substâncias. Juntamente com estas possibilidades, o desenvolvimento de instrumentação capaz de detectar e quantificar a luz de fluorescência, tornou a fluorimetria uma poderosa técnica de diagnóstico em oftalmologia. [9]

A luminescência é a emissão de luz ultravioleta, visível ou infravermelha por espécies electronicamente excitadas. Existem vários tipos de luminescência, classificados de acordo com o modo de excitação. A fotoluminescência é a forma de luminescência que engloba a fluorescência e o modo de excitação que a caracteriza é a absorção de luz [10].

Uma molécula, ao absorver luz de um comprimento de onda na zona do visível, infravermelho ou ultravioleta, fica num estado de excitação, ou seja, os seus electrões são promovidos a orbitais mais externas, com mais energia. Posteriormente dá-se a desexcitação da molécula, acompanhada da libertação de fótons. Este processo é a base da fotoluminescência.

Seguindo o famoso diagrama de Jablonski, o processo de fluorescência pode ser explicado tendo em conta os estados electrónicos de energia dos fluoróforos: S₀, S₁ e S₂. Em cada estado electrónico de energia do fluoróforo podem existir vários estados vibracionais (0,1,2) [11].

As transições entre os diferentes estados de energia, que caracterizam o processo de fluorescência, podem ser classificadas em três fases distintas: excitação (absorção de fótons), conversão interna e emissão (fluorescência) [10].

De forma simplificada, o modo como estas transições ocorrem é o seguinte [11]:

Em primeiro lugar, após se dar a excitação do fluoróforo, este passa do nível de menor energia (estado fundamental) para um sub-nível vibracional do estado singleto S1, superior ao nível 0, ou para um qualquer sub-nível vibracional do estado energético (singleto) S2.

Seguidamente, dá-se a conversão interna, isto é, a molécula excitada “relaxa” até ao mais baixo estado vibracional do estado singleto S1.

Por fim ocorre a emissão de fluorescência, que corresponde à passagem do estado S1 para o estado fundamental S0, acompanhada pela libertação de fótons. A energia da radiação electromagnética emitida (fótons) tem um comprimento de onda superior ao de excitação do fluoróforo, este fenómeno denomina-se desvio de Stokes. [10]

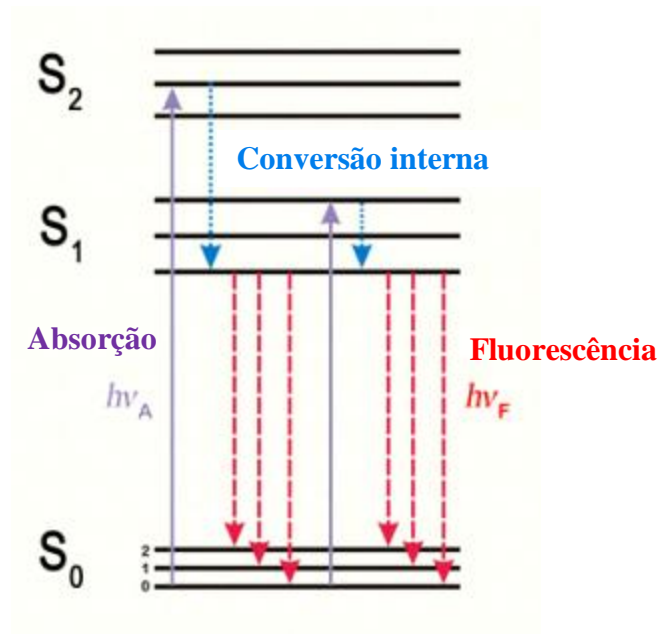


Figura 2 – Diagrama de Jablonski. [12]

Nota ainda para o facto de o espectro de emissão ser tipicamente uma imagem “vista ao espelho” do espectro de absorção [10]. Isto ocorre pois a geometria nuclear não é alterada significativamente durante a excitação electrónica [11]. Regra geral, as diferenças entre os níveis vibracionais são idênticos no estado fundamental e nos estados excitados [10].

1.1.1.1. Fluoróforos – fluoresceína

Os fluoróforos são componentes (grupos funcionais) de certas moléculas que lhes conferem fluorescência quando estas são excitadas com uma luz de comprimento de onda específico. [13]

Os fluoróforos podem ser classificados em dois tipos consoante a sua origem: endógenos e exógenos.

Os fluoróforos endógenos são produzidos no interior do corpo humano e fazem parte da constituição de determinadas moléculas biológicas [14] [6]. Os fluoróforos exógenos são produzidos fora do organismo humano e administrados por via oral ou intravenosa. [2]

O recurso a fluoróforos exógenos justifica-se pelas suas características espectrais, destacando-se a evidente separação entre os espectros de excitação e emissão (ao contrario do que acontece como os fluoróforos endógenos) o que proporciona uma melhor sensibilidade aos detectores. Mais ainda, os espectros de excitação são compatíveis com as regiões de emissão das fontes de luz comercializadas e os espectros de emissão compatíveis com os sensores mais utilizados [15] [16].

Da imensa variedade de fluoróforos existentes, serão referidos apenas alguns dos que estão directamente relacionados com este trabalho. São eles: O NADH, NADPH, flavinas e flavoproteínas (endógenos) e a fluoresceína (exógeno). [14]

NADH e NADPH - pensa-se que estes dois nucleotidos de piridina possam estar relacionados com a autofluorescência da córnea. Na verdade, estes nucleótido, quando estão no estado reduzido emitem fluorescência. [6]

Flavinas (FMN) e flavoproteínas (flavinas ligadas a proteínas) – estão presentes na mitocôndria do epitélio da córnea e apresentam fluorescência quando estão no estado oxidado. Juntamente com o NAD(P)H presume-se que estão na origem da autofluorescência da córnea. [15]

Com a possibilidade de regular o ângulo excitação/emissão no novo PAF, pretende-se conseguir alcançar a resolução espacial necessária para conseguir detectar a presença dos fluoróforos da córnea ao longo do eixo óptico.

Fluoresceína

A fluoresceína sódica (NaFl) é uma molécula que apresenta as seguintes características [17]:

Fórmula química: $C_{20}H_{10}O_5Na_2$

Peso molecular: 376 daltons

Excitação: 465-490 nm (luz azul)

Emissão: 520-530 nm (luz verde)

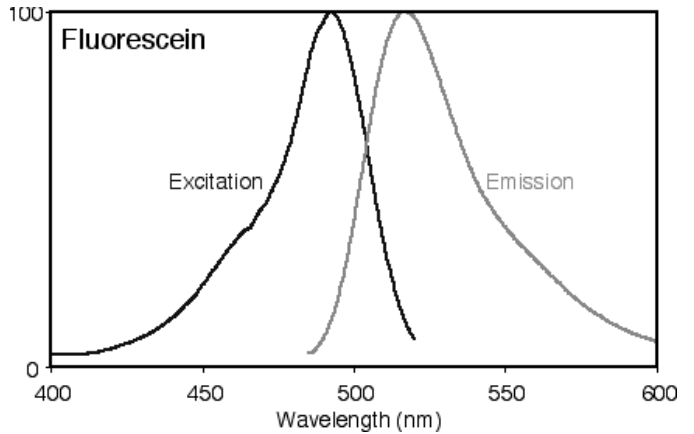


Figura 3 - Espectro de excitação e emissão da fluoresceína. [55]

A escolha da fluoresceína sódica (NaFl) em fluorimetria recai no facto de este ser um marcador não-tóxico, relativamente pequeno e metabolicamente inactivo e com grande poder de fluorescência. É excretada pelo fígado e rins. [18] [17]

Aliado a estas características da molécula NaFl está o facto de que, ao misturar-se com o sangue, uma significativa percentagem, 10-20%, ficar livre*. Assim, ao atravessar as barreiras hemato-oculares, esta fluorescência pode ser detectada e quantificada por fluorimetria ocular**. [4]

As propriedades deste fluoróforo tornam-no ideal para a avaliação da dinâmica intraocular e da permeabilidade das barreiras hemato-oculares (BHA e BHR). [19] [4]

*os restantes 80-90% do corante estão ligados a proteínas plasmáticas e não servem para quantificar fluorescência.

**as concentrações mínimas que podem ser detectadas nos fluidos intraoculares são da ordem dos ng/ml.

1.1.2. Retinopatia diabética

A retinopatia diabética é a principal causa de cegueira em indivíduos adultos no mundo ocidental. Ela está relacionada com alterações na funcionalidade da retina, provocadas por uma desordem metabólica crónica caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue (Diabetes Mellitos). [20] [21]. Segundo Cunha-Vaz:

“A maior parte dos doentes que sofrem de diabetes acabam por apresentar alterações dos vasos retinianos.

Estas alterações dos vasos retinianos, caracterizam-se, inicialmente, por alterações da permeabilidade da barreira hemato-retiniana e alterações morfológicas das paredes vasculares, que conduzem à acumulação de fluido e edema da retina. Desenvolve-se a seguir oclusão vascular e isquémia. A isquémia é progressiva, podendo evoluir para a formação de neovasos e desenvolvimento de uma forma proliferativa de retinopatia.” [5]

Este processo conduz a graves problemas de visão, culminando muitas vezes, se a doença não for diagnosticada a tempo, em cegueira. [21]



Figura 4 – Visão normal; visão com retinopatia diabética grave. [22]

1.1.3. Instrumentação médica - Oftalmologia – PAF

A instrumentação médica usada em oftalmologia para a avaliação das alterações na estrutura do olho, mais especificamente na retina, que conduzem à retinopatia diabética, é actualmente representada por várias técnicas. As que se destacam como ferramentas de diagnóstico de patologias como a retinopatia diabética ou o edema macular diabético são a oftalmoscopia, a fotografia do fundo e a angiografia de fluoresceína [23].

No entanto, em resposta à necessidade de uma maior resolução nas técnicas de diagnóstico para as patologias oculares, surgiram novos equipamentos como tomógrafos de coerência óptica (OCT) e fluorofotómetros (ex: Fluorotron Master).

O PAF (*Photodiode Array Fluorometer*), constitui também ele um equipamento de diagnóstico não-invasivo para aplicação em oftalmologia e é a sua existência que dá origem a este trabalho. A sua patente foi registada e tem a seguinte designação: Pat. US 06,013,034 Jan 2000 [24]

Este equipamento, perfeitamente adaptado ao exame do segmento anterior ocular, utilizando a óptica da lâmpada de fenda, permite a avaliação da barreira hemato-aquosa (BHA) com a necessária resolução, tanto espacial como em energia, para a medição da fluorescência exógena [25].

O PAF pode também detectar a autofluorescência do segmento ocular anterior (córnea e cristalino) [26]. A utilização de uma câmara CCD, recentemente testada, permitirá a obtenção dos níveis de sensibilidade ideais para a análise não só da fluorescência da córnea como até do vítreo anterior [6].

O novo PAF funciona, tal como a versão original, acoplado a uma lâmpada de fenda oftalmológica com filtros ópticos que possibilitam a selecção do comprimento de onda pretendido para a detecção da fluorescência da secção ocular pretendida ou, numa fase de testes, de um tubo de ensaio ou *cuvette*. A possibilidade de ajuste do ângulo feito pelo feixe luminoso de excitação da amostra com a luz de fluorescência emitida por esta constitui uma mais-valia deste sistema em relação a outros fluorómetros [25].

O sistema óptico do PAF é parte integrante da lâmpada de fenda e conduz e condiciona a luz proveniente da amostra em estudo para o

fotodetector, inicialmente um SSPDA (*Self Scanning Photodiode Array*) de 128 píxeis ou 256 píxeis. Posteriormente, o sinal eléctrico (em tensão) gerado pelo sensor é conduzido e acomodado através do sistema de aquisição de dados (SAD), cujos blocos principais são o ADC de 16Bits e um microcontrolador dsPIC. À saída do SAD, o sinal já digitalizado é levado através de uma porta série até ao PC onde, utilizando o MATLAB, se faz a visualização e tratamento dos dados obtidos.

A este sistema base foram feitas várias optimizações que se traduzem nos objectivos desta tese.

1.1.4. Objectivos

O objectivo central do presente trabalho é a optimização do novo PAF. Nesse sentido, as tarefas fundamentais levadas a cabo resumem-se a:

- Implementação da possibilidade de utilização de diversos sensores:

SSPDA, 128 píxeis;

SSPDA, 256 píxeis;

FFT-CCD, 512 píxeis.

utilizando um único SAD, uma só interface gráfica e um único código (projecto) para programar o dsPIC.

- Calibração dos sensores SSPDA:
 - Linearidade;
 - Reprodutibilidade;
 - Nível mínimo de detecção.
- Aperfeiçoamento da interface gráfica para o utilizador final (aumentar simplicidade e eficiência)
- Optimização sistema óptico com emprego do desviador angular.
- Testes em pacientes.

É importante destacar que a utilização da câmara FFT-CCD foi um processo iniciado de raiz. Este facto exigiu todo o trabalho de ligação ao sistema de aquisição de dados e respectivo teste. O mesmo ocorreu com o

código do PIC, que sofreu bastantes alterações para que fosse executável com todos os sensores usados, ou seja, foi implementado o software de controlo e leitura da câmara.

Com a câmara FFT-CCD, espera-se atingir níveis superiores de sensibilidade e resolução, comparativamente aos sensores SSPDA. Este aspecto é particularmente importante na quantificação de fluorescência endógena e permeabilidade da BHA.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF



Figura 5 – Placa do sistema de aquisição (SAD) do PAF.

2.1. O sistema anterior

A fluorimetria ocular como técnica não invasiva de diagnóstico vem desde há vários anos a ser explorada no campo da instrumentação médica e hospitalar. Existem vários sistemas de detecção de fluorescência ocular disponíveis no mercado como o Fluorotron Master produzido pela OcuMetrics Inc., o Confocal Scanning Laser Ophthalmoscope (CSLO) da Carl Zeiss Inc. ou o Heidelberg Retina Angiograph (HRA) da Heidelberg Engineering Inc.. [7]

O desenvolvimento do novo fluorómetro PAF surgiu como modelo simples e adaptável a uma vulgar lâmpada de fenda (ex: ZEISS, 30SL M), para medição longitudinal de fluorescência ao longo do eixo ocular [27]. Uma boa sensibilidade e resolução axial foram a principal preocupação bem como a facilidade de utilização e possibilidade de selecção do segmento ocular pretendido. Os modelos referidos acima possuem sistemas complexos de varrimento e/ou ferramentas de processamento de imagem bem como

sistemas ópticos confocais de elevada resolução (estão, normalmente, apenas adaptados ao segmento posterior ocular) que os tornam pouco acessíveis a pequenas unidades laboratoriais ou clínicas [7]. Para além disso, ao PAF pode ser conferida alguma flexibilidade em termos de filtros ópticos de modo a poderem ser quantificados outros fluoróforos que não a clássica fluoresceína. No caso do Fluorotron Master, instrumento vocacionado para medição axial da fluorescência, existe a limitação de fazer um varrimento para todo o eixo ocular e não em segmentos menores, pré-definíveis [7].

Estudos recentes comprovam a utilidade da observação de outros segmentos oculares para além do posterior, nomeadamente a córnea, na confirmação do diagnóstico de patologias relacionadas com diabetes e retinopatia diabética [6] [25].

A versão inicialmente desenvolvida do PAF tinha como principais componentes:

- Uma lâmpada de fenda de halogéneo (ZEISS, 30SL M) com dois filtros ópticos. O primeiro, de excitação, selecciona o comprimento de onda da luz para excitação do fluoróforo em aplicação e o segundo, o de emissão, filtra a luz de fluorescência proveniente da amostra/olho, antes de esta atingir o detector.

- Um módulo detector, constituído pelo sensor de imagem do tipo SSPDA (*self scanning photodiode array*) e respectivos circuitos de leitura, controlo, amplificação e digitalização, acoplado à lâmpada de fenda;

- Um módulo de processamento digital do sinal, constituído por um sistema de digitalização do sinal do sensor com um DSP (*Digital Signal Processor*), implementado numa placa PC que é introduzida numa *slot* de um computador IBM. [25]

Na versão actualmente em desenvolvimento, as alterações em relação à versão referida acima, manifestam-se logo ao nível da portabilidade uma vez que, em vez de existirem dois módulos fisicamente distintos (duas placas), existe apenas um único módulo (uma placa) que comporta todos os circuitos*. A ligação ao PC faz-se por RS-232 ou USB.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

É de destacar também, e mais especificamente, a presença de um ADC de 16 bits em vez dos 12 bits na versão inicial bem como, a utilização de um dsPIC30 em oposição ao DSP usado anteriormente [25] [24].

*o sensor (ou câmara) é o único componente que não está fisicamente alojado neste módulo.

2.2. Hardware – a nova arquitectura

A nova arquitectura do fluorómetro PAF distingue-se da anterior versão em vários pontos. No campo do hardware, possui, em oposição à anterior versão, uma única placa electrónica constituída por três módulos distintos mas interligados que servem para conduzir e processar o sinal proveniente do sensor.

2.2.1. Circuito de amplificação

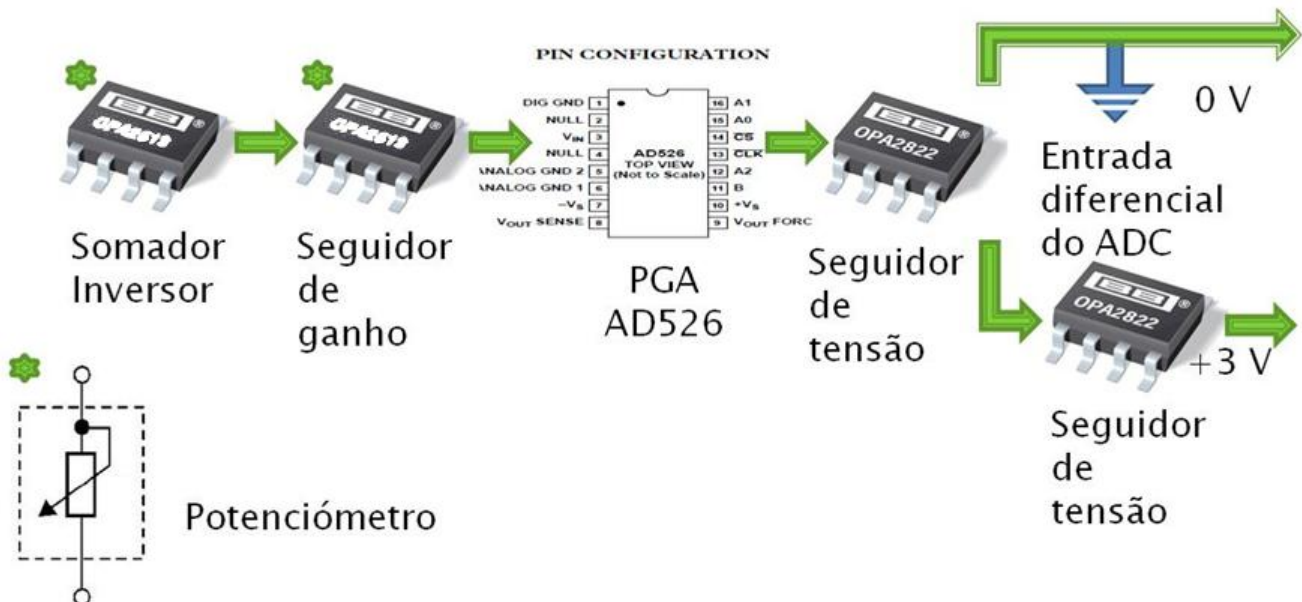


Figura 6 – Representação do circuito de amplificação do SAD do PAF.

O primeiro módulo corresponde ao circuito amplificação do sinal. Neste circuito de amplificação podemos destacar os principais elementos [24]:

- Um amplificador somador inversor (OPA2613 [28]):

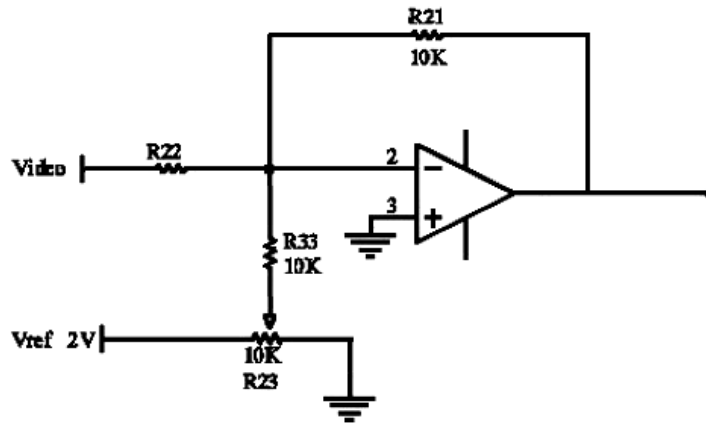


Figura 7 – Esquema do amplificador somador inversor (OPA2613)

A presença de um potenciômetro associado a este AmpOp (Amplificador Operacional) permite amplificar o sinal à saída em 2V.

- Um seguidor de ganho (OPA2613 [28]):

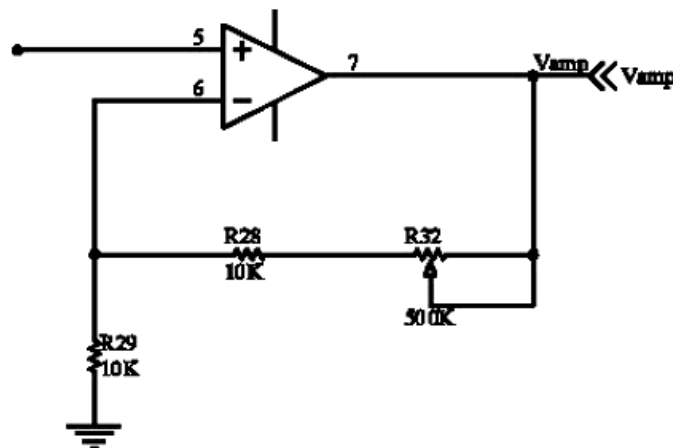


Figura 8 - amplificador seguidor de ganho (OPA2613)

Este AmpOp possui um potenciômetro associado que permite amplificar o ganho do sinal.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

- Um PGA (Programmable Gain Amplifier - AD526 [29]):

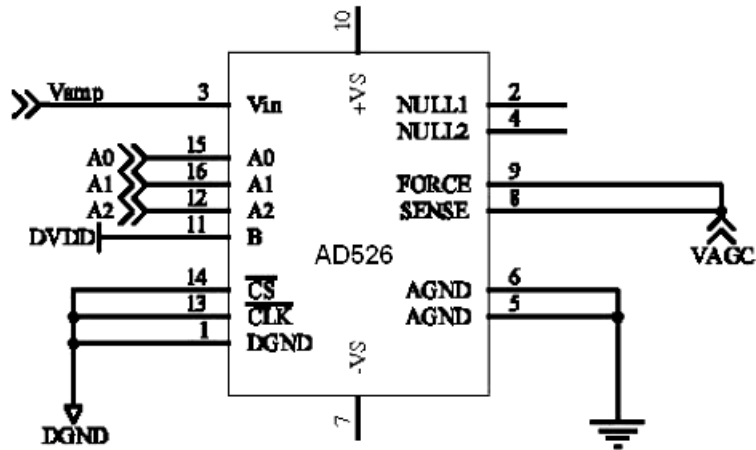


Figura 9 – Esquema do PGA (AD526)

O ganho do PGA pode variar entre cinco níveis binários* (1;2;4;8;16) [29] e pode ser ajustado através dos comandos *inc* e *dec* instalados no dsPIC e controlados a partir da interface gráfica de interacção com o utilizador, em MATLAB [24].

*estes valores são controlados pelas entradas digitais do PGA e o valor default programado (no PIC) é: ganho=1.

- Um seguidor de tensão, ou buffer, (OPA 2822 [30]) ligado em série com o PGA:

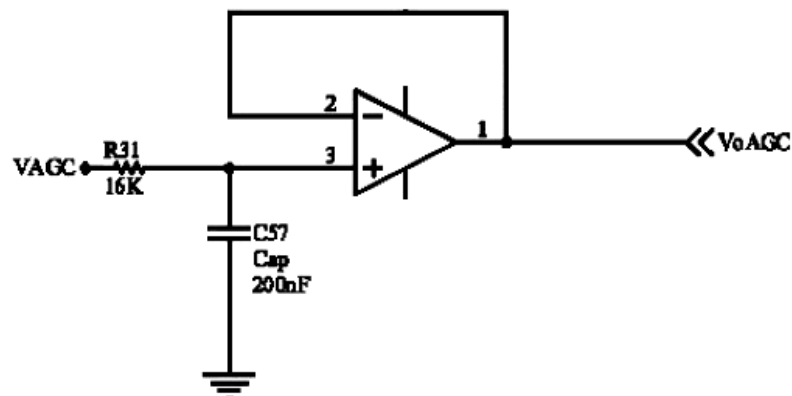


Figura 10 – Esquema do Buffer (OPA2822)

- Um seguidor de tensão (OPA 2822 [30]) e uma terra ligados em paralelo. Constituem a entrada diferencial do ADC ou, mais concretamente, uma adaptação unipolar à entrada diferencial.

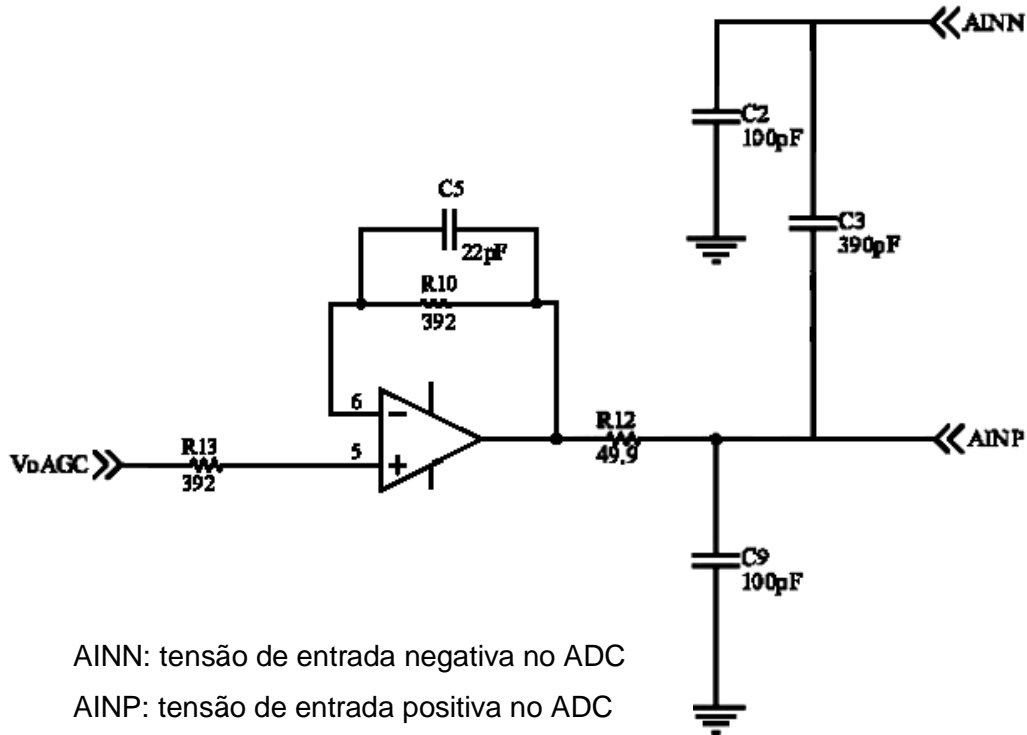


Figura 11-Esquema da entrada diferencial do ADC: Seguidor de tensão (OPA 2822) e terra.

2.2.2. Conversão analógico-digital (ADC)

O ADC implementado é o ADS1601 da Texas Instruments. As suas principais características são [31]:

- Resolução: 16 bits;
- Entrada diferencial: +/- 3 V
- Arquitectura delta-sigma;
- Taxa de amostragem: 1.25 MSPS (*mega samples per second*)
- Interface série 3-wire;
- Tensão de alimentação (analógica e digital): +5V e +5V respectivamente.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

Devido ao facto de a gama dinâmica dos sensores utilizados nunca ser superior a 47000 valores* [32], os 16 bits do ADC, correspondentes a uma gama dinâmica de 65536 unidades à saída [31], são perfeitamente suficientes para uma eficaz conversão do sinal.

*Gama dinâmica da câmara FFT CCD = 24000 valores (ADC 15 Bits) [33]

Gama dinâmica do SSPDA de 128 píxeis = 47000 valores (ADC 15 Bits) [32]

Gama dinâmica do SSPDA de 256 píxeis = 45000 valores (ADC 15 Bits) [32]

Em relação à entrada diferencial ($\pm 3V$) [31], uma vez que à saída do circuito de amplificação as tensões nunca têm valores inferiores a 0V ou superiores a 3V ($A_{INN}=0V$; $A_{INP} \leq 3V$) [24], esta é perfeitamente suficiente para integrar o sistema, oferecendo ainda uma margem de acção.

A comunicação do ADC (ADS1601) com o dsPIC30 é feita através do módulo SPI do dsPIC. Neste módulo, a comunicação é síncrona ou seja, para além de existirem duas vias de transferência de dados, uma para recepção e outra para transmissão, existe ainda um sinal de relógio (*clock*). O dsPIC funciona em modo *MASTER* (é o dispositivo que gera o *clock*) e o ADC em modo *SLAVE*. [34]

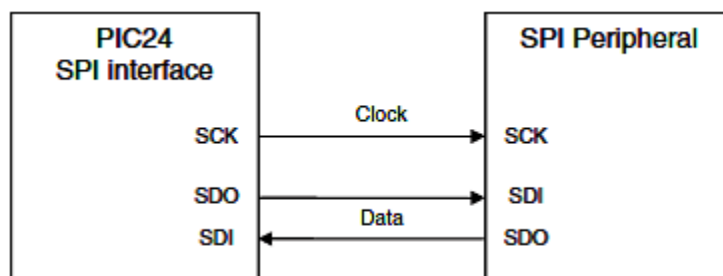


Figura 12 – Módulo de comunicação síncrona (SPI) entre PIC e ADC. [34]

2.2.3. Microcontrolador – o dsPIC30, principais recursos aplicados

Sendo o PIC um “pequeno computador” programável num único *chip* [35], ele constitui desde logo um factor determinante no que toca à portabilidade do novo PAF.

Dentro da enorme família dos PIC's, a escolha do dsPIC30, um controlador de sinais digitais (DSC), recai no facto deste apresentar um leque de características adequadas ao sistema em desenvolvimento *, são estas [36] [37]:

- Arquitectura Harvard Modificada de 16 bits;
- Memória para armazenagem de dados e programas;
- Entradas e saídas, digitais e analógicas;
- Portos de comunicação com o exterior;
- Interrupções;
- Temporizadores.
- Arquitectura otimizada para funcionar com um compilador C.

*embora o PIC possua um ADC interno de 12 bits, este é apenas utilizado como meio auxiliar de teste e debug.

2.2.4. Comunicação entre o SAD e o PC

A comunicação entre o sistema de aquisição de dados e o PC é estabelecida através de uma porta série RS-232. Esta interface possui um módulo de comunicação assíncrona (UART), o que permite que os dados sejam enviados de forma sucessiva sem o envio de qualquer sinal de relógio (CLK) ao receptor. O módulo UART tem duas vias de transferência de dados (TX - transmissão; RX - recepção) em *full duplex*, ou seja, com duas direcções [34].

Os parâmetros de configuração da RS-232:

- Velocidade de transmissão: 115200 bits/seg;
- 8 bits de dados;
- nenhum bit de paridade;
- 1 bit de paragem;
- Sem controlo de fluxo.

A porta série possui um conector DB9 de 9 pinos.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

As funções implementadas no dsPIC responsáveis pela recepção e transmissão dos dados são, respectivamente *handle_string()* e *send_string ()* [24].

2.2.5. Alimentação

A fonte de alimentação do sistema PAF possibilita a obtenção da corrente contínua a partir da corrente alternada da rede pública. Para tal, utiliza um transformador FT 2x24V com três reguladores de tensão (+24V, +/- 15V, +/- 6V) e um regulador DC/DC *step-down* (alimentação analógica e digital de +5V) [24].

2.3. Sensores

No decurso deste trabalho foram utilizados três sensores diferentes da *Hamamatsu Photonics*.

Os primeiros a serem testados foram os N-MOS SSPDA de 128 píxeis e 256 píxeis. Numa fase final instalou-se a câmara FFT-CCD de 512 píxeis.

Nos seguintes tópicos serão descritas com o devido pormenor as características, o modo de leitura e funcionamento de cada um.

2.3.1. NMOS: 128 píxeis e 256 píxeis (SSPDA)

O primeiro sensor testado no sistema PAF foi o sensor S3921-128Q, do tipo N-MOS com 128 píxeis (SSPDA - *self-scanning photodiode array*). As características que levaram à escolha deste sensor são [38]:

- Grande área activa: 2.5mm x 50µm;
- Boa gama dinâmica: 4.7×10^4 valores;
- Boa linearidade* e uniformidade de sensibilidade espacial à saída: PRNU (photo response non-uniformity) = +/- 3%;
- Baixa corrente no escuro**: $I_D = 0.2-0,6\mu A$;
- Elevada carga de saturação***: $Q_{sat} = 50pC$;

- Elevada tensão de saturação à saída***: 1,35V
- Alimentação de baixa voltagem: 15V;
- Baixo consumo*: 10mW;
- Sensibilidade: $\lambda_{\min}= 200\text{nm}$; $\lambda_{\text{pico}}=600\text{nm}$; $\lambda_{\max}=1000\text{nm}$

* o erro de linearidade é de -2% a 10% do valor de saturação de exposição luminosa, podendo alcançar 50%, quando se atinge a saturação. [32]

** a corrente no escuro duplica a cada 5°C de aumento de temperatura.

***Reset $V = 2.5\text{V}$; $V_{\text{dd}}= 5.0\text{V}$; $V_{\phi}= 5.0\text{V}$

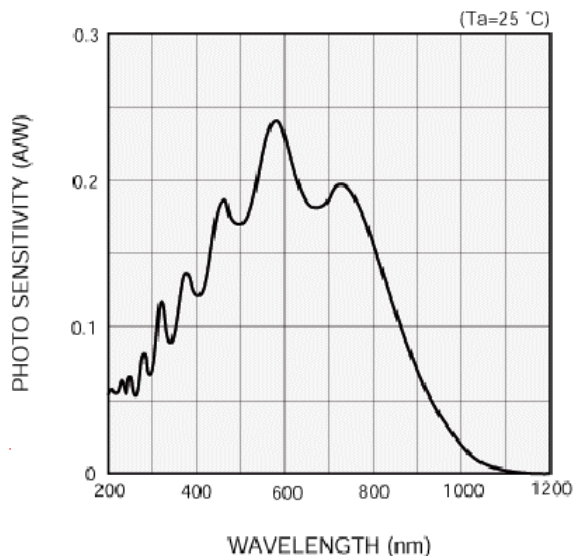


Figura 14 – Foto-sensibilidade do SSPDA em função do λ

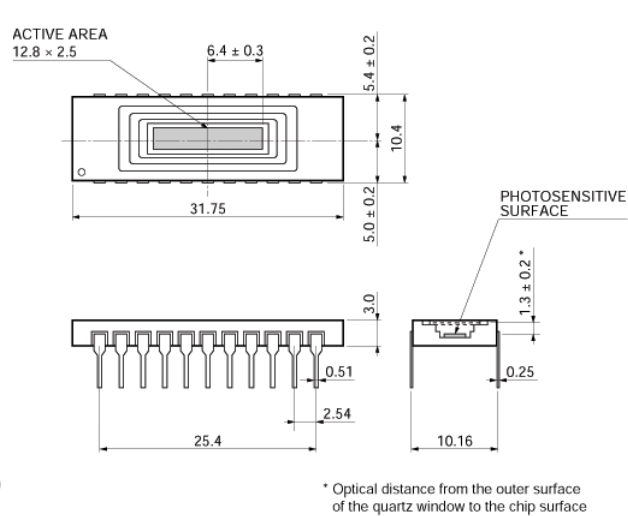


Figura 13 - Dimensões do SSPDA

A estrutura deste sensor é constituída por uma secção fotossensível constituída pelo *array* de fotodíodos, uma secção com comutadores de leitura (*switches*) que “lê” o sinal proveniente do *array* de fotodíodos e um registo de deslocamentos (*shifts*) que endereça os comutadores de leitura. [32]

O circuito de leitura (*scan*) do sensor NMOS gera uma sequência de impulsos para leitura a partir de um impulso start (*st*) e impulsos de clock a duas fases (*two-phase clock pulse* – $\Phi 1$ e $\Phi 2$), com o intuito de activar cada sequência de endereçamento. Cada *switch* de endereçamento é composto por um transístor NMOS constituído por um fotodíodo no papel de fonte (*source*), a linha de vídeo como dreno (*drain*) e a secção de entrada dos impulsos para leitura como porta (*gate*) [32].

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

A carga acumulada em cada fotodíodo é restituída para o valor inicial após cada leitura pela acção de um impulso de *reset*. No final da leitura de todos os fotodíodos do *array*, surge o impulso EOS (*end of scan*). [38]

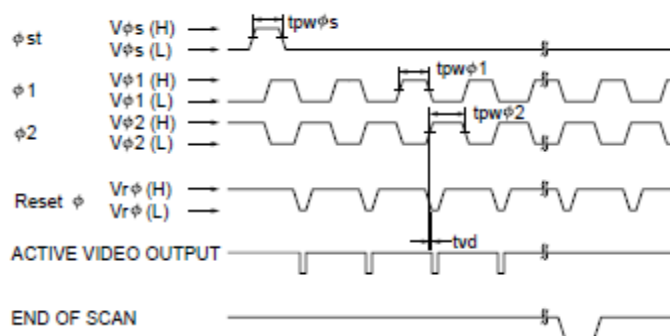


Figura 15 – Diagrama de impulsos do SSPDA. Adaptado de [38].

Uma vez que a função do sensor é detectar a presença de fluoresceína e sabendo que o comprimento de onda de emissão desta se localiza nos 530nm [25], verifica-se que o pico de sensibilidade do sensor é próximo deste valor (600nm) ou seja, este é perfeitamente adequado à função a que se destina.

Uma característica particular deste sensor é o facto de a leitura do sinal à saída ser feita pelo método de integração de carga, ou seja, o sinal é proporcional ao produto da intensidade luminosa pelo tempo de integração assim, o sinal à saída é proporcional à quantidade de luz à qual é exposto [32]. Isto permite a detecção de níveis de luz mais baixos.

Frequentemente, após uma aquisição com este sensor, e quando se inicia nova aquisição, no primeiro *scan* desta observa-se um fenómeno conhecido por LAG. Este fenómeno manifesta-se quando parte do sinal de um *scan* persiste no *scan* seguinte.

Uma forma de combater este efeito consiste em aumentar o tempo de *reset* (decrece para 0,1 quando $T_{reset} \geq 2,5\mu s$) [32]

Quanto ao ruído, existem fontes de ruído de padrão fixo (ruído transitório e corrente no escuro) elimináveis com um filtro digital, e ruído aleatório (ruído

de Jonhson, de reset do fotodíodo, de corrente no circuito de leitura entre outros tipos) [32]. É o ruído aleatório que determina o LMD (limite mínimo de detecção) [25].

À saída do sensor, o sinal apresenta polaridade negativa e um offset de 1V (a Reset $V = 2.5V$; $V_{dd} = 5.0V$; $V_{\phi} = 5.0V$) [38]. Estas características do sinal sofrem alterações aquando da passagem no circuito de amplificação.

O segundo sensor utilizado no fluorómetro ocular foi o sensor S3921-256Q, do tipo N-MOS com 256 píxeis (SSPDA).

Em relação ao sensor anteriormente referido (o S3921-128Q), este de 256 píxeis apenas difere do primeiro no número de píxeis e na área activa *.

*área activa do S3921-128Q = 6.4 x 2.5 mm

área activa do S3921-256Q = 12.8 x 2.5 mm

2.3.2. Câmara FFT-CCD

A câmara CCD (FFT-CCD *Image Sensor Multichannel detector head – C5809*) foi o último sensor testado no sistema. Uma vez que nunca antes se usou esta câmara no PAF, a descrição do seu modo de funcionamento e as suas características serão descritas mais pormenorizadamente que no caso dos sensores referidos anteriormente.

A câmara CCD está incorporada num módulo (*detector head*) constituído pelo próprio sensor de imagem FFT-CCD (série S5469) termoelectricamente arrefecido, um circuito de condução/amplificação de baixo ruído e um circuito de controlo de temperatura. Este módulo, tem alta sensibilidade e baixo ruído, permitindo detectar níveis muito baixos de luz (algumas dezenas de fotões), tornando-o ideal para o uso em espectroscopia de fluorescência [33].

O valor da eficiência quântica para este tipo de dispositivo é tipicamente cerca de 27% para um $\lambda = 530\text{nm}$. [39]

“O valor de eficiência quântica para uma CCD é uma propriedade da resposta fotovoltaica definida como o número de pares electrão-lacuna criados e lidos com sucesso pelo sensor para cada fotão.”, Citado de [39]

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF



Figura 16 – Câmara FFT-CCD

O módulo da câmara CCD é constituído por quatro secções principais:

1. Sensor de imagem termoelectricamente arrefecido

É composto por uma secção de transferência de carga que é ao mesmo tempo a área fotossensível - *full-frame transfer* CCD (FFT).

É um sensor de imagem de área (64 píxeis verticais x 512 píxeis horizontais) mas que opera como um sensor de imagem linear. Para o tal, realiza a operação de **Binning vertical**, que consiste em acumular todas as cargas da direcção vertical, nos registos horizontais correspondentes (figura 17). Ou, de um modo mais simples, se considerarmos que cada pixel é um elemento de uma matriz de 64 x 512 píxeis, o *binning* vertical gera, a partir dessa matriz, um “vector” com 512 elementos em que cada um contém a informação (carga) acumulada de cada coluna da matriz inicial. É esse “vector”, ou conjunto de valores, que é transmitido ao PIC e conduzido para o PC onde os dados obtidos na aquisição são analisados.

Com este mecanismo, é possível ter um sensor linear com uma área fotossensível superior aos sensores lineares convencionais, melhorar a relação sinal-ruído e reduzir o ruído [40].

A presença de um refrigerador (*cooler*) termoeléctrico no compartimento do sensor possibilita ainda integrações de carga durante largos períodos de tempo.

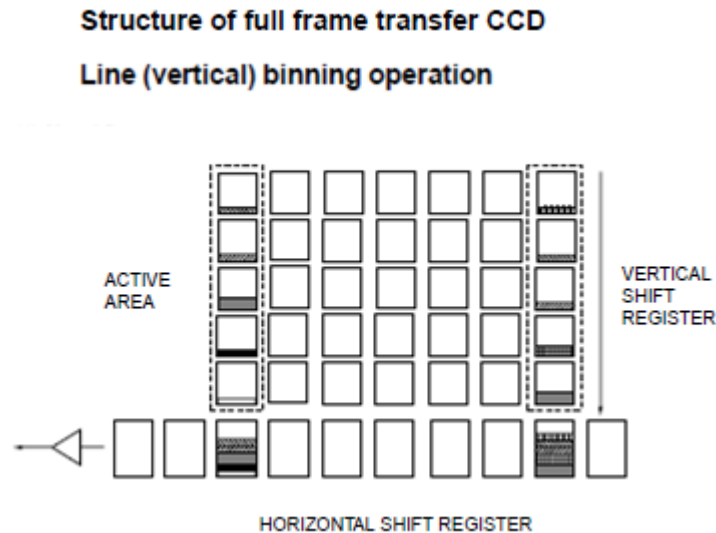


Figura 17 - Estrutura da FFT-CCD. *Binning* vertical. [32]

2. Circuito de condução/ amplificação

Fornece os sinais de temporização necessários para operar o sensor de imagem e processar o sinal de vídeo proveniente deste, com baixo ruído. Para operar convenientemente o circuito necessita de dois sinais de controlo externos (*Start* e *Clock*) que no SAD do PAF são gerados pelo dsPIC e quatro tensões de alimentação (+5V, +15V, -15V, +24V) geradas pela fonte de alimentação do SAD.

Neste circuito, o gerador de sinais temporizadores fornece o sinal *trigger* para a conversão externa A/D. Estes sinais são inicializados pelo impulso *START* e estão sincronizados com o sinal de temporização *CLK* (*clock*). Estes dois sinais são produzidos e fornecidos pelo dsPIC.

O *Driver* da CCD faz a conversão de nível para os vários sinais de temporização, a partir do nível H-CMOS para os níveis $V_L=V_{EE}$ e $V_H=V_{DD}$.

O regulador de tensão gera várias tensões necessárias para o sensor operar.

Um processador de sinal vídeo gera um sinal à saída com polaridade positiva que é conduzido e processado através do circuito de amplificação SAD até ao ADC externo.

3. Circuito de controlo da temperatura

Tem com base um termistor que opera a partir da linha de +5V e arrefece o sensor até aos 0°C. Se houver sobreaquecimento o circuito desliga-se automaticamente e acende-se um LED vermelho*.

*Indicações do LED durante o arrefecimento:

LED desligado – o sensor está a ser arrefecido.

LED Verde - a temperatura de arrefecimento está a 0°C.

LED vermelho – Sobreaquecimento do sensor.

4. A caixa de revestimento

Promove uma boa dissipação de calor e permite estabelecer a conexão com lâmpada de fenda e com placa de hardware (SAD).

Instalação

Na instalação da CCD há alguns aspectos a destacar no que diz respeito à inicialização dos sinais de controlo a partir do PIC:

Estabelecer a ligação dos sinais *start* e *clock* provenientes do dsPIC para assegurar o funcionamento do circuito de condução/alimentação. A largura de pulso do sinal *start* deve ser maior do que 1 ciclo do sinal CLK e deve estar sincronizada com este (figura 18).

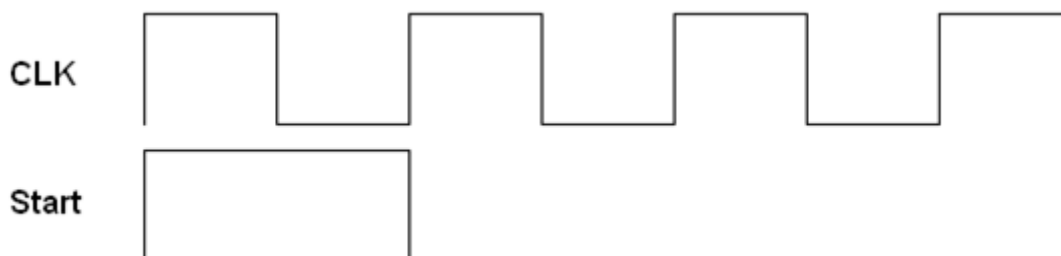


Figura 18 – Esquema dos impulsos CLK e Start gerados pelo PIC.

Assegurar a ligação do terminal *Data Video* através da porta de comunicação com o SAD. Depois de devidamente sincronizado com o sinal de *Start*, esta linha conduzirá o sinal vídeo* até ao pino 5 (AINP) do ADC.

O ADC inicia a conversão quando recebe os sinais *Trigger* e *Data Video*.

O período (intervalo de pulso) do sinal *Start* determina o tempo de aquisição do sensor de imagem (ver figura).

*A frequência de leitura do sinal *Data Video* é determinada pela frequência do sinal *CLK*.

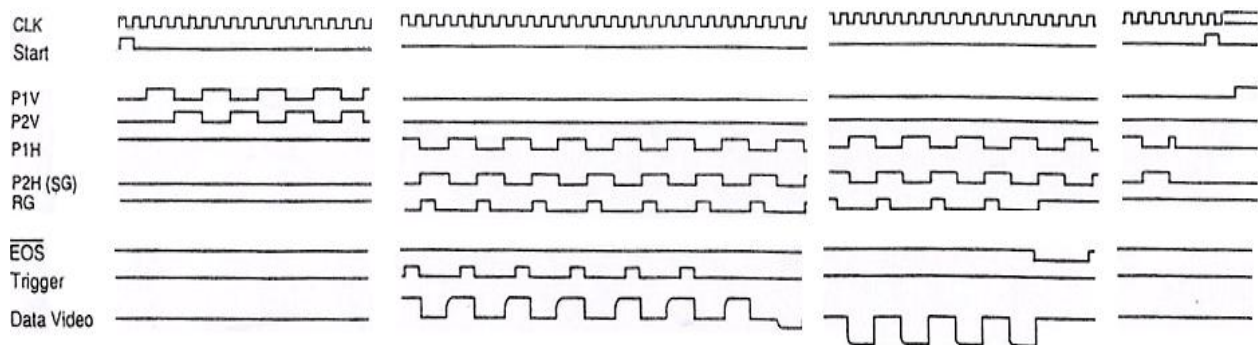


Figura 19 – Esquema de impulsos da câmara FFT-CCD. Adaptado de [33].

Como o sinal *Data Video* é enviado pela porta série RS-232 para o monitorizar a partir do PC usou-se o *Hyperterminal* do Windows e, numa fase mais avançada, o MATLAB.

As principais características da câmara FFT-CCD (S5469-0906):

Número efectivo de pixies, (H) * pixel (V): 512*64

Tamanho do pixel, (μm * μm): 24*24

Área active efectiva, (mm (H) * mm(V)): 12.28*1.54

Gama dinâmica: 24K

Carga no escuro: 200 e⁻/pix/seg

Temperatura do arrefecimento (Ts): 0°C

Uniformidade de sensibilidade (PSUR): +/- 10%

2.3.3. Sensor SSPDA vs FFT-CCD

É fácil observar pelas descrições feitas acima relativamente aos dois tipos de sensor, que o sensor SSPDA efectua operação de leitura fornecendo-se apenas um nível TTL de impulso de relógio (*two-phase clock pulse* – $\Phi 1$ e $\Phi 2$) e para tal precisa de uma só fonte de alimentação de 5V enquanto que o CCD opera com várias fontes de alimentação (+5V, +15V, -15V e +24V) [33] [38] [41].

Devido às diferenças no princípio de funcionamento entre os dois tipos de sensor, os CCD possuem um baixo ruído de leitura na ordem da dezena de electrões (e^-_{rms}) e uma grande velocidade de leitura de pixel (uma taxa $\geq 10\text{MHz}$). Em contrapartida, os sensores NMOS possuem um nível de ruído na ordem dos $1000e^-$ mas podem ler sinais 100 vezes maiores que os lidos pelos CCD, que saturam com apenas algumas centenas de milhar de electrões [41].

Em jeito de conclusão, para aplicações com níveis relativamente altos de luz, os sensores NMOS são os mais indicados. Em contrapartida, devido ao baixo ruído e elevada relação sinal/ruído (SNR), para baixos níveis de luz os CCD revelam-se mais eficientes.

2.4. Sistema óptico

O sistema óptico constitui um elemento fundamental na instrumentação para fluorimetria ocular. É responsável pela iluminação, captação, visualização e análise do olho do paciente.

Durante a fase de testes do novo PAF, para simular a aplicação, usou-se uma *cuvette* com fluoresceína, a amostra, em lugar do olho.

Escolheu-se, para esta aplicação, um biomicroscópio de iluminação por fenda, o mesmo usado na anterior versão do PAF, com uma lâmpada de fenda de halogéneo (30SL-M, Zeiss, Alemanha) e filtros de excitação e emissão [25].

O processo de quantificação da fluorescência na amostra/olho é precedido pela excitação do fluoróforo, a fluoresceína aí presente. Em seguida, a luz que emerge deste objecto é captada pela objectiva e conduzida através de um percurso óptico que termina na ocular (figura 20). Neste ponto dá-se a observação por parte do técnico/médico havendo a possibilidade de realizar ajustes na posição da cabeça do paciente ou regular o ângulo de excitação/emissão de forma a focar a zona ocular de interesse.

Ao rodar o divisor de feixe que existe antes da ocular, altera-se o percurso óptico e a luz é direccionada para o local de acoplamento do sensor de imagem, sendo aí recolhida, quantificada e processada posteriormente pelo SAD até à visualização no PC. É este o percurso óptico de maior relevância para esta aplicação e o que sofreu um desenvolvimento no sentido de potenciar as características do sensor de imagem. Estes desenvolvimentos passam pela selecção de três elementos [25]:

- A amplificação óptica do sistema de Galileu da lâmpada de fenda (ajustável: 5x, 8x, 12x, 20x e 30x);
- Lente auxiliar cilíndrica.
- Lente de focagem esférica.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

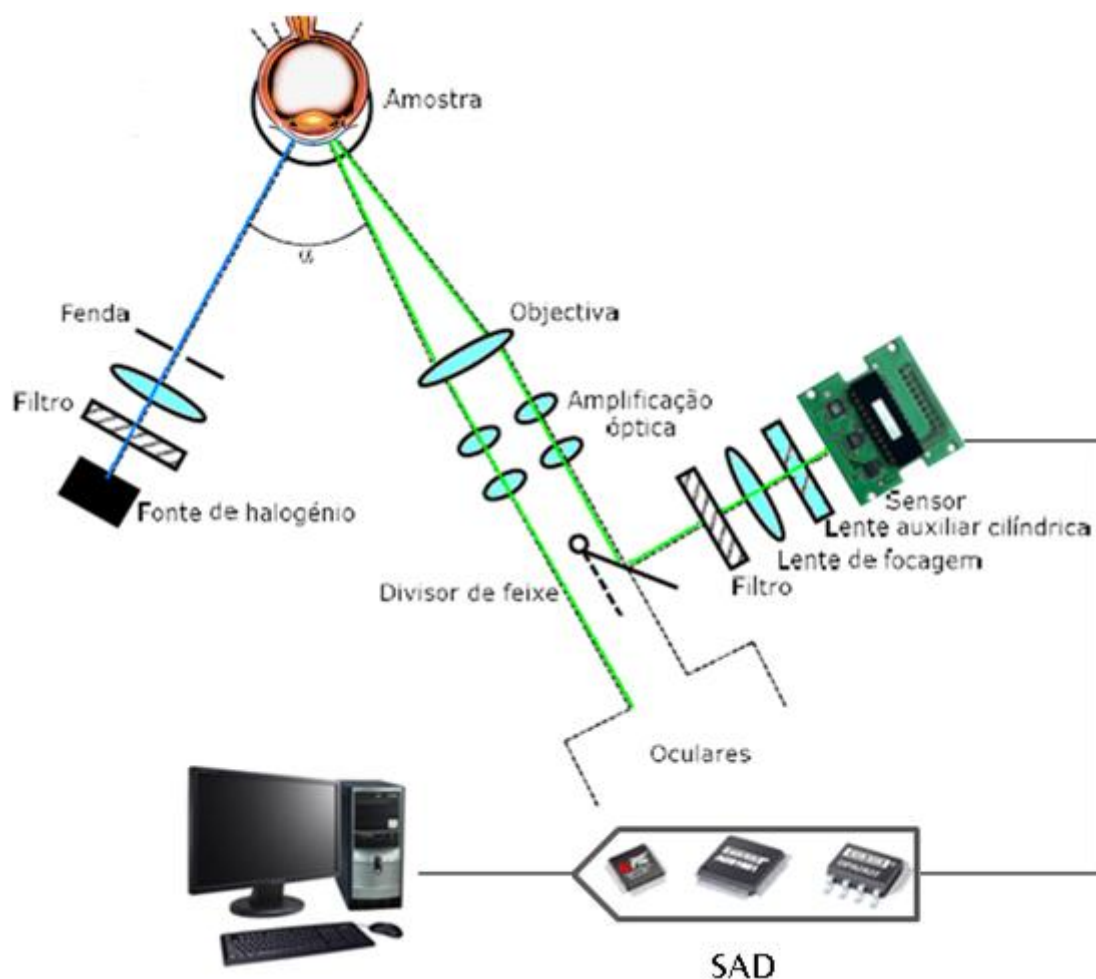


Figura 20 – Esquema representativo do sistema óptico do PAF. Adaptado de [24].

Da versão existente do PAF não se fez qualquer ajuste no que respeita ao primeiro elemento acima referido. Adoptou-se a configuração pré estabelecida, com uma amplificação de 12x no sistema amplificador de Galileu.

Quanto ao segundo elemento, a lente cilíndrica, a sua utilização é opcional. Ela permite concentrar os feixes de luz da imagem gerada após a lente de focagem esférica, reduzindo o tamanho desta imagem no seu eixo vertical, mantendo a dimensão do eixo horizontal [42].

Em relação ao último elemento, a lente de focagem esférica, nesse sim, foram testadas duas hipóteses (75mm e 50mm) tendo-se optado no final pela lente de 50mm pois revelou ser a mais adequada para ajustar o tamanho da imagem num factor adequado à área fotossensível do sensor SSPDA [24].

2.4.1. Otimização do posicionamento angular do sensor SSPDA

O ângulo de excitação/emissão (α , figura 20) segundo o eixo óptico da objectiva, pode ser alterado numa gama entre -90° a $+90^\circ$, o que constitui uma vantagem relativamente à maioria dos fluorómetros comercializados, como o FM, pois permite destacar diferentes porções da amostra/olho em profundidade. Assim sendo, no caso de uma observação do olho, existe a possibilidade de focar o segmento posterior (ex: vítreo; BHR) ou anterior (ex: córnea; BHA), consoante a vontade do médico/utilizador.

- **Efeitos que condicionam a curva característica de uma leitura efectuada com o fluorómetro**, utilizando uma *cuvette* com uma solução de fluoresceína como amostra [25]:

- Lei de *Beer-Lambert*;
- Vinhagem (*Vignetting*);
- Ângulo de posicionamento do sensor.

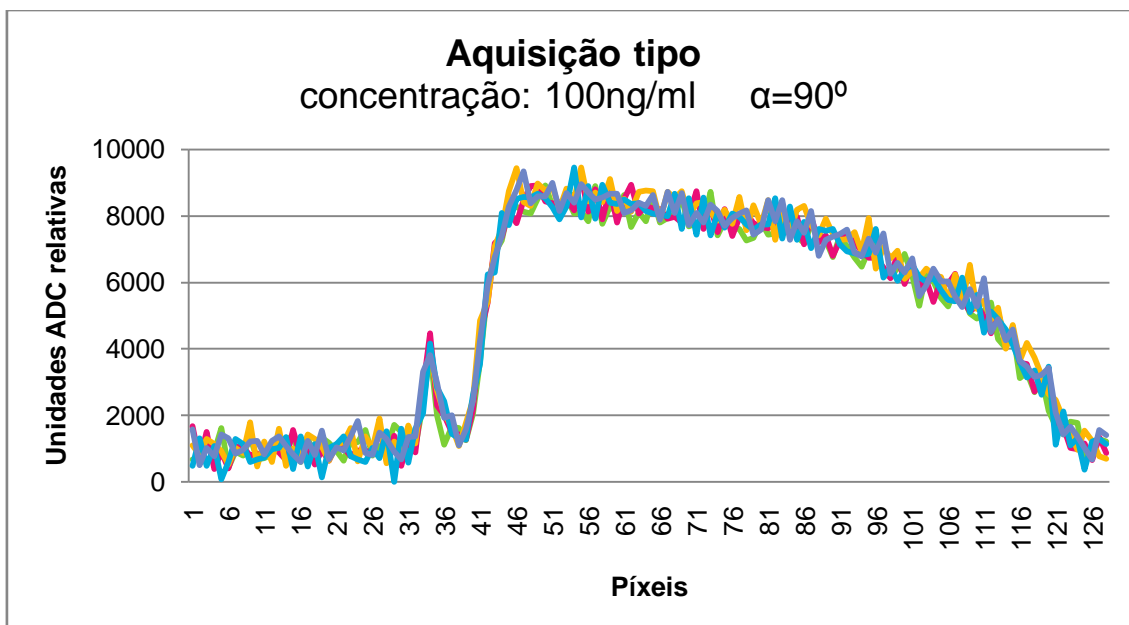


Figura 21 – Curva característica de uma aquisição tipo, com $\alpha=90^\circ$ e [Fluoresceína] = 100ng/ml

Segundo a lei de *Beer-Lambert*, existe uma relação exponencial entre a transmissão da luz através de uma substância e a concentração dessa

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

substância. Este tipo de relação existe também entre a transmissão e a longitude do corpo que a luz atravessa [43].

Por outras palavras, a lei de *Beer-Lambert* prevê que a densidade óptica (D.O = $\log I_0/I_1$) é directamente proporcional à concentração da espécie absorvente. [11]

$$A(\lambda) = \alpha \cdot l \cdot c = -\log_{10} \frac{I_1}{I_0}$$

A - absorvância ou densidade óptica

λ - comprimento de onda da luz.

α - coeficiente de absorção do absorvente ($l \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l - distância percorrida pela luz na amostra (cm)

c - concentração de espécies absorventes no material ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

I_1 - irradiância após a passagem pela amostra ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$)

I_0 - irradiância da luz incidente ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$)

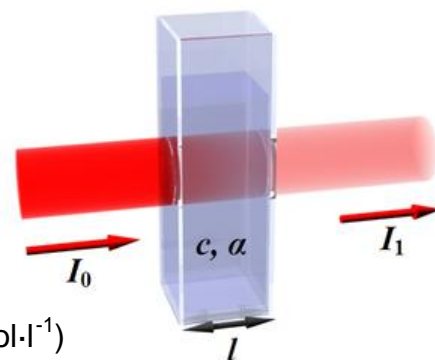


Figura 22 – Transmissão da luz através e uma cuvete. [56]

O efeito de **filtro interno** justifica o facto de a luz após a passagem pela *cuvette* ser de menor intensidade que a luz incidente na mesma. [11]

O efeito de **vinhetagem** traduz-se num decréscimo da resolução da imagem, do centro para as regiões mais periféricas. Isto porque “...a energia da imagem decresce do eixo óptico para as regiões mais periféricas uma vez que o ângulo sólido correspondente ao cone de luz também decresce.” [25]

Um outro fenómeno que tem influência predominante na fidelidade da imagem em relação ao objecto real, é a **relação entre o entre o ângulo de imagem produzida e o ângulo da amostra objecto (ângulo da lâmpada de fenda)**.

Uma vez que para ângulos da lâmpada de fenda diferentes de 90° os planos da imagem formada e do sensor são diferentes (há uma discrepância do posicionamento angular do sensor em relação ao plano da imagem) há, naturalmente, consequências ao nível da relação entre a distribuição de energia do objecto e a distribuição de energia no sensor (imagem detectada), nomeadamente uma certa “desfocagem” que se traduz numa dispersão de luz

proveniente do mesmo ponto objecto por píxeis vizinhos [25] [44]. Este efeito é tanto mais significativo quanto mais extenso for o objecto.

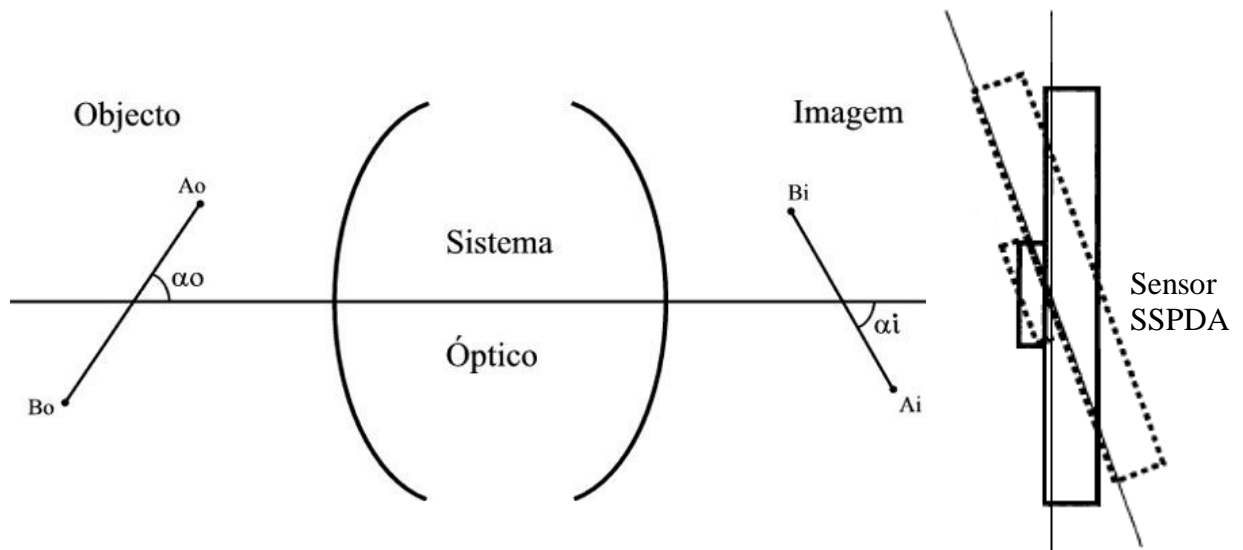


Figura 23 – Trajecto dos raios luminosos através do sistema óptico do novo PAF. Posicionamento angular do sensor. Adaptado de [53] e [44].

Nas experiências realizadas com esta nova arquitectura do PAF foram feitas aquisições para os ângulos de 90°, 60°, 45°, 30°.

O posicionamento angular do sensor influencia de forma notória as curvas características de aquisições feitas com ângulos inferiores a 90°. Por este motivo, e uma vez que estes ângulos agudos são de extrema importância na observação do olho (permitem observar segmentos oculares em maior profundidade), surgiu, tal como já foi referido, a necessidade de estabelecer uma relação entre o ângulo de imagem produzida e o ângulo da amostra objecto. Procurou-se deste modo diminuir as perturbações da imagem obtida, reproduzindo-a da forma mais fiel possível ao objecto. Este estudo foi já realizado e está documentado em [25] e [44].

Citando [25] : “ ...é possível estabelecer uma orientação ideal para o plano do sensor de modo a maximizar a focagem e de modo a que a distribuição de energia na imagem produza, o mais fielmente possível o objecto.”

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

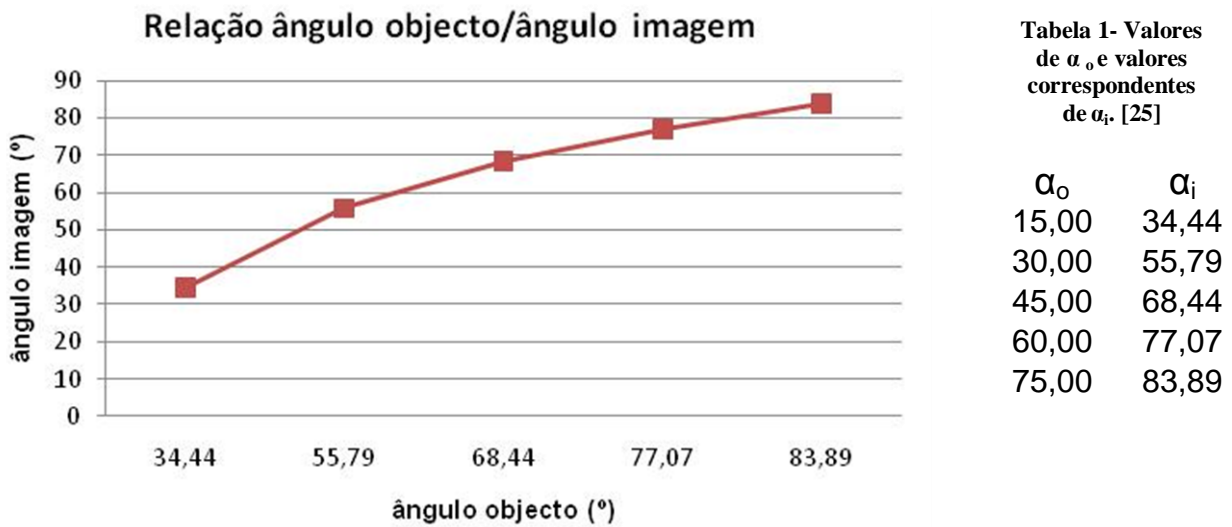


Figura 24 – Relação do ângulo do objecto com o ângulo da imagem. [25]

- **O desviador para optimização do posicionamento angular do sensor SSPDA**

Partindo então dos estudos acima referidos, foi desenvolvida uma peça em alumínio que viria, durante o desenvolvimento deste trabalho, a ser implementada no novo sistema PAF, como uma nova componente do sistema óptico: um desviador para optimização do posicionamento angular do sensor SSPDA.



Figura 25 – Fotografia do desviador angular do novo PAF.

Antes de fisicamente montado e para definir com rigor a posição e direcção destas peças no sistema, efectuou-se no *software* de simulação computacional de lentes **OSLO™** um teste de óptica geométrica. Simularam-se as duas lentes que influenciam directamente o trajecto óptico da luz no sistema, um espelho, correspondente ao divisor de feixe, o objecto a 45° e a imagem gerada. Todas as medidas e características das lentes foram obtidas a partir do documento [44].

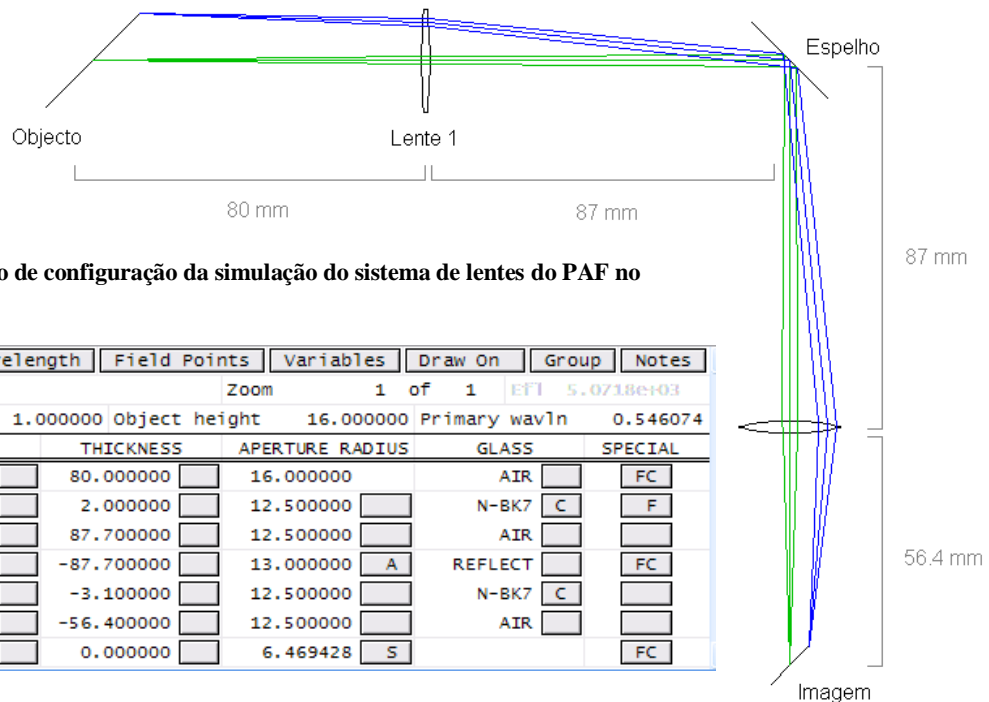


Tabela 2 - Parâmetro de configuração da simulação do sistema de lentes do PAF no Software OSLO.

Gen	Setup	wavelength	Field Points	Variables	Draw On	Group	Notes
Lens: No name		Zoom		1 of 1	EFL	5.0718e+03	
Ent beam radius		1.000000	Object height	16.000000	Primary wavln	0.546074	
SRF	RADIUS	THICKNESS	APERTURE RADIUS	GLASS	SPECIAL		
OBJ	0.000000	80.000000	16.000000	AIR	FC		
1	129.680000	2.000000	12.500000	N-BK7	C	F	
2	-129.680000	87.700000	12.500000	AIR			
AST	0.000000	-87.700000	13.000000	REFLECT	A	FC	
4	-51.870000	-3.100000	12.500000	N-BK7	C		
5	51.870000	-56.400000	12.500000	AIR			
IMS	0.000000	0.000000	6.469428	S		FC	

Figura 26 – Simulação do sistema de lentes do novo PAF.

Esperava-se então obter, após a montagem do desviador, uma distribuição da energia na imagem mais fiel ao objecto. Este fenómeno foi de facto observado uma vez que a curva de aquisição aumentou em largura mas diminuiu em amplitude, ou seja, embora tenha havido uma pequena perda de resolução espacial, eliminou-se o efeito de espalhamento e sobreposição da luz que incidia em cada pixel nos pixéis vizinhos formando-se desta forma uma imagem mais perfeita.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

A figura seguinte foi retirada de [25] e representa uma aquisição *in vivo* com emprego do desviador angular.

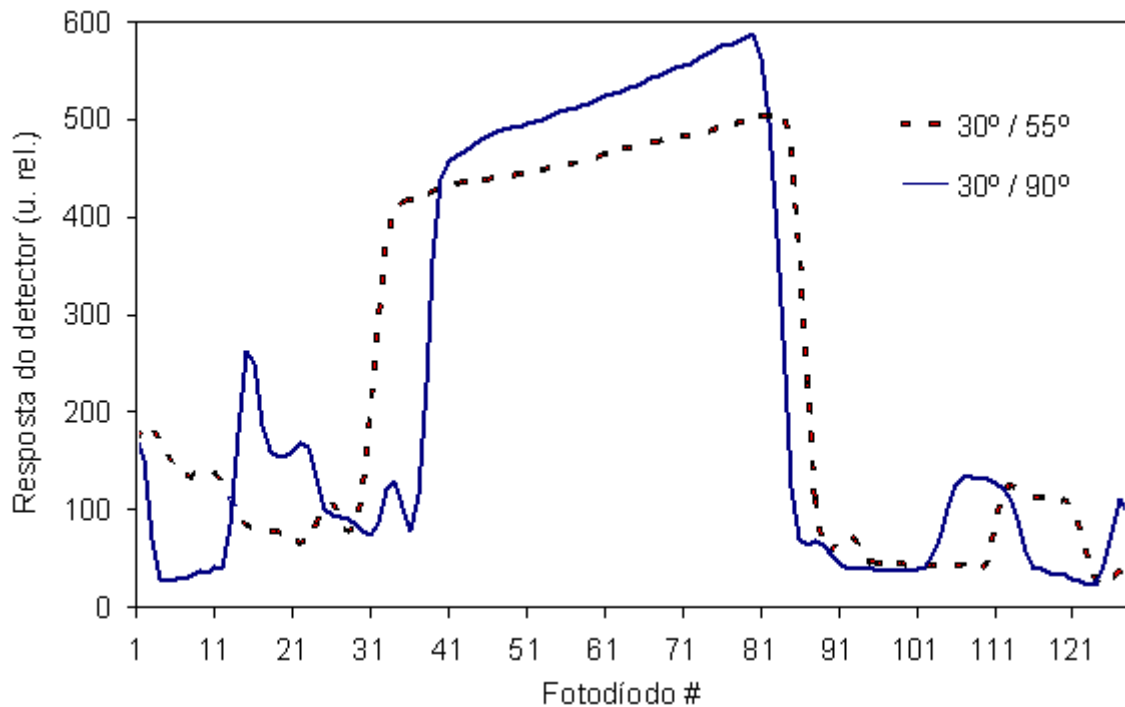


Figura 27 – Resposta do detector em unidades relativas de ADC em função do número de píxeis do sensor SSPA de 128 píxeis. A linha a tracejado representa-se a curva de aquisição com a utilização do desviador angular no PAF (ângulo objecto: 30°, ângulo imagem: 55°); A linha sólida representa a curva de aquisição sem o emprego do desviador angular (ângulo objecto: 30°, ângulo imagem: 90°).

A aplicabilidade do desviador angular ficou comprovada com a realização destes procedimentos. Os testes realizados estão apresentados na secção *Resultados*.

2.5. Software

2.5.1. MATLAB

O MATLAB[®] é uma linguagem técnica de programação de alto nível e um ambiente de desenvolvimento para criação de algoritmos, visualização e análise de dados, e computação (análise) numérica. O facto de suportar operações com vectores e matrizes torna-o vantajoso para a resolução de problemas científicos e de engenharia, uma vez que promove um rápido desenvolvimento e execução.

Das diversas aplicações do MATLAB, a capacidade de processamento de sinal e de realizar testes e medições (a sistemas de aquisição de sinal como o novo PAF) bem como a compatibilidade com outras linguagens (C, C++, etc.) e aplicações (Microsoft Excel) revelaram-se decisivas na escolha deste software [45].

2.5.1.1. Interface gráfica

O MATLAB possui uma ferramenta de desenvolvimento de interfaces gráficas, o GUIDE, que permite incluir menus, caixas de texto, vários tipos de botões interactivos e janelas de gráficos. Foi esta a ferramenta usada na criação das novas janelas de interface com o utilizador do fluorómetro bem como na optimização da janela anteriormente criada para visualização das aquisições realizadas [46].

2.5.1.1.1. A versão existente e sua otimização

Na versão da interface gráfica existente antes do início deste Projecto existiam duas janelas principais. Uma das janelas servia para a visualização em tempo real dos dados adquiridos (janela de aquisição) bem como dos dados resultantes da média dos varrimentos (*scans*) efectuados até ao momento. Existiam ainda três menus, no primeiro (menu *Ficheiro*) fazia-se a inicialização da porta série e no final da aquisição a gravação dos dados relevantes, em dois formatos de ficheiro distintos (.xls - para os dados da aquisição; .mat - para os parâmetros de configuração). No segundo menu (menu *Configuração*), configuravam-se os parâmetros de aquisição: o número de médias a fazer por pixel, tempo de exposição, número de varrimentos, largura de pixel e por fim a concentração utilizada na medição (realizaram-se apenas medições *in vitro*). Finalmente, no terceiro menu (menu *Comandos*), podia-se executar os comandos *WAKE*, *SLEEP*, *ADC*, *INC* e *DEC**

Quando executado o comando *ADC** é devolvida uma janela com os valores de tensão (V) em vários pontos do SAD. Aquando a execução dos comandos *DEC** e *INC**, é devolvida uma caixa de diálogo com o valor do ganho do amplificador PGA.

A iniciação da aquisição era feita através do botão *Iniciar aquisição* e podia ser parada, premindo o botão *Parar*. [24]

*a descrição detalhada dos comandos é feita no subcapítulo: *Estrutura de comandos*, na tabela 3 (pág. 56)

No decorrer deste trabalho, com a realização dos testes de calibração do novo PAF, e utilizando regularmente a interface acima descrita, foi-se tornando evidente que alguns aspectos poderiam ser melhorados. O resultado final é visível na imagem abaixo e será descrito nos seguintes subcapítulos.

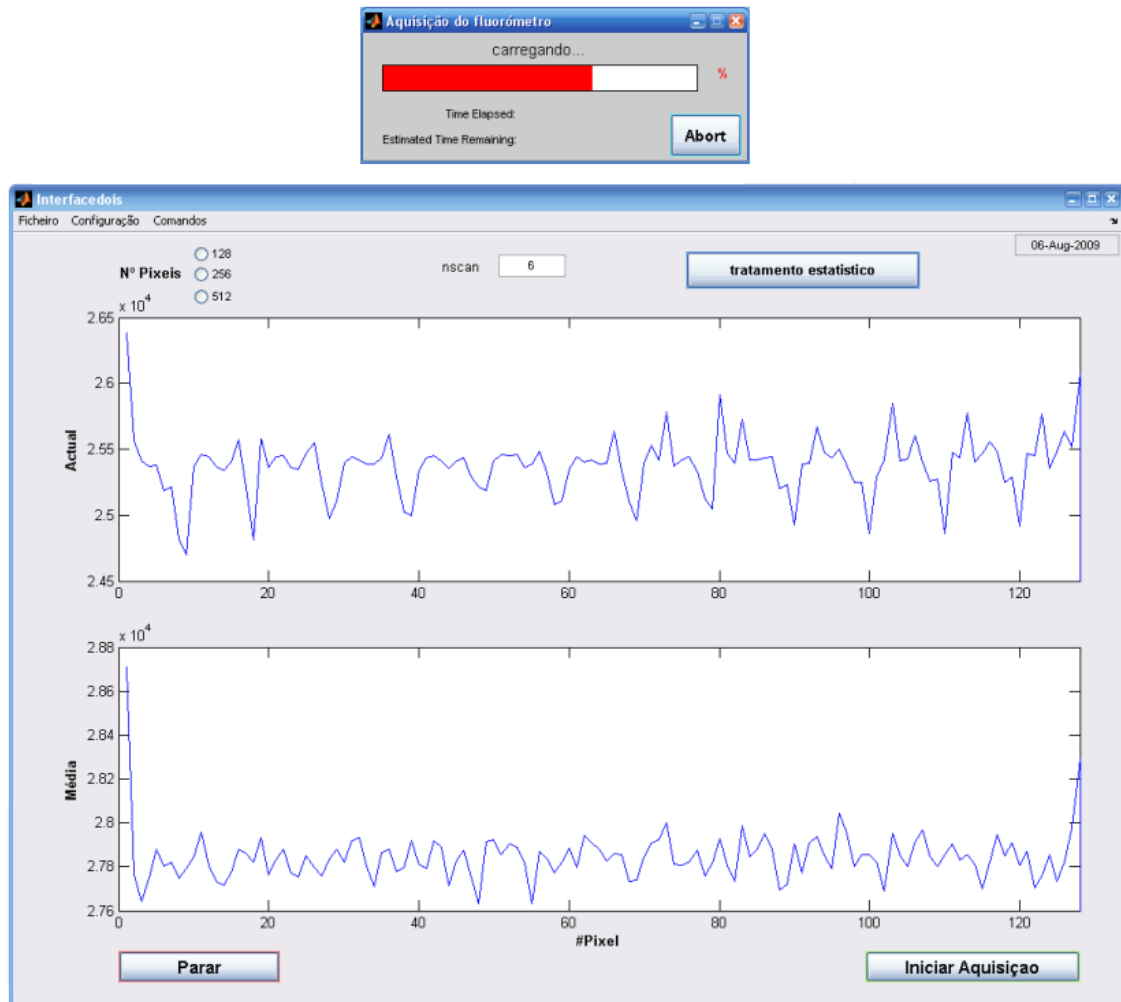


Figura 28 – Janela de aquisição e visualização de dados otimizada.

2.5.1.1.1. Modo de gravação automática

O primeiro ponto que mereceu uma alteração foi o modo como as aquisições eram gravadas. De cada vez que se fazia uma aquisição com o fluorómetro era necessário escrever o nome a dar ao novo ficheiro e encaminhá-lo manualmente para a pasta pretendida. Este processo revelou-se bastante lento e pouco funcional uma vez que quando era necessário gravar dezenas ou mesmo centenas de aquisições se perdia muito tempo.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

As alterações feitas consistiram na criação de um tipo único de ficheiro para gravação de todos os dados, em formato *.mat* (como este é de fácil conversão para *.xls*, não se justifica a criação de dois ficheiros de tipos distintos) e na atribuição de forma automática do nome ao ficheiro, sem que fosse preciso o utilizador escreve-lo. Para isso, predefiniu-se que, ao seleccionar no menu *Ficheiro* a opção *Gravar*, o nome do ficheiro seria constituído pelo valor de concentração da amostra (inscrito no menu configurações) precedido pela data, segundo o formato descrito no seguinte excerto de código:

```
function Guardar_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to Guardar (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
global valores Leituras nscan Tempo concentracao Pix_duration
data
handles.valores = valores;
a='c_aquisicao_';
dt=datestr(now, 'dd mmmm yyyy HH_MM_SS AM');
cd('C:\Documents and Settings\Manuel\Ambiente de trabalho\Manuel
Vitor\MATLAB\Aquisicoes')
[file, path] = uiputfile('*.mat','Guardar
ficheiro',strcat(concentracao,a,dt));
cd('C:\Documents and Settings\Manuel\Ambiente de trabalho\Manuel
Vitor\MATLAB')
if isequal(path,0)
disp('User selected Cancel')
else
ffname = [path, file];
data = valores';
ffname;
save(ffname,'data', 'Leituras','nscan', 'Tempo',
'concentracao', 'Pix_duration') %Guarda num ficheiro *.mat

end
```

Desta forma garante-se que não haverá dois nomes iguais quando são efectuadas mais do que uma gravação.

Para tornar ainda mais eficiente este processo, criou-se também a possibilidade de armazenar, directamente e de uma forma predefinida, todas as gravações numa pasta com o nome *Aquisições*.

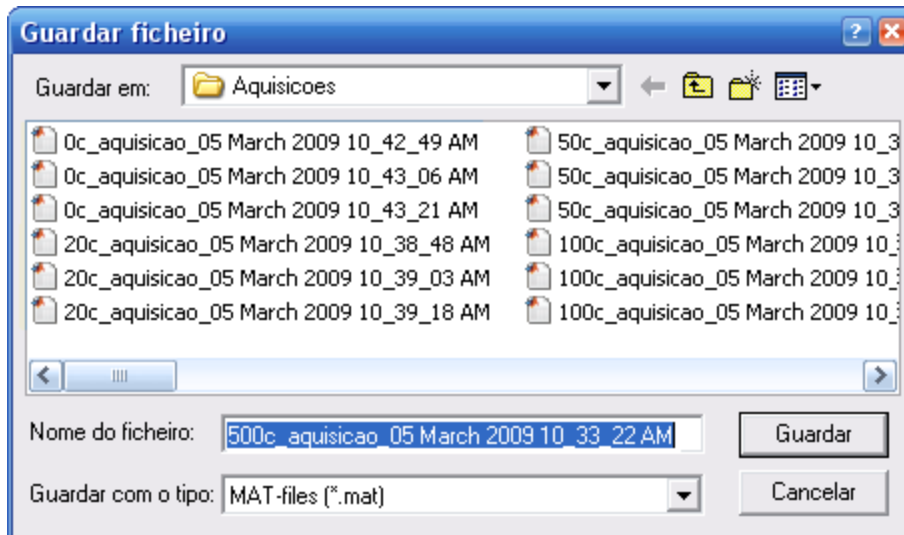


Figura 29 – Janela Guardar ficheiro com automatização do nome do ficheiro e localização (pasta: Aquisicoes).

2.5.1.1.2. Parâmetros default

O segundo aspecto que sofreu alterações foi o menu *Configurações*, novamente numa perspectiva de simplificação e economia de tempo.

Neste menu a alteração realizada consiste em atribuir valores *default* (predefinidos) aos parâmetros de configuração dos sensores, sendo estes valores os valores típicos estabelecidos para os testes de calibração mais recorrentes.

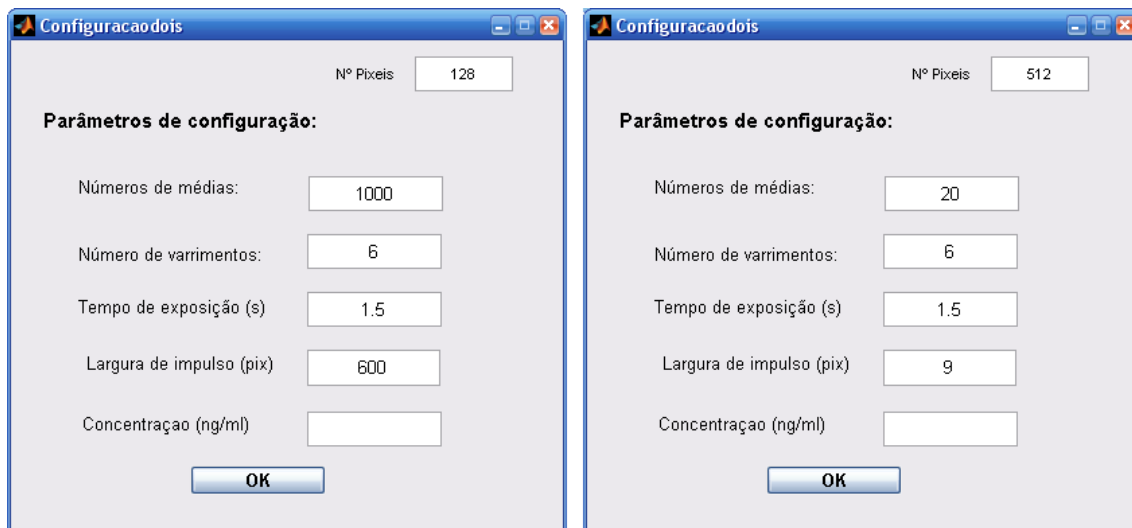


Figura 30 – Janela de configuração de parâmetros com parâmetros default para SSPDA (à esquerda) e FFT-CCD (à direita).

2.5.1.1.1.3. Barra de progressão

Este ponto não constitui uma verdadeira alteração mas sim um acrescento de informação.

Na verdade, quando por motivos de calibração ou teste do sistema se tornava necessário realizar aquisições com várias dezenas, centenas ou mesmo milhares de aquisições, não existia nenhuma informação sobre o varrimento actual que estava a ocorrer, perdendo-se muitas vezes a noção se se estava mais perto do início ou do final da aquisição. Para contornar este aspecto foi inserida uma barra de progresso na janela principal de aquisição:

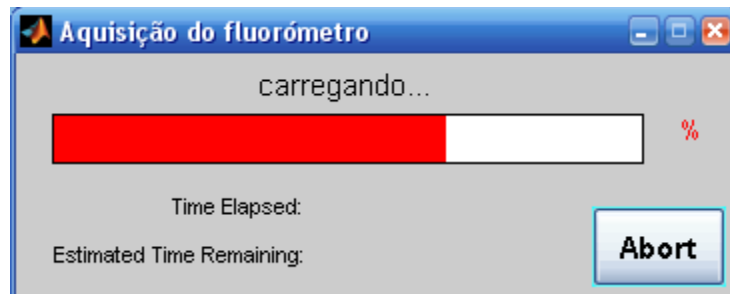


Figura 31 – Barra de progressão da aquisição.

2.5.1.1.1.4. Ajuste automático da janela de visualização do número de píxeis

Esta é a última optimização realizada à anterior versão da interface gráfica e consiste numa opção de selecção do número de píxeis do sensor em aplicação. Após estar definido o número de píxeis a janela de projecção dos dados muda automaticamente a dimensão do eixo horizontal de acordo com o valor estabelecido. Esta informação é imediatamente transmitida ao PIC que automaticamente corre a parte do programa que inicializa o sensor pretendido.

O processo é descrito com maior detalhe na secção *Principais módulos funcionais*.



Figura 32 - Botões de selecção do número de píxeis do sensor.

2.5.1.1.2. Janela de análise de dados

Este ponto, bem como os próximos pontos relativos ao trabalho elaborado no MATLAB, foram desenvolvidos em resposta ao excessivo tempo dispendido no tratamento dos dados em Excel. De facto, chegou-se à conclusão que todo o processamento que era necessário fazer aos dados recolhidos para efectuar os estudos de linearidade, reprodutibilidade e LMD demorava várias horas quando realizado em Excel.

Para contrariar este problema, criou-se um conjunto de cinco funções destinadas a realizar os passos envolventes na calibração dos sensores.

Na janela de análise de dados, cujo acesso se faz a partir da janela principal de aquisição (premindo o botão: *Tratamento estatístico*), é possível visualizar quatro tipos de gráficos distintos: aquisição, zona de interesse, histograma e filtro. Cada gráfico permite uma análise dos dados numa perspectiva diferente e complementar.

Existem ainda dois botões, *Média* e *Desvio padrão*, que indicam, respectivamente o valor da média e do desvio padrão dos pixels da zona de interesse do gráfico.

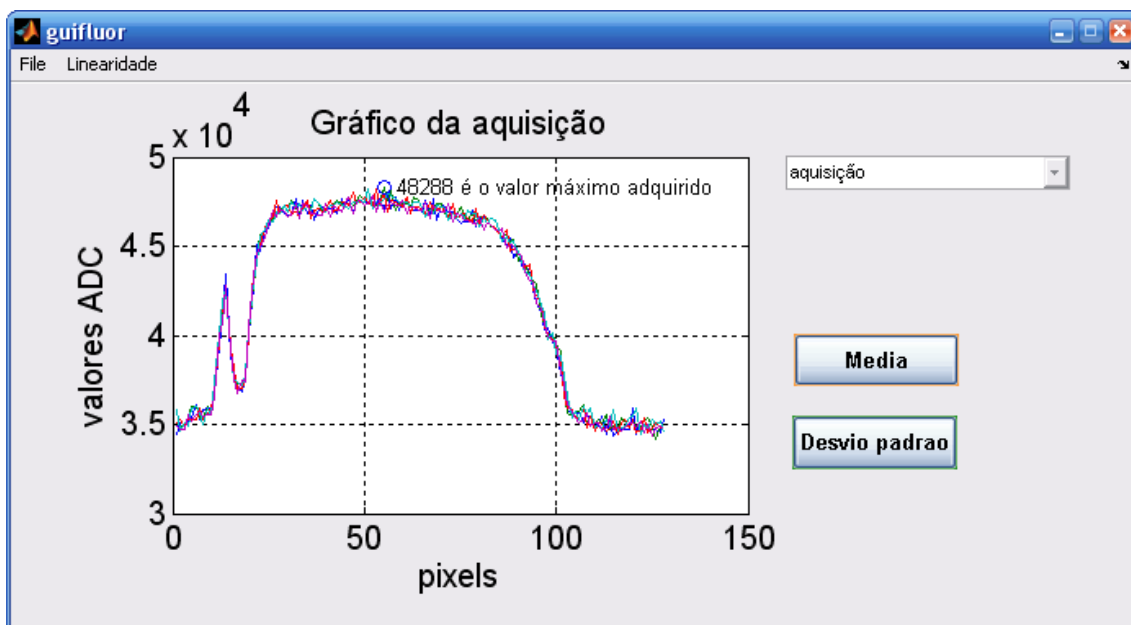


Figura 33 – Janela de tratamento estatístico com a opção de visualização de aquisição escolhida.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

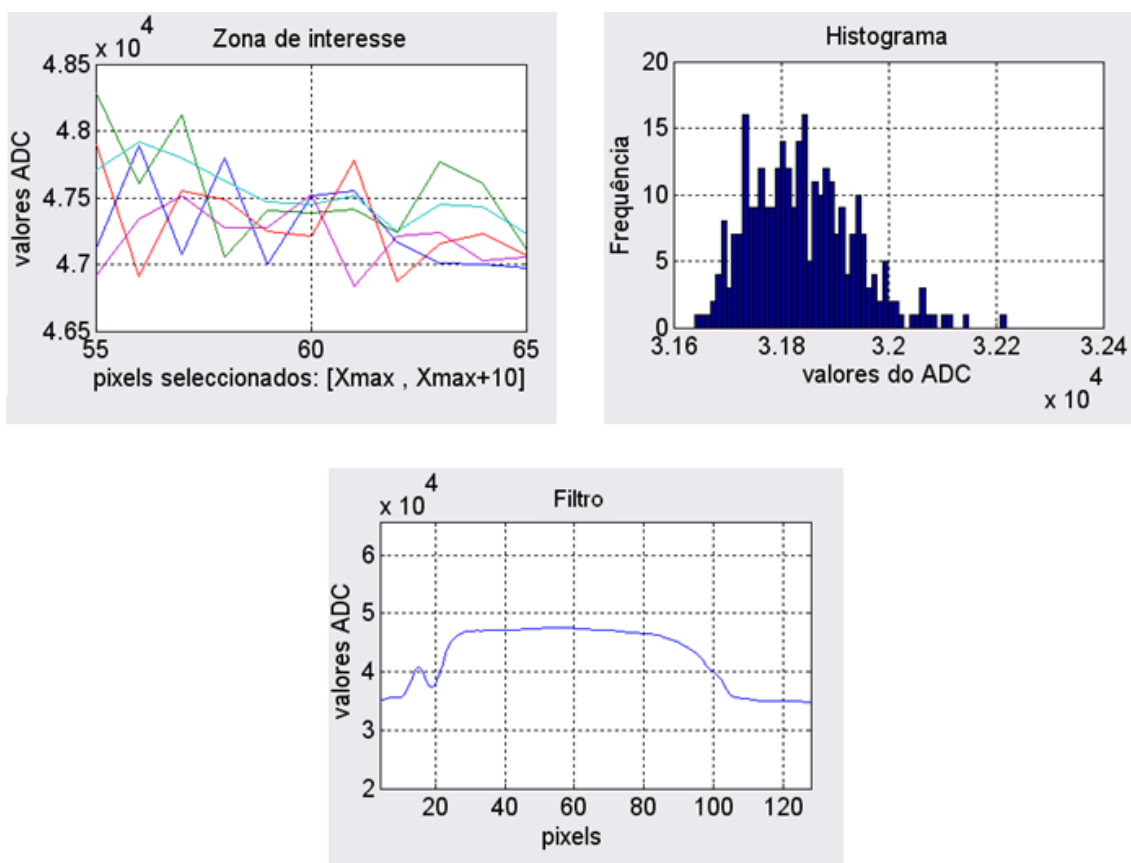


Figura 34 – Opções de visualização na janela de tratamento estatístico: No canto superior esquerdo é ilustrado o gráfico de visualização da zona de interesse; No canto superior direito mostra-se o histograma da distribuição dos valores lidos à saída do ADC; Em baixo, é representado o gráfico do filtro aplicado á curva de aquisição.

Para gerar os gráficos acima, como foi já referido, foram criadas funções: **aquisicao**; **zonint**; **filtmovel**; **histo**; **mediadevpad**.

É de salientar que estas funções, criadas para tratar os dados provenientes de aquisições feitas “*in vitro*” com qualquer um dos sensores testados (SSPDA 128 píxeis, SSPDA 256 píxeis e FFT-CCD de 512 píxeis), “correm” em qualquer aquisição, sem que seja preciso qualquer tipo de alteração no código de cada uma. Basta abrir o ficheiro **.mat** de uma qualquer aquisição realizada e escolher uma das opções da lista na janela *gui fluor*. Automaticamente aparece na janela do gráfico a imagem correspondente à opção seleccionada.

Em seguida explicarei sucintamente o resultado produzido por cada uma das cinco funções criadas:

- **aquisicao**

Esta função permite a visualização gráfica de uma aquisição, apresentando no eixo dos *xx*, o número de píxeis do sensor e no eixo dos *yy*, os valores lidos à saída do ADC. O valor máximo lido à saída do ADC é sinalizado no local exacto da figura e apresenta a seguinte *string* associada: “x é o valor máximo adquirido”, em que x é o valor máximo lido pelo sensor.

```
function aquisicao(data,n)

[a b]= size (data);
x=(1:n);
d=data(2:a,1:n);
y=(d');
[e f]=size (y);

plot(x,y)
xlabel('pixels');
ylabel('valores ADC');
title('Gráfico da aquisição');
grid;
axis auto

% Determine the maximum y data value
max_y_value = max(max(y));
[max_y_linha,max_y_coluna]=find(y==max_y_value);
corresponding_x_value =max_y_linha;
% Put a red circle symbol at the maximum data point
hold on
plot(corresponding_x_value,max_y_value,'o');
hold off
% Create a string vector
our_string = sprintf(' %g é o valor máximo adquirido',max_y_value);
% Put the string into the graph at the max y value
text(corresponding_x_value,max_y_value+0.5,our_string);
```

- **zonint**

A função *zonint* mostra a zona do gráfico da aquisição que apresenta relevância para o tratamento estatístico, nomeadamente para a realização de testes de linearidade. Esta zona consiste numa parte da aquisição (conjunto de píxeis) que apresenta características relativamente estáveis e que constitui a zona de interesse para efectuar os testes de calibração dos sensores. Ela é definida como sendo o intervalo entre o pixel com o valor máximo e os dez píxeis seguintes [máximo; máximo + 10 píxeis] *.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

*esta zona pode facilmente ser alterada se as características da curva assim o exigirem. Para tal basta alterar o intervalo definido pela variável *xfilt*.

```
function zonint(data,n)

[a b]=size(data);
x=(1:n);
d=data(2:a,1:n);
y=(d');
[e f]=size (y);

% Determine the maximum y data value
max_y_value = max(max(y));
[max_y_linha,max_y_coluna]=find(y==max_y_value);
corresponding_x_value =max_y_linha;
xfilt=(max_y_linha:max_y_linha+10);
y1=y(xfilt,1:f);

plot(xfilt,y1)
xlabel('pixels seleccionados: [Xmax , Xmax+10]');
ylabel('valores ADC');
title('Zona de interesse');
axis auto
grid;
```

- **filtmovel**

O gráfico gerado por esta função consiste num filtro de médias móveis (uma função pré-definida no MATLAB, de nome *filter*) de n valores passados em relação ao actual (por defeito, $n=4$). É aplicado a uma matriz que contém tantas colunas como o número de píxeis do sensor e um número de linhas igual ao número varrimento efectuado. Como resultado, o filtro é aplicado a cada varrimento e obtêm-se seis curvas. Posteriormente é feita a média de todos os varrimentos (já submetidos individualmente ao filtro) e gerada a imagem final, uma curva única.

```
function filtmove1(data,n)

[a b]=size (data);
x=(1:n);
d=data(2:a,1:n);
y=(d');
windowSize = 4; %regular o nº de elementos com que faz a média móvel
fdata=filter (ones (1,windowSize)/windowSize,1,y); % Aplicado o filtro
filter

plot (1:n,mean (fdata'))
axis auto
grid
```

- **histo**

Consiste num histograma (função pré-definida no MATLAB, de nome *hist*) do valor médio da zona de relevância estatística ([máximo; máximo + 10 píxeis]) para o conjunto de varrimentos (*scans*) efectuados.

Os limites do intervalo de valores, em unidades de ADC (representado pela variável *binCtrs*), que serve de base ao histograma são o valor mais mínimo e o valor máximo do total de valores médios das zonas de relevância estatística dos vários varrimentos, com um “espaçamento” constante de 10 unidades entre valores sucessivos.

Obtém-se, por este meio, um histograma que informa sobre o número de ocorrências dos valores contidos na zona de relevância estatística média.

Resumidamente, é calculada a média para o conjunto de valores de relevância estatística seleccionado em cada varrimento efectuado (no código: $y2 = \text{mean}(y1,1)$). Em seguida, para o total de varrimentos, faz-se a distribuição destes valores ao longo dos sucessivos intervalos de 10 unidades.

```
function histo(data,n)

[a b]=size (data);
x=(1:n);
d=data(2:a,1:n);
y=(d');
[e f]=size (y);

max_y_value = max(max(y));
[max_y_linha,max_y_coluna]=find(y==max_y_value);
xfilt=(max_y_linha:max_y_linha+10);
y1=y(xfilt,1:f);
y2= mean(y1,1);

%histograma da distribuicao
binWidth =10;
binCtrs = min(min(y2)):binWidth:max(max(y2));

hist(y2,binCtrs);
xlabel('valores do ADC'); ylabel('Frequência'); %ylim([0 10]);
title('Histograma');
grid;
```

Esta função tem como finalidade fornecer uma resposta rápida após a realização de um teste de reprodutibilidade, por exemplo no caso de se querer determinar o desvio em relação ao valor lido com maior frequência pelo sensor, para uma solução com uma concentração conhecida. Nesta situação, se a

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

duração do teste for longa, a quantidade de valores a processar é bastante grande.

Após uma aquisição longa, de vários minutos ou horas, com vários varrimentos, este gráfico transmite a informação sobre os valores médios adquiridos, o desvio em relação ao valor central, ou intervalo de valores, e a frequência de ocorrência dos vários valores.

- **Mediadevpad**

Esta função destina-se simplesmente a calcular, para o número de varrimentos escolhido, o valor médio do pixel na zona de relevância estatística ([máximo; máximo + 10 píxeis]) e o correspondente desvio padrão.

```
function [numeroM,numeroD]=mediadevpad(data,n)
[a b]=size (data);
x=(1:n);
d=data(2:a,1:n);
y=(d)';
[e f]=size (y);

% Determine the maximum y data value
max_y_value = max(max(y));
[max_y_linha,max_y_coluna]=find(y==max_y_value);
corresponding_x_value =max_y_linha;
xfilt=(max_y_linha:max_y_linha+10);
y1=y(xfilt,1:f);
m=mean(y1);
desvpad=std(m);
my=[mean(m)];

numeroM=sprintf('%g',my);
numeroD=sprintf('%g',desvpad);
```

2.5.1.1.3. Janela de Linearidade/Calibração

Esta janela, como o nome indica, permite traçar o gráfico de linearidade para os dados correspondentes a um conjunto de aquisições com concentrações conhecidas segundo um plano estruturado no decorrer deste trabalho. Este plano consiste em realizar três aquisições nas mesmas condições para 5 amostras com os seguintes valores de concentração: 0ng/ml; 20ng/ml; 50ng/ml; 100ng/ml e 500ng/ml. Depois, usando os valores da zona de interesse estatístico em cada uma, é automaticamente calculado o valor médio, em unidades ADC, correspondente a cada concentração e, ao premir o botão linearidade, é traçada a recta de calibração.

Ao seleccionar a opção *Conversao*, as constantes da equação de recta traçada ($y=aX+b$) são importadas para o menu *Concentraco*es (ver figura 36). É este menu que permite determinar, para um valor dado em unidades de ADC, a respectiva concentração em ng/ml e o seu desvio padrão. Estes dados, juntamente com outros preenchidos no menu *Concentraco*es podem ser guardados num ficheiro *.mat*, bastando para isso seleccionar a opção *Gravar*.

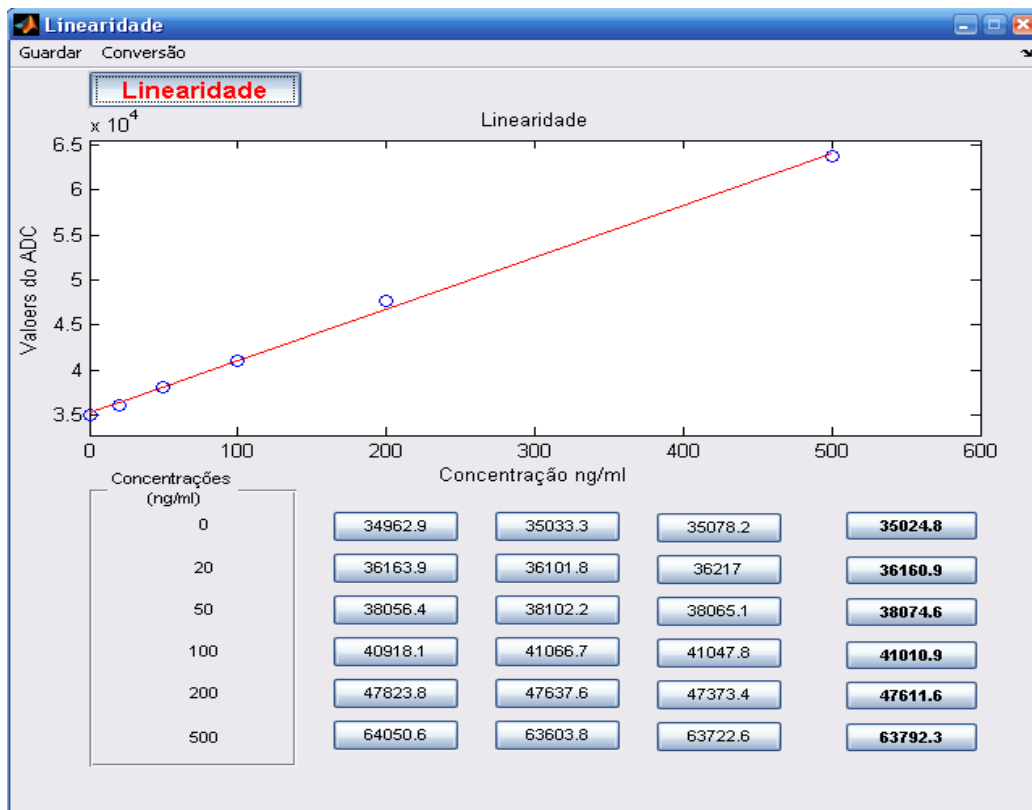


Figura 35 - Janela de Linearidade. Gráfico da linearidade traçado para um conjunto de aquisições com concentrações de fluoresceína conhecidas.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

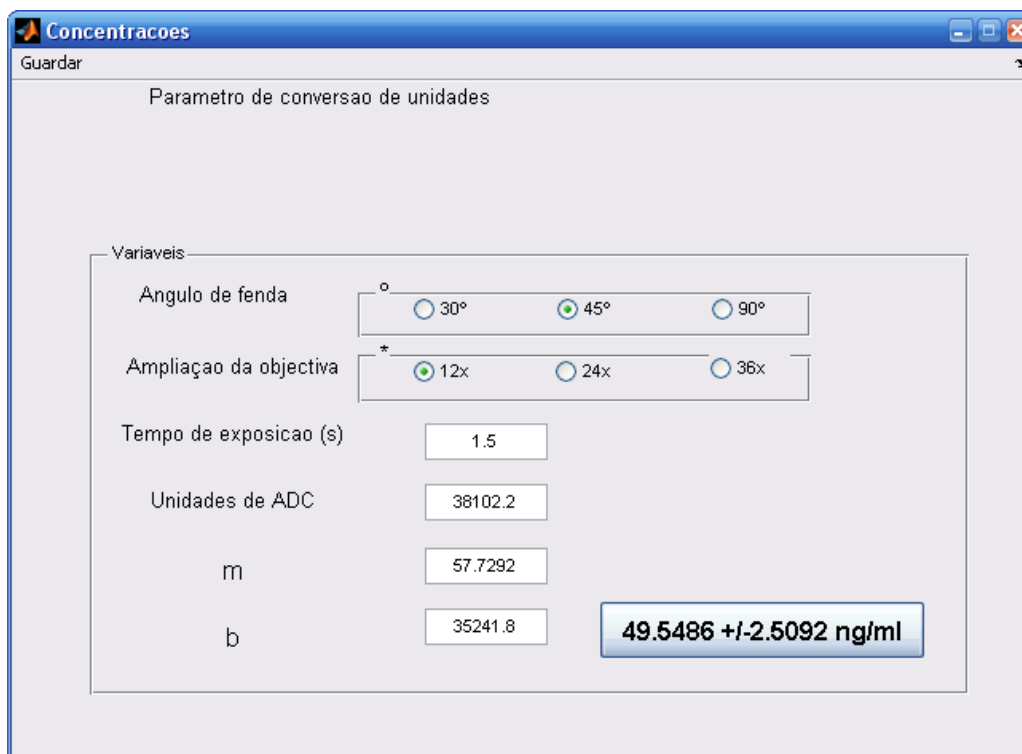


Figura 36 - janela de conversão de unidades ADC para o valor de Concentração de fluoresceína correspondente e respectiva variância.

2.5.1.1.4. Filtro digital

O filtro digital consiste num simples filtro que corta o valor do pixel quando este difere, em mais de 5000 unidades do valor do pixel anterior, atribuindo-lhe o valor do pixel anterior.

A necessidade de criação deste filtro digital surgiu quando se observou que em certas aquisições ocorriam “artefactos”, picos aleatórios e de grande amplitude sem significado físico aparente.

Estes artefactos perturbam, em certas circunstâncias, a apresentação dos dados no ecrã e o seu posterior processamento. A sua eliminação é justificável e não implica perda de informação relevante.

```
for i=2:n;
    if dados(:,i)>(dados(:,i-1)+ 5000) || dados(:,i)<(dados(:,i-1)- 5000);
        dados(:,i)=dados(:,i-1);
    end
end
```

2.5.2. MPLAB IDE – O Software do dsPIC

O MPLAB IDE é um software para o sistema operativo Windows®, corre num PC, e foi feito para desenvolver aplicações para microcontroladores e controladores de sinal digital da Microchip.

O termo IDE significa, *Integrated Development Environment*, esta designação deve-se ao facto de o MPLAB fornecer um “ambiente” integrado para o desenvolvimento de código para microcontroladores embutidos (*embedded*). [35]

A versão do MPLAB é a v8.30 e o compilador utilizado na programação do dsPIC30F6012A integrado no SAD do fluorómetro é o MPLAB C30 C *Compiler*. A programação é feita em linguagem C.

Seguidamente será descrita a estrutura do programa instalado no PIC.

2.5.2.1. Estrutura básica

Em seguida será feita uma breve descrição dos ficheiros que constituem o projecto do microcontrolador.

2.5.2.1.1. Header files

Esta classe de ficheiros contém variáveis e outro tipo de inicializadores, (ponteiros) para além de subrotinas (interrupções).

- **Config.h**

Interrupções accionadas pela variavel externa *counter*, para inicialização do pino 1 e pino 3, *timer1*, *timer1_Pixduration* e módulo de comunicação síncrona SPI2;

- **Delay.h**

Definição das variáveis das rotinas de temporização (*delay*) e definição da velocidade e frequência de *clock* externo.

2. *O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF*

▪ **Hardware.h**

Definição dos pinos do dsPIC, inicialização dos pinos e Portos. Configuração do ADC interno de 12bits. Configuração dos botões (*switch* S1 e S2) e leds (verdes e vermelhos).

Configuração dos pinos conectados ao ADC externo de 16 bits (ADS1601).

Configuração dos pinos conectados ao amplificador de ganho programável AD526 e controlo do ganho.

Controlo do sensor SSPDA.

Controlo da câmara CCD.

▪ **OscillatorSystemCodes.h**

Este cabeçalho permite configurar os osciladores através do registo OSCCON, definir a frequência de relógio FRC e os osciladores.

▪ **Sistem.h**

Definições para a temporização do *clock* do sistema, configuração modo XT x PLL8 do oscilador, taxa de transferência ($F_{cy} \approx 30 \text{ MIPS}^*$) e tempo de ciclo de instrução ($T_{cy} = 34\text{ns}$).

Definições da porta de serie (*Baud rate* e *buffer size*, *buffer* de transmissão e recepção).

Definição dos comandos para operar os sensores.

Inicialização das variáveis externas, destacando as correspondentes aos parâmetros de configuração dos sensores: *numero_leituras*, *pix_duration* e *no_pixeis*.

*MIPS = *Million Instructions per Second*

2.5.2.1.2. Source files

O código fonte constitui o programa em si e é, neste caso, distribuído por um conjunto de ficheiros de texto. Estes ficheiros e a sua função serão descritos em seguida.

- **clock_switch.c**

Rotinas para alteração dinâmica do *clock*, de acordo com os valores definidos em *OscillatorSystemCodes.h*.

- **delay.c**

Gera os vários *delays* para aplicar ao longo do ficheiro *main.c*

- **traps.c**

Vectores de interrupção de erro interno do processador.

- **config.c**

Inicialização do *Timer1*, inicialização de *Timer1_Pixduration* (*PR1 = pix_duration*). Inicialização do pino 1 (*Init_INT1pin*) e pino 1 (*Init_INT3pin*).

Inicialização do módulo de comunicação síncrona (*Init_SPI2*) com o ADC externo (*AD1601*). Configuração do ADC.

- **hardware.c**

Controlo e definição dos vários níveis de ganho do amplificador de ganho programável AGC. Inicialização e configuração dos portos B, C, D, F, G através da função IO (*Input/Output*). Inicialização dos pinos de controlo do sensor SSPDA. Inicialização dos pinos de controlo da câmara CCD.

- **interrupt.c**

Rotina de interrupção do *timer1*. Rotina de interrupção do botão de pressão SW2. Rotina de interrupção do sinal EOS, vindo do SSPDA. Rotina de recepção dos dados da porta série. Rotina de transmissão dos dados da porta série.

2. O novo sistema de aquisição de dados do fluorómetro PAF

▪ **USART.c**

Inicialização das variáveis *numero_leituras*, *pix_duration* e *no_píxeis* com valores default. Inicialização das *strings* correspondentes aos comandos e parâmetros controlados externamente através da porta série: "READ", "SLEEP", "WAKE", "ADC", "1000", "ACQ", "MEDIA", "INC", "DEC", "CCD", "CAMERA", "NAQ", "PIX", "NOP.

Inicialização do módulo Uart2, configuração da porta série. Função *Send_String* para envio de *string* para a porta série. Função *handle_serial* para processar as *strings* recebidas pela porta série. Compara as *strings* recebidas com as *strings* inicializadas e executa o comando ou tarefa associada a cada *string*.

Inicialização das variáveis temporárias *naq*, *pix* e *no_pix* que recebem os valores dos parâmetros de configuração dos sensores vindos do MATLAB e atribuídos em seguida no PIC às variáveis *numero_leituras*, *pix_duration* e *no_píxeis*, respectivamente.

▪ **main.c**

Este é o módulo funcional principal de todo o código de programação do PIC. É aqui que se processam as tarefas em resposta a cada comando introduzido, bem como a selecção da parte do programa correspondente a cada um dos sensores utilizados no fluorómetro.

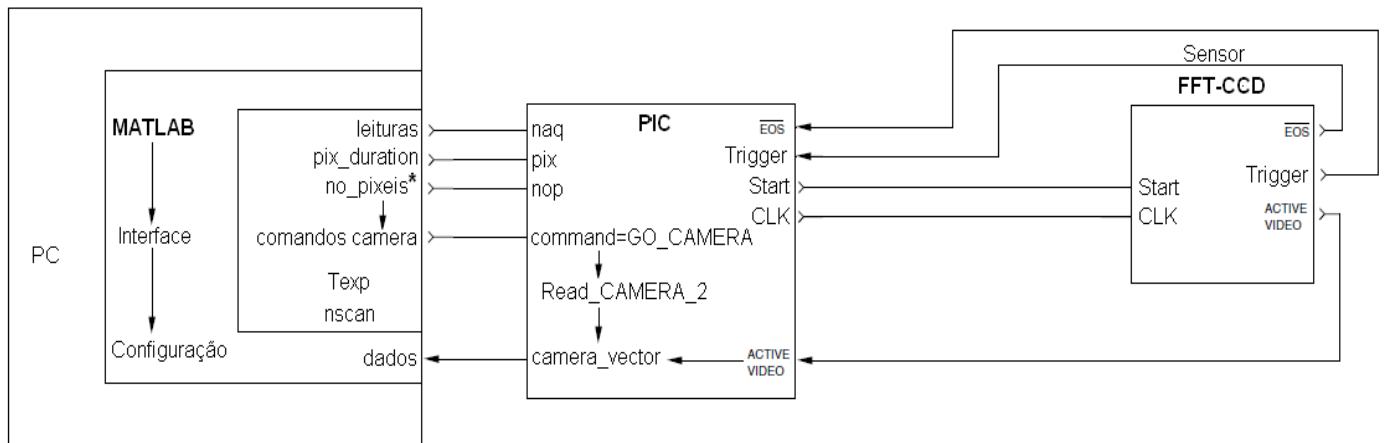
2.5.2.2. Principais módulos funcionais

2.5.2.2.1. Drive/leitura do SSPDA

Os sinais Φ_1 , Φ_2 , Φ_{st} e Φ_{reset} são controlados directamente pelo Microcontrolador (dsPIC), de acordo com as especificações do sensor NMOS (SSPDA).

O tempo de integração ou exposição, definido pelo utilizador (T_{exp}), constitui a unidade básica de temporização de leitura do sensor, e é programado a partir da interrupção do Timer1 do PIC.

O utilizador pode ainda definir o número de conversões por píxel e o ritmo de leitura inter-píxel. Estes dois parâmetros estão, naturalmente, inter-relacionados e ambos dependem do tempo de integração escolhido.



*no_pixeis = 512

Figura 37 - Esquema do funcionamento da Drive/Leitura do SSPDA. Interação SSPDA – PIC – MATLAB.

Se no MATLAB se escolher a janela de visualização de 128 ou 256 píxeis, automaticamente o comando CCD é escrito na porta série e, ao ser reconhecido pelo PIC, o programa é conduzido para a função Read_CCD_2 responsável pela inicialização e sincronização dos impulsos de leitura do sensor SSPDA (Φ_1 , Φ_2 , Φ_{st} , Φ_{reset}) e posteriormente dá-se a leitura dos dados produzidos pelo sensor e o seu armazenamento no vector *ccd_vector* com 128 ou 256 valores consoante o número de píxeis do sensor. Estes valores são então enviados pela porta série para o MATLAB onde são armazenados na variável *dados*, para posterior processamento e análise.

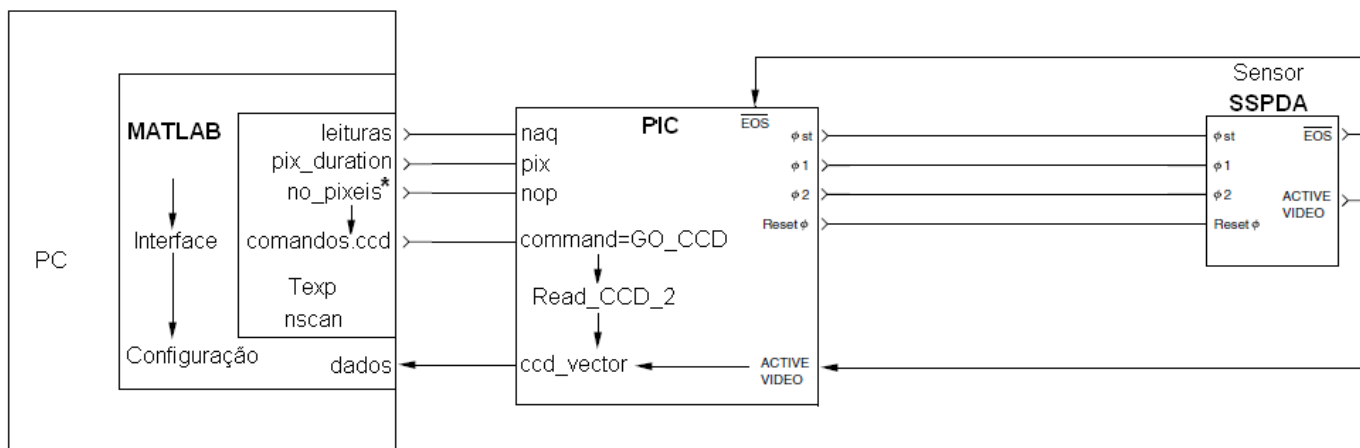
2.5.2.2.2. Drive/ leitura da câmara FFT-CCD

Na câmara CCD, os sinais de leitura e controlo directo encontram-se implementados no próprio dispositivo e são accionados a partir de dois sinais básicos fornecidos externamente, o *Start* e o *CLK*. Estes dois sinais são duas saídas directas do PIC.

Por sua vez, a câmara tem duas saídas digitas (o *Trigger* e o *EOS*), fundamentais para sincronizar a conversão analógico-digital com o sinal vídeo da câmara, e que são entradas directas do PIC.

Na CCD, a unidade básica de temporização é o *CLK* cuja duração (número de períodos) é definida pelo T_{exp} escolhido. A sua implementação é feita, tal como no SSPDA, a partir da interrupção *Timer1_Pixduration*. O sinal *Trigger* comanda o início da conversão de cada pixel e o *EOS* determina o final do *scan* (varrimento).

No caso de se escolher na interface gráfica do MATLAB a janela de visualização para 512 píxeis, o comando *camera* é escrito na porta série e o programa do PIC, ao reconhecê-lo, é conduzido para a função *Read_CAMERA_2*, cuja tarefa é a inicialização e sincronização dos impulsos de leitura da câmara CCD (*TRIGGER*, *CLK*, *START*, *EOS*). Em seguida é feita a leitura dos dados produzidos pela câmara e o seu armazenamento no vector *camera_vector* com 512 valores. Estes valores são então enviados através da porta série para o MATLAB onde são armazenados na variável *dados*, para posterior processamento e análise.



*no_pixeis = 128; 256

Figura 38 - Esquema do funcionamento da Drive/Leitura da câmara CCD. Interação CCD – PIC – MATLAB.

2.5.2.2.3. Estrutura de comandos

Os comandos de controlo do sistema estão pormenorizadamente descritos em [24].

Em seguida será mostrada uma tabela adaptada de uma versão presente no documento referido acima, que descreve resumidamente os comandos e sua função:

Tabela 3 - Descrição dos comandos de controlo dos sensores. Adaptado de [24].

Comando	Função
WAKE	Coloca o processador a <i>full-power</i> (elevado consumo de energia).
SLEEP	Coloca o processador a baixo consumo de energia.
READ	Permite saber se ocorreu ou não <i>overflow</i> do ADC.
CCD	Lê os pixéis do sensor de imagem SSPDA.
CAMERA	Lê os pixéis da câmara CCD.
MEDIA	Devolve 2000 valores da saída do sensor de imagem, em que cada um resulta da média de 16.
ACQ	Devolve 2048 valores da saída do ADC, pressionando o interruptor S1 antes e depois da aquisição desses valores.
DEC	Diminui o ganho do amplificador AD526.
INC	Incrementa o ganho do amplificador AD526.
ADC	Devolve as tensões em vários pontos do sistema de aquisição de dados.
1000	Devolve 2048 valores da saída do ADC.
NAQ	Permite seleccionar o número de médias a fazer por pixel durante a leitura do sensor.
PIX	Possibilita a escolha da largura (duração) de cada pixel durante a aquisição.
NOP	Permite seleccionar o número de pixéis a ler pelo sensor.

2.5.2.2.4. Inicialização/programação de parâmetros

Dos comandos acima referidos é importante destacar os três últimos (*NAQ*, *PIX*, *NOP*), uma vez que constituem os parâmetros cujos valores são definidos no MATLAB e transmitidos ao PIC sempre que se pretenda realizar uma aquisição.

Existem ainda mais dois parâmetros de configuração das aquisições definidos apenas no MATLAB: *Texp* e *nscan*.

O parâmetro *nscan* diz apenas respeito ao número de varrimentos a fazer pelo sensor.

O parâmetro *NOP*, ao mesmo tempo que recebe o valor do número de píxeis do sensor, activa selectivamente as partes do código que controlam o sensor com esse número de píxeis, como já foi referido na descrição do código do PIC.

Quanto ao parâmetro *Texp*, este determina o tempo de duração de cada varrimento, ou seja, o tempo que o sensor está exposto à luz em cada varrimento. O valor de *Texp* é armazenado na variável *Tempo*.

Um aspecto particularmente importante diz respeito à estrita interligação entre os comandos *Texp*, *NAQ* e *PIX**. Na verdade, tem-se, para um determinado número de píxeis, uma “duração de pixel” seleccionável (*PIX*) e um número de “conversões por pixel” ajustável (*NAQ*), dependentes do intervalo de tempo durante o qual o sensor está exposto luz (T_{exp}), também ele definido pelo operador. Esta característica permite procurar a combinação ideal dos valores destes parâmetros de forma a maximizar as potencialidades dos sensores utilizados no novo PAF.

*o comando *PIX* é controlável a partir de uma “variável” pré-definida (special-function register) do PIC, o PR1 (Period Register). Esta “variável” (registo) é usada para produzir um reset periódico do Timer1. O período de *reset* é definido pelo comando *PIX* no MATLAB e o seu valor é transmitido para a variável *pix_duration* no microcontrolador ($PR1=pix_duration$).

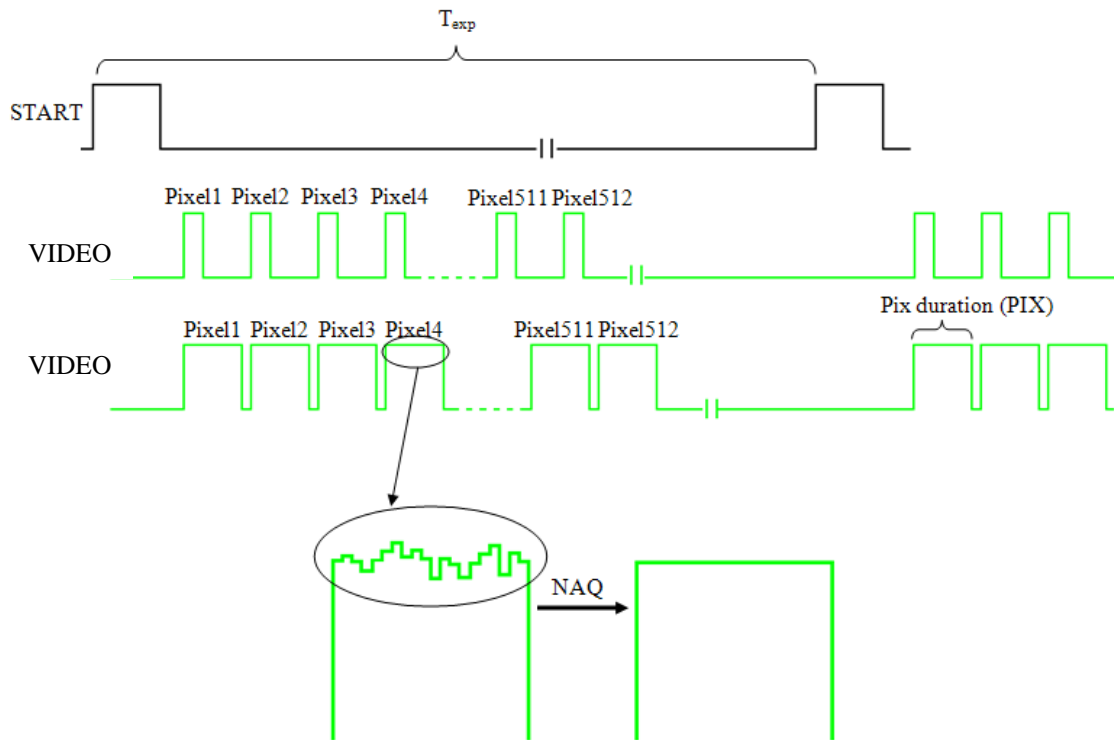


Figura 39 – Esquema representativo da acção dos comandos *PIX* e *NAQ* e T_{exp} no sinal proveniente dos sensores, para 1 varrimento ($nscan=1$).

3. Resultados

3.1. Testes de calibração dos sensores SSPDA (128 píxeis e 256 píxeis)

Os testes de calibração realizados com os sensores SSPDA (128 e 256 píxeis) foram essencialmente de três tipos: linearidade, reprodutibilidade e limite mínimo de detecção (LMD).

Dos testes mencionados, os primeiros foram os de linearidade, que consistem em verificar a existência de uma relação linear entre a concentração de fluoresceína presente na amostra em observação e os valores detectados à saída do ADC e encaminhados para a interface gráfica no PC.

Para realizar estes testes foram inicialmente realizadas aquisições com ângulos de fenda, α , de 45° ("front face illumination") e 90° ("Conventional right-angle").

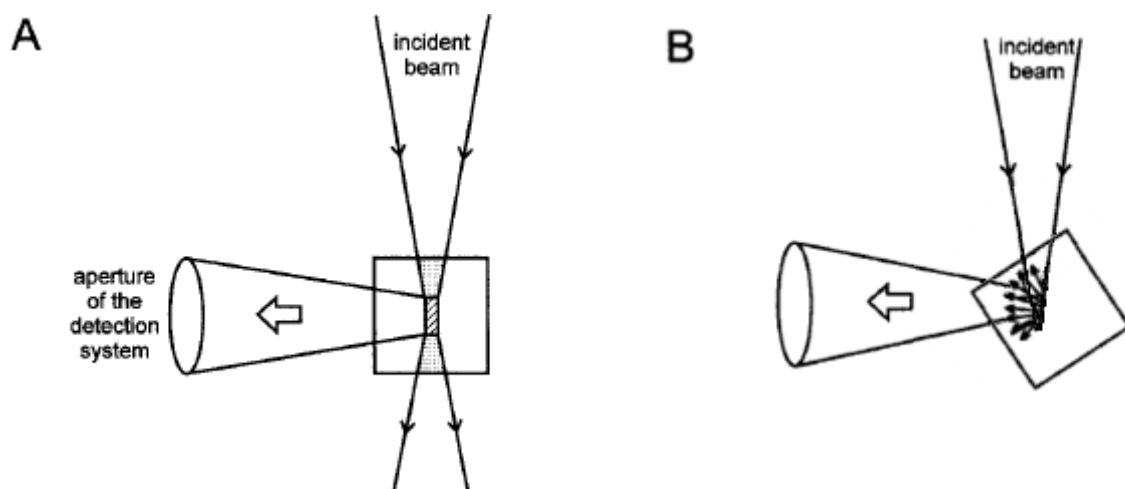


Figura 40 – A - Representação do ângulo da lâmpada de fenda a 90° ("Conventional right-angle"); B - Representação do ângulo da lâmpada de fenda a 45° ("front face illumination").

Com uma *front face illumination* podemos observar uma boa relação linear entre a intensidade de fluorescência captada pelo sensor e a concentração de fluoresceína da amostra, esta relação melhora para concentrações elevadas ($> 1 \times 10^{-3} \text{g/ml}$). [10]

Observando os gráficos das primeiras aquisições *, é notória a presença de “artefactos” que aparece em posições aleatórias e com valores também eles variáveis que não têm origem na solução de fluoresceína. Este fenómeno pode estar relacionado com o facto de parte da luz incidente na amostra não ser absorvida pela solução e ser directamente reflectida para o sistema de detecção, interferindo com a luz de fluorescência – “*stray light interfering*”. [47]

* nos primeiros testes, os menus da interface gráfica (MATLAB) para tratamento estatístico dos dados adquiridos pelo PAF ainda não tinham sido criados pelo que, toda a análise era feita em *excel*.

Numa primeira fase usou-se um tubo de ensaio para colocar a amostra de fluoresceína em vez de uma *cuvette* quadrada pois com esta os resultados eram afectados pelas suas arestas, que interferem com o feixe de luz.

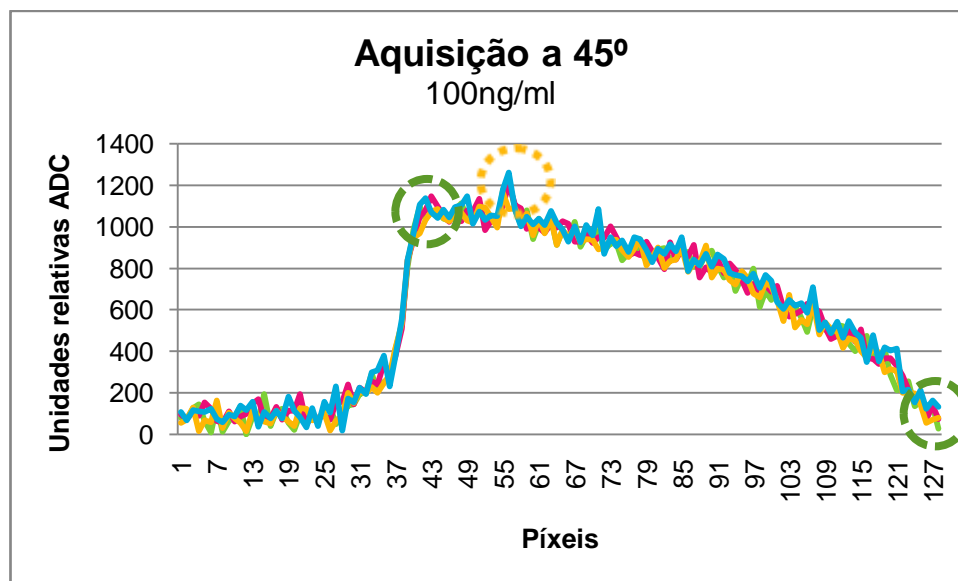



Figura 41 - Curva de aquisição com $\alpha=45^\circ$ e [Fluoresceína]=100ng/ml.

 Artefacto originado por reflexão a 45°

 Extremos da zona de captura de fluorescência da amostra

Nesta aquisição, a forma da curva na zona de captura da fluorescência da amostra é explicada pela lei de *Beer-Lambert* uma vez que os primeiros

3. Resultados

píxeis desta zona (\approx píxel 40) apresentam valores claramente superiores aos píxeis finais (\approx píxel 128). Este comportamento é devido ao facto de a substância estar mais concentrada no fundo do tubo de ensaio, zona essa que é captada pelos fotodíodos iniciais do *array* de fotodíodos do sensor.

Os testes realizados com *Conventional right-angle*, apresentam características diferentes uma vez que o sistema recolhe a fluorescência emitida principalmente pela parte central onde incidiu o feixe de excitação. Para concentrações inferiores a 1×10^{-3} g/ml a luz é apenas ligeiramente atenuada através do tubo de ensaio ou *cuvette*. Uma vez que para o estudo que se fez apenas se utilizaram concentrações até 500ng/ml o efeito de atenuação praticamente não se faz sentir. [10]

Quando se usa este ângulo de lâmpada de fenda (90°), pode existir um efeito de **filtro interno** (auto-absorção), ou seja, substâncias presentes na solução podem absorver luz do mesmo comprimento de onda que a fluoresceína, diminuindo a intensidade da fluorescência a captar pelo detector [11]. Uma vez que a substância usada é água destilada este efeito não é perturbador.

Uma vantagem deste ângulo de iluminação é o facto de ao se optar pelo uso de uma *cuvette* quadrada, as arestas não perturbem a curva de aquisição. Sendo assim, usa-se preferencialmente a *cuvette*, uma vez que no suporte para fixação da amostra é mais fácil encontrar uma posição estável e repetível para a *cuvette*, cuja base é uma superfície plana, relativamente ao tubo de ensaio que tem uma base curva (semi-esférica).

O gráfico seguinte mostra uma aquisição feita nestas condições.

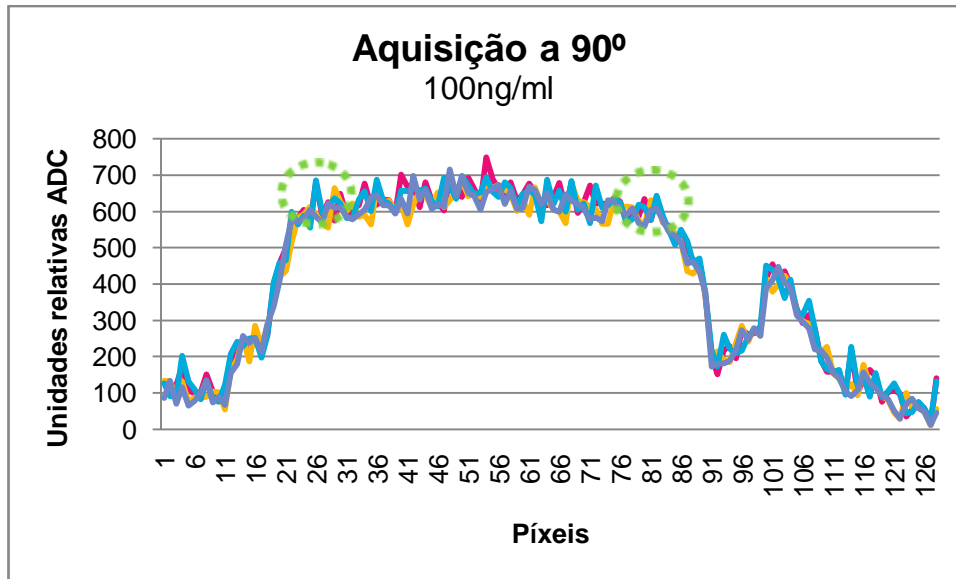


Figura 42- Curva de aquisição com $\alpha=90^\circ$ e [Fluoresceína]=100ng/ml.



Extremos da zona de captação de fluorescência da amostra

Nesta curva de aquisição o valor máximo detectado localiza-se no centro da zona de captação da fluorescência da amostra (aproximadamente entre o píxel 25 e 85). Este fenómeno deve-se à distribuição de energia na imagem, superior no eixo óptico relativamente às regiões mais periféricas - efeito de *vinhetagem*.

A lei de *Beer-Lambert* também se manifesta, embora de forma leve, uma vez que valor dos píxeis no início da zona que capta a fluorescência (por volta do píxel 25) é superior ao dos píxeis do final da mesma (próximo do píxel 85).

Após se repetir o procedimento várias vezes com diferentes ângulos de fenda e usando tanto o tubo de ensaio como ao cuvette quadrada para depositar a amostra, fez-se um balanço dos “prós e contras” de cada configuração e chegou-se a uma configuração padrão. Esta configuração foi usada para realizar os testes (finais) de linearidade e é descrita em seguida.

3.1.1. Linearidade

O procedimento padrão para a realização dos testes de linearidade foi o seguinte:

A cada aquisição colocou-se no suporte da amostra uma *cuvette* quadrada com fluoresceína. A concentração da substância era conhecida.

As soluções de fluoresceína usadas tinham as seguintes concentrações: 0ng/ml; 20ng/ml; 50ng/ml; 100ng/ml; 200ng/ml; 500ng/ml.

Foram feitas três aquisições para cada concentração. Os parâmetros standards de configuração das aquisições foram:

Conversões por pixel: 1000

Nº de varrimentos: 6

Tempo de exposição (s): 1,5

Largura de pixel: 440* [440(PR1) x 256(*Prescaler* 1:256) x 1 ciclo de instrução ($\approx 68\text{ns}$) $\approx 0.0076\text{s}$]

*o controlo desta variável é explicado no final do subcapítulo: *Inicialização/programação de parâmetros*.

O primeiro varrimento de cada aquisição foi sempre descartado antes da análise de dados devido ao facto de sofrer o efeito de LAG.

Em cada uma das três aquisições foi seleccionada uma zona de interesse em torno do valor máximo [Max-2 píxeis; Max+8 píxeis]* pois verificou-se que, seguindo este critério, se conseguia obter uma zona com características estáveis. Com os dados deste intervalo de valores, determinou-se o **valor médio** e o **desvio padrão** [48].

As fórmulas de cálculo destes parâmetros estatísticos são descritas em seguida:

$$\text{Valor Médio} = \frac{\sum_2^6(\text{valor médio da zona de interesse}_i)}{n - 1}$$

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{\sum_2^6(\text{valor médio da zona de interesse}_i - \text{Valor Médio})^2}{n - 1}}$$

sendo i um varrimento individual e n o número de varrimentos de uma aquisição.

O procedimento repetiu-se para as várias concentrações, obtendo-se uma tabela com o seguinte aspecto genérico:

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão para cálculo da Linearidade para o sensor SSPDA de 128 píxeis.

Concentrações ng/ml	Zona de interesse média 4 scans	Valores relativos Unidades ADC	Desvio padrão
C0 a	34627,9		15,6
C0 b	34627,7		17,7
C0 c	34625,1		12,3
C0 Média	34626,9	0,0	17,7
C20 a	34812,6		16,6
C20 b	34802,3		8,2
C20 c	34808,2		9,9
C20 Média	34807,7	180,8	16,6
C50 a	35104,1		19,0
C50 b	35101,0		12,2
C50 c	35103,7		13,0
C50 Média	35103,0	476,0	19,0
C100 a	35584,7		15,2
C100 b	35568,8		11,1
C100 c	35573,7		17,0
C100 Média	35575,7	948,8	17,0
C200 a	36467,2		7,6
C200 b	36468,5		17,5
C200 c	36460,7		11,6
C200 Média	36465,5	1838,5	17,5

*O intervalo escolhido em torno do valor máximo não tem necessariamente que ser o referido. Fizeram-se testes com os intervalos [Max-5;Max+5] e [Max;Max+10] e não se observaram diferenças significativas nos resultados.

O Gráfico correspondente é em seguida ilustrado:

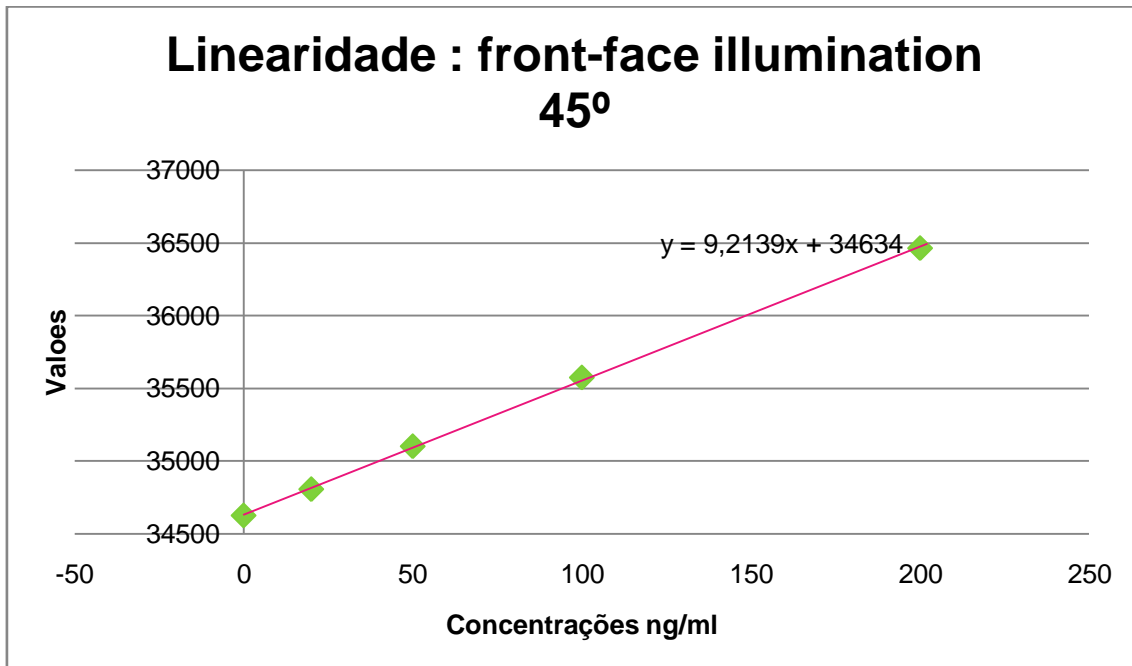


Figura 43- Linearidade com $\alpha=45^\circ$.

Estes testes foram efectuados varias vezes, com pequenas alterações no hardware (SAD), de forma a verificar qual a afinação em termos de amplificação e offset que produzia melhores resultados, e com dois sensores diferentes (SSPDA 128 e 256 píxeis). Um aspecto que se revelou extremamente vantajoso neste processo de análise de dados foi o facto de existirem duas placas de hardware exactamente iguais que possibilitaram a realização de testes com diferentes afinações, em paralelo.

Uma das afinações realizada foi a optimização do ganho. Para tal, regulou-se o potenciómetro (associado ao somador inversor OPA 2613)* para controlar o nível de base e regulou-se o segundo potenciómetro (associado ao seguidor de ganho OPA 2613)* para ajustar a gama dinâmica.

*os esquemas representativos destes AmpOps encontram-se nas figuras 7 e 8, respectivamente (pág. 14)

Efectuou-se ainda uma alteração no código do PIC a que se deu o nome de **conversão do nível de base**.

Esta implementação, a **conversão do nível de base**, pode ser explicada com recurso a um paralelismo com a taxa de rejeição de modo comum (CMRR) de um amplificador diferencial [49]. Aqui, a parte do sinal que é comum às duas entradas do amplificador (o ruído) é eliminada, sendo a saída igual à parte do sinal que é singular.

Para cada píxel geram-se, no processo de digitalização do sinal vídeo, duas zonas distintas, uma a que se chama nível de base e outra cujo valor de tensão está directamente relacionada com o nível de exposição de luz a que o sensor é sujeito. O valor da base do píxel (fase em que não está a ocorrer leitura de sinal luminoso) é tomado como referência e é subtraído à zona do píxel que traduz a exposição luminosa do sensor. Pretende-se desta forma atenuar os efeitos de oscilação da parte comum do sinal (DC).

3. Resultados

O efeito pretendido com esta optimização do ganho foi de facto atingido como se pode constatar a partir da análise da seguinte tabela cujos valores correspondem a testes feitos com o **sensor SSPDA de 128 píxeis** ($\alpha=30^\circ$):

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão para cálculo da Linearidade para o sensor SSPDA de 128 píxeis.

Concentrações ng/ml	Zona de interesse (valor médio) 4 scans	Valores relativos Unidades ADC	Desvio padrão
C0 a	35018,1		186,7
C0 b	35100,9		104,9
C0 c	35125,6		117,8
C0 Média	35081,5	0,0	186,7
C10 a	35501,5		162,0
C10 b	35582,6		135,6
C10 c	35592,8		86,5
C10 Média	35559,0	477,4	162,0
C20 a	36167,9		163,9
C20 b	36124,4		186,4
C20 c	36241,1		138,4
C20 Média	36177,8	1096,2	186,4
C50 a	38048,9		184,9
C50 b	38118,6		142,7
C50 c	38062,9		90,4
C50 Média	38076,8	2995,2	184,9
C100 a	40891,1		170,3
C100 b	41073,6		100,0
C100 c	41019,5		103,8
C100 Média	40994,7	5913,2	170,3
C200 a	47848,7		140,5
C200 b	47645,6		190,1
C200 c	47425,4		128,4
C200 Média	47639,9	12558,4	190,1
C500 a	64102,5		141,9
C500 b	63605,1		181,1
C500 c	63730,9		235,0
C500 Média	63812,8	28731,3	235,0

Imediatamente se percebe que houve um aproveitamento da gama dinâmica do ADC em relação às primeiras aquisições mas observa-se também um aumento do valor do desvio padrão. São as consequências directas da optimização do ganho.

O erro de linearidade é de 1,84% e a equação de recta é $S_{ADC}(C) = 57,891 C + 35200$.

Com este melhoramento os parâmetros LMD e erro de linearidade aproximam-se dos valores de referência da primeira versão do PAF.

Para o **sensor SSPDA de 256 píxeis** foi feito um teste com $\alpha=45^\circ$ e exactamente os mesmos parâmetros de configuração que na situação descrita imediatamente acima. Os resultados estão expressos na tabela:

Tabela 6 - Valores médios e desvios padrão para cálculo da Linearidade para o sensor SSPDA de 256 píxeis.

Concentrações ng/ml	Zona de interesse (Valor médio) 5 scans	Valores relativos Unidades ADC	Desvio padrão
C0 a	25891,7		49,9
C0 b	25795,6		71,5
C0 c	25881,9		86,9
C0 Média	25856,4	0,0	86,9
C20 a	26787,5		133,6
C20 b	25899,4		121,1
C20 c	26987,4		137,7
C20 Média	26558,1	701,7	137,7
C50 a	28899,9		249,8
C50 b	28682,5		133,4
C50 c	28687,2		143,7
C50 Média	28756,5	2900,1	249,8
C100 a	32221,0		202,8
C100 b	32064,5		233,5
C100 c	32177,4		214,2
C100 Média	32154,3	6297,9	233,5
200a	38585,5		205,8
200b	37979,4		102,4
200c	38194,6		168,6
C200 Média	38253,2	12396,8	205,8
C500 a	55772,9		211,0
C500 b	55550,8		293,0
C500 c	55392,5		215,2
C500 Média	55572,1	29715,7	293,0

Erro de linearidade =1,78%

Equação de recta: $S_{ADC}(C) = 59,9 C + 25842$

3.1.2. Reprodutibilidade

Para a realização dos testes de reprodutibilidade, o procedimento adoptado passou pela escolha dos parâmetros de calibração da aquisição descrita em seguida:

Médias por pixel: 1000

Nº de varrimentos: 3000

Tempo de exposição (s): 1,5

Largura de pixel: 440

Concentração de fluoresceína: 0 ng/ml

O ganho da placa estava otimizado, ou seja, aplicou-se a conversão de base.

Este *setting* dos parâmetros traduz-se numa aquisição de 1h:25m. O nível de luz na sala era o mais baixo possível uma vez que o teste foi realizado durante a noite e, por este motivo, os níveis de luminosidade externa não variaram.

O resultado desta experiência revelou que o valor médio obtido para a concentração 0ng/ml em unidades do ADC foi de 42404,3 com um desvio padrão de 110,2 (figura 44).

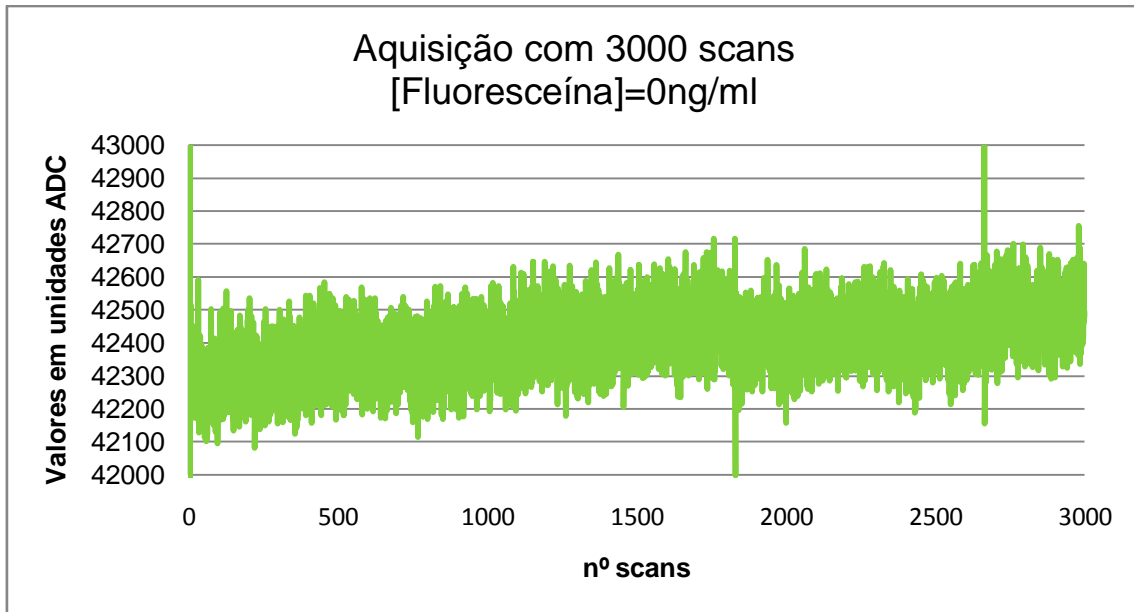


Figura 44- Curva característica de aquisição com [Fluoresceína] = 0ng/ml e 300 varrimentos.

Elaborou-se também para este teste um histograma para analisar a frequência de ocorrência dos valores. Para tal, estabeleceu-se para o eixo das abcissas 100 intervalos desde o valor mínimo até ao máximo detectado. O resultado foi o seguinte gráfico:

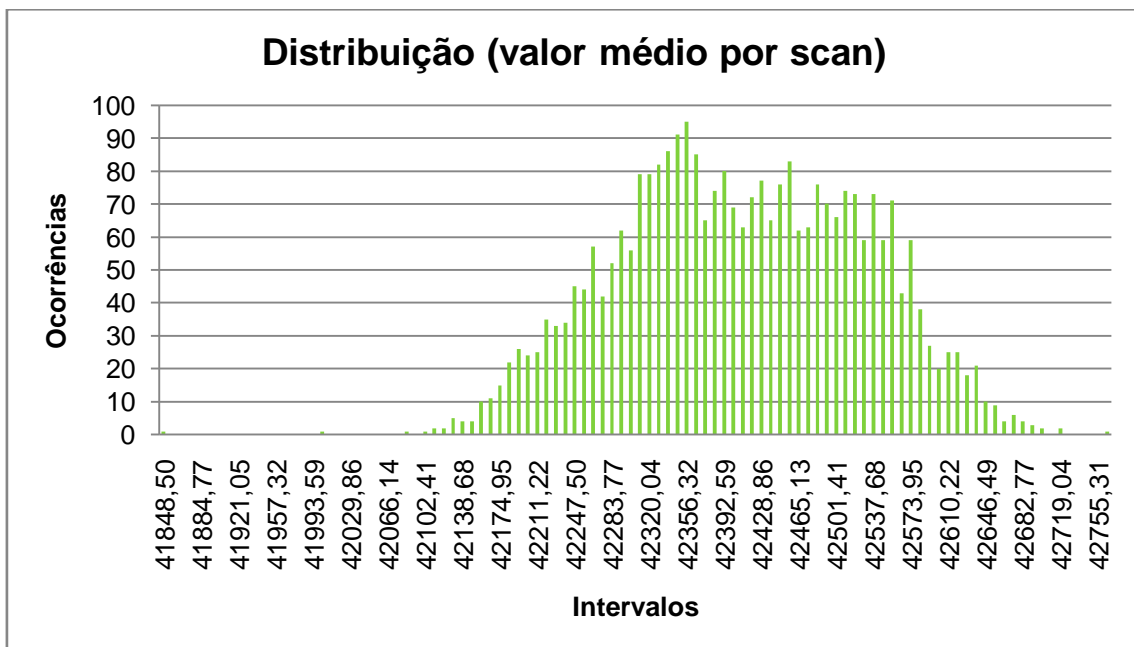


Figura 45 - Histograma da reprodutibilidade (300 scans).

3.1.3. Nível mínimo de detecção (LMD)

O nível mínimo de detecção, como o próprio nome indica, corresponde ao incremento mínimo de luz que o sensor é capaz de detectar [8]. No contexto do trabalho efectuado, este parâmetro estatístico traduz-se valor ADC correspondente ao nível de luz detectado para uma concentração de 0 ng/ml, tendo em conta o desvio padrão em relação ao valor médio obtido.

O valor do desvio padrão em relação ao valor médio obtido (em unidades ADC) é convertido para o valor equivalente em unidades de concentração (ng/ml). Neste processo recorre-se à recta de calibração obtida nos testes de linearidade do **sensor SSPDA de 128 píxeis** ajustando-a em relação ao valor (em unidades ADC) da concentração zero, obtendo-se: $S_{ADC}(C) = 74,426 C + 203,89$. Em seguida, multiplica-se por dois o valor de C obtido. É este valor que corresponde ao LMD.

Os parâmetros de configuração da aquisição escolhidos foram idênticos aos usados nos testes de reprodutibilidade.

O valor LMD obtido após esta experiência é de 1,4 ng/ml, ou seja, o sistema PAF é capaz de detectar variações de concentração de fluoresceína superiores ou iguais a este valor. Na versão comercial do Fluorotron™ Master o LMD é de 0,5 ng/ml [8].

3.2. Estudo comparativo entre aquisições com utilização do desviador para optimização do posicionamento angular do sensor SSPDA e sem o uso deste.

O efeito pretendido com a aplicação desta peça foi já explicado quando se descreveu o sistema óptico do PAF.

O teste para demonstrar o efeito da aplicação do desviador para optimização do posicionamento angular do sensor SSPDA consistiu na utilização de uma superfície reflectora no local de colocação da amostra, fazendo incidir sobre esta a luz proveniente da lâmpada de fenda. A largura da fenda e a intensidade da luz foram conservadas desde que se realizaram as primeiras aquisições (sem desviador) até ao momento em que se montou o desviador e se fizeram novas aquisições com esta nova configuração. Em seguida efectuou-se a comparação dos dados obtidos.

Importa ainda referir que os testes realizados apenas serviram para testar o conceito do desviador angular (figura 47). A sua aplicação corrente, para a realização dos testes de linearidade ou testes em pacientes, não eram âmbito deste Projecto e constituem um aspecto para desenvolver em trabalho futuro.

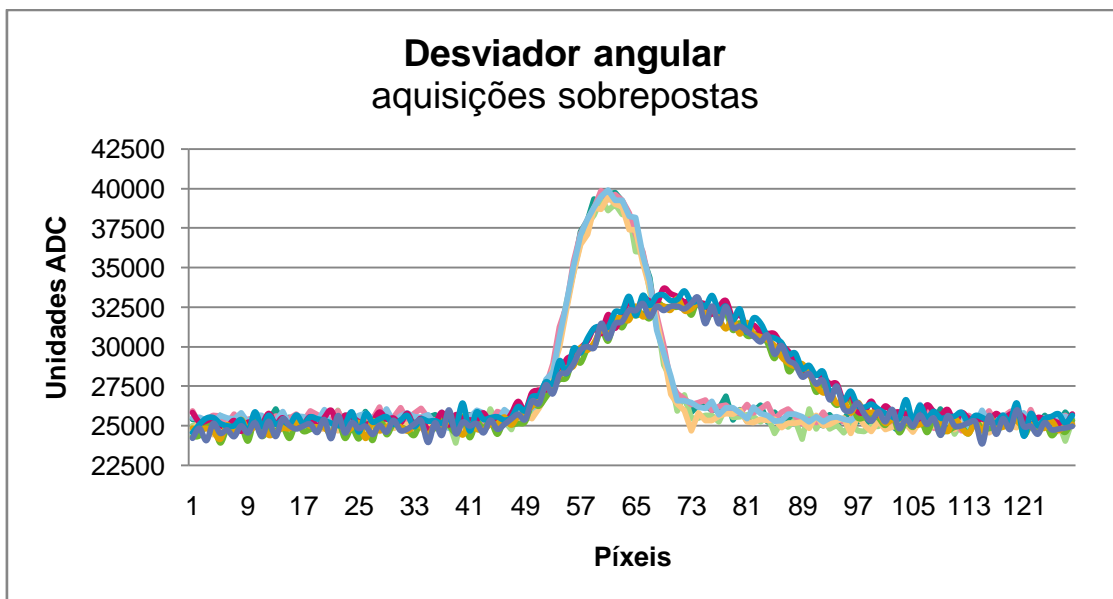


Figura 46 – Sobreposição de duas aquisições. A que tem o pico mais elevado (≈ 40000 un.ADC) e é mais estreita (cerca de 20 píxeis na base) corresponde à não utilização do desviador angular; a curva mais larga (cerca de 50 píxeis na base) e com um máximo inferior (≈ 33500 un.ADC) é característica do uso do desviador angular.

3.3. Testes em pacientes

Os testes em pacientes foram apenas levemente abordados, consistindo apenas em algumas aquisições usando o novo fluorómetro PAF com pacientes.

Foram os últimos testes a serem efectuados e serviram para “demonstrar” a viabilidade clínica deste novo fluorómetro PAF, não tendo havido qualquer outra análise ou conclusão no que respeita aos dados obtidos no sentido de verificar a presença de qualquer patologia ocular.

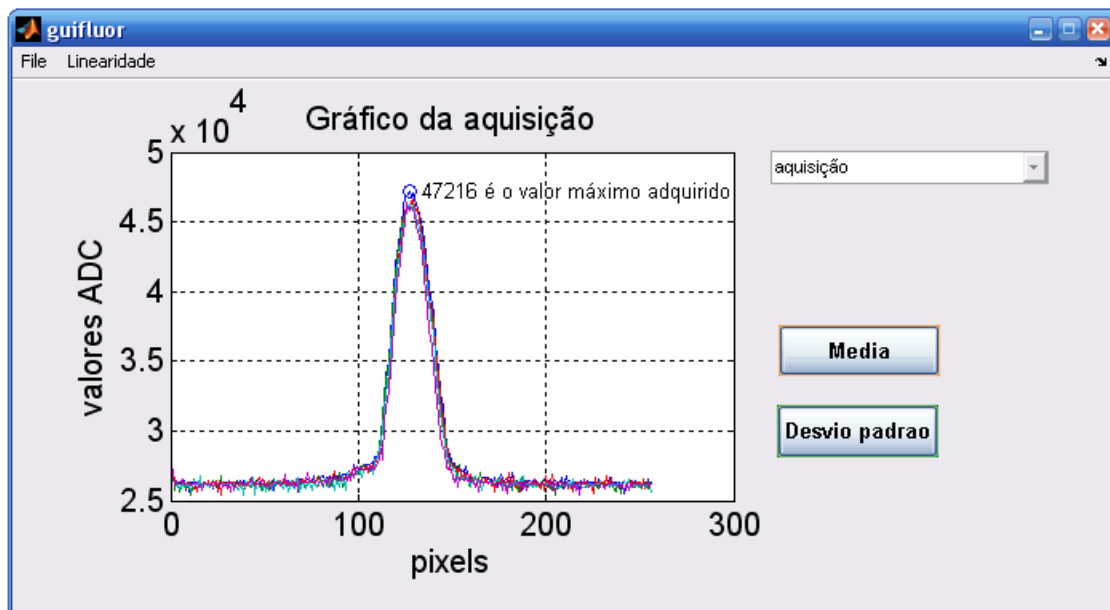


Figura 47 – Aquisição feita num paciente.

4. Conclusão

É já ponto assente que os exames fluorométricos desempenham um papel de destaque no que toca às técnicas não invasivas de diagnóstico para a determinação, qualificação ou quantificação de diversas patologias oculares.

Neste sentido torna-se evidente o empenho científico na criação de instrumentação oftalmológica cujo princípio da medição da fluorescência endógena e exógena esta implícito.

Os dispositivos actualmente comercializados e implementados nas unidades clínicas e hospitalares por todo o mundo cumprem com resultados bastante positivos o objectivo para os quais foram criados, no entanto carecem de portabilidade e são economicamente dispendiosos.

O fluorómetro PAF aparece assim como uma ferramenta simples, com boa portabilidade e economicamente viável capaz de cumprir os propósitos para o qual foi criado.

Este trabalho surge assim no seguimento de um primeiro que se destinava a “perceber até que ponto o novo sistema poderá funcionar como um fluorómetro ocular” sendo o seu objectivo central o “estudo e teste do novo SAD e compreensão dos seus componentes”. [24]

Agora, e uma vez que o objectivo primordial do anterior trabalho fora cumprido, os novos objectivos recaem na optimização da anterior versão do PAF.

Esta optimização passou, resumidamente, por:

- Aumento da versatilidade e capacidade do sistema, com a possível implementação de três sensores (SSPDA 128 píxeis; SSPDA 256 píxeis e FFT CCD 512 píxeis) utilizando para todos o mesmo SAD e o mesmo software. Destaque para as alterações do código do PIC que possibilitaram o uso da câmara CCD e a aplicação da conversão de base.
- Implementação de um filtro digital para os sensores SSPDA (128 e 256 píxeis).

- Aperfeiçoamento da interface de visualização das aquisições no sentido de aumentar a simplicidade e eficiência para o utilizador final e criação de novas janelas de tratamento de dados e calibração dos sensores.
- Estudo do sistema óptico e optimização do mesmo com emprego do desviador angular.

Em jeito de conclusão final, é de referir que foram criados os meios para tornar esta nova versão do fluorómetro PAF um dispositivo que se aproxima cada vez mais de uma versão final, capaz de cumprir o seu propósito no que toca à viabilidade e portabilidade como peça da instrumentação médica e hospitalar da área da oftalmologia, especificamente na fluorometria ocular.

5. Trabalho em curso e futuro

Quanto ao trabalho futuro, os principais aspectos a cumprir são:

- Calibração da câmara FFT-CCD, no que respeita à linearidade, reprodutibilidade e LMD;
- Elaboração de testes com o desviador angular para os sensores SSPDA e estudo sobre a possível implementação da peça com a câmara CCD;
- Testes *in vivo* com pacientes.

6. Bibliografia

- [1] Encyclopedia Britannica, Inc. (2007) <http://media-2.web.britannica.com>.
- [2] A. G. Palestine and R. F. Brubaker, "Pharmacokinetics of fluorescein," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1981.
- [3] Franco Docchio, *Introduction to ocular fluorometry*. Coimbra: Franco Docchio, 1997.
- [4] Ping-Kang Hou, Tong-Yuan Tai, Boniface Juisiang Lin Muh-Shy Chen, "Blood-Ocular Barriers," *TZU CHI Medical Journal*, 2008.
- [5] José G. Cunha-Vaz, *Retinopatia Diabética*. Coimbra: Sociedade Portuguesa de Oftalmologia, 1992.
- [6] Iris Coppens, Tom J. T. P. Van den Berg, Hlinderik J. Van Schaik, and Jaap A. Van Best, "Autofluorescence Distribution Along the Corneal Axis in Diabetic and Healthy Humans," *Exp. Eye Res.*, pp. 505-510, 1999.
- [7] Rui Bernardes, Jorge Dias, and José Cunha-Vaz, "Mapping Human Blood-Retinal Barrier Function," *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING*, vol. 52, pp. 106-116, Janeiro 2005.
- [8] Ran C. Zeimer, Norman P. Blair, and Jose G. Cunha-Vaz, "Vitreous Fluorophotometry for Clinical Research," *Laboratory Sciences*, 1983.
- [9] Docchio Franco and Rovati Luigi, "Ophthalmic diagnosis using fluorescence," in *Introduction to ocular fluorometry.*, 1997.
- [10] Bernard Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. New York: Wiley-VCH, 2001.
- [11] Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Baltimore, Maryland, USA: Springer, 2006.
- [12] UC Berkeley. (1006-2009) <http://www.ocf.berkeley.edu>.
- [13] Farlex. (2009) <http://encyclopedia.thefreedictionary.com>.
- [14] Franco Docchio, "A review of endogenous ocular fluorophores," in *Introduction to Ocular fluorometry.*, 1997.
- [15] Franco Docchio, "Ocular fluorometry: Principles, fluorophores, instrumentation, and clinical applications," in *Lasers in Surgery and Medicine.*: Wiley-Liss, 2009.
- [16] Satoshi Koyano, Makoto Araie, and Shuichiro Eguchi, "Movement of Fluorescein and Its Glucuronide Across," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1993.
- [17] <http://www.mrcophth.com/chua1.html>.
- [18] Franco Docchio, "A review of exogenous ocular fluorophores," in *Introduction to Ocular Fluorometry.*, 1997.
- [19] José Cunh-Vaz, "Clinical perspectives," in *Introduction to Ocular Fluorometry.*, 1997.
- [20] Paul Riordan-Eva and John Whitcher, *Vaughan & Asbury's general ophthalmology.*: Mc Graw Hill, 2007.
- [21] PubMed Center. (2009, Abril) <http://www.pubmedcentral.nih.gov>.
- [22] Hospital de Olhos do Paraná. (2008) <http://www.hospitaldeolhosdoparana.com.br>.
- [23] Gabriel E. Lang, "Optical coherence Tomography Findings in Diabetic

- Retinopathy," in *Diabetic Retinopathy.*, 2007.
- [24] Mónica Raquel Pedrosa Alberto, *Fluorometria ocular clínica*. Coimbra, 2008.
- [25] José Paulo Domingues, *Contribuição para o desenvolvimento de um novo fluorómetro ocular*. Coimbra, 1997.
- [26] Eugenio Leite, "Fluorometry of the anterior segment of the eye," in *Introduction to Ocular Fluorometry.*, 1997.
- [27] ZEISS, "Ophthalmic Instruments from Carl Zeiss - Eye Examination with the Slit Lamp," Alemanha,.
- [28] Burr-Brown products from Texas Instruments, "OPA2613 - Dual, Wideband, High Output Current," 2004.
- [29] Analog Devices, "AD526 - Software programmable gain amplifier - Data sheet,".
- [30] Burr-Brown products from Texas Instruments, "OPA2822-Dual wideband, low-noise Operational Amplifier," 2002.
- [31] Burr Brown products from Texas Instruments, "ADS1601- 16Bit, 1.25MSPS, Analog-to-digital Converter," 2004.
- [32] Hamamatsu, "Technical information - Characteristics and use of NMOS linear image sensors," 2007.
- [33] Hamamatsu Photonics K.K., "FFT-CCD Image Sensor Multichannel Detector Head, C5809 series, Instruction manual," 1995.
- [34] Lucio Di Jasio, *Programing 16-Bit PIC Microcontrollers in C - Learning to fly PIC 24*. Oxford, UK: Newnes, 2007.
- [35] Microchip, "MP LAB IDE User's guide," 2005.
- [36] Microchip, "dsPIC30F6011A/6012A/6013A/6014A Data sheet High performance digital signal controller," 2005.
- [37] Microchip. (2009) <http://www.microchip.com>.
- [38] Hamamatsu, "NMos linear image sensor S3921/S3924 series - voltage output type with current integration readout circuit and impedance conversion circuit ," 2001.
- [39] Hamamatsu. <http://www.learn.hamamatsu.com>.
- [40] Hamamatsu. <http://www.learn.hamamatsu.com>.
- [41] Hamamatsu, "Technical information - Characteristics and use of FFT-CCD area image sensors.," 2007.
- [42] Britannica Online Encyclopedia. <http://www.britannica.com>.
- [43] wikipedia. (2009, Agosto) http://en.wikipedia.org/wiki/Beer%E2%80%93Lambert_law.
- [44] Luis Carlos Gonçalves Namorado Freire, *Simulação Computacional do Sistema Óptico de um Fluorómetro Ocular de Array de Fotodiodos*. Coimbra, 2004.
- [45] The Mathworks. (1004-2009) <http://www.mathworks.com>.
- [46] The Mathworks. (1994-2009) <http://www.mathworks.com>.
- [47] ASD Inc. (2009) www.asdi.com.
- [48] António Paula Brito Pina. (2006) <http://www.saudepublica.web.pt>.
- [49] Adel S. Sedra and Kenneth C. Smith, *Microelectrónica*, 4th ed.: Pearson, 2005.
- [50] HSW International, Inc. (2009) <http://saude.hsw.uol.com.br>.
- [51] Hugh D. Burrows, "Basic principles of fluorescence measurements," in *Introduction to ocular fluorometry.*, 1997.

6. Bibliografia

- [52] Science Encyclopedia. (2009) <http://science.jrank.org>.
- [53] Peter B. Catrysse, Xinqiao Liu, and Abbas El Gamal, "QE Reduction due to Pixel Vignetting in CMOS Image," in *In Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial, and Digital Photography Applications*. Stanford, 2000.
- [54] wikipedia. (2009, Agosto) <http://en.wikipedia.org>.
- [55] The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research. (2009) <http://www.wehi.edu.au>.
- [56] wikipedia. (2009) <http://en.wikipedia.org>.
- [57] Connexions. (2009) <http://cnx.org>.

