



UNIVERSIDADE DE COIMBRA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

**Sistema para Imagiologia de
Fluorescência de Pequenos
Animais**

João Pedro Campos Dinis

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Coimbra, Setembro 2010

Sistema Para Imagiologia de Fluorescência de Pequenos Animais

Orientador: Prof. Dr. Miguel Morgado

Supervisora: Eng^a Ana Ferreira

Projecto desenvolvido no Instituto Biomédico de Investigação de Luz e
Imagem (IBILI) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Tese apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
para completar os requisitos necessários à obtenção do Mestrado Integrado em
Engenharia Biomédica

Departamento de Física

Coimbra, Setembro 2010

Aos meus pais...

Agradecimentos

Como qualquer trabalho de investigação, o meu projecto de mestrado teve bons e maus momentos. Nesta secção presto um agradecimento às pessoas, que de diversas formas, me prestaram apoio.

Um agradecimento especial ao Prof. Miguel Morgado, por todo o apoio, demonstrando sempre uma disponibilidade excepcional para discutir qualquer assunto, e oferecendo-me óptimas condições para o desenvolvimento do meu trabalho.

Um agradecimento à minha supervisora, Engenheira Ana Ferreira, por todo o apoio dado no início, mostrando e disponibilizando todo o seu trabalho desenvolvido neste sistema.

Um agradecimento ao Ricardo pela ajuda dada no motor de passo e na construção do fantoma.

Ao Henrique e ao André, pela companhia, pelas ideias e pelas conversas sempre proveitosas para o desenvolvimento do projecto.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo o apoio, esforço, carinho e amor ao longo de toda a minha vida. Sem eles nada disto seria possível.

Aos meus avós, pela educação e pelos ensinamentos que me transmitiram ao longo da vida.

Um agradecimento à minha namorada, Cátia, pelo apoio nos bons, mas principalmente nos maus momentos. Pela paciência, pelo carinho e por estar sempre do meu lado quando mais preciso.

A todos os meus amigos, quer de Coimbra, quer de Oliveira do Hospital, pelos bons momentos, pelas histórias e pelas vivências ao longo destes 5 anos.

A todos muito OBRIGADO!

Índice

Índice	ii
Lista de Figuras	v
Lista de Gráficos	ix
Lista de Tabelas	xi
Abreviaturas	xiii
Resumo	i
1. Objectivo e Motivação	3
2. Estado da Arte	5
2.1 PET - Positron Emission Tomography	5
2.2 SPECT - Single Photon Emission Computed Tomography	6
2.3 PET versus SPECT	8
2.4 MRI - Magnetic Resonance Imaging	10
2.5 CT - Computed Tomography	11
3. Fluorescência	13
3.1 Princípios da Fluorescência	13
3.2 Fluoróforos	16
4. Imagiologia Óptica	18
5. Sistema de Imagiologia de Fluorescência	21
5.1 Constituintes do Sistema	21
5.1.1 Iluminação	21
5.1.1.1 Filtros	22
5.1.1.2 Difusores	24
5.1.2 Geometria	26
5.1.3 Câmara CCD Arrefecida	28

5.1.3.1	Funcionamento	28
5.1.3.2	Filtros.....	30
5.1.4	Intensificador de Imagem do Tipo <i>Gated</i>	32
5.1.5	Estação de Controlo e Processamento	33
5.1.5.1	Wasabi®	34
5.1.5.2	ImageJ®.....	34
5.2	Teste e Caracterização da Câmara CCD.....	35
5.2.1	Calibração Estática.....	36
5.2.2	Relação Sinal-Ruído	40
5.2.3	Corrente no Escuro.....	46
5.2.4	Resolução Lateral	47
6.	Processamento das Imagens de Fluorescência	49
6.1	Princípios do Software	49
6.2	Interface para o Utilizador	56
6.3	Resultados e Desempenho.....	58
7.	Fantoma	66
7.1	Projecto do Fantoma.....	67
7.1.1	Fantoma Escada	67
7.1.2	Fantoma com Buraco	68
7.1.3	Fantoma Escada 2.0.....	69
7.1.4	Fantoma com Sistema de Gavetas.....	69
7.2	Acrílico	71
8.	Propriedades Ópticas dos Fluidos de Teste	72
8.1	Cálculo do Coeficiente de Absorção	72
8.2	Cálculo do Coeficiente de Dispersão	73
8.2.1	Motor de Passo.....	75

8.2.1.1	Controlador de Motor de Passo.....	77
8.2.1.2	<i>Software</i> de Controlo do Motor de Passo	78
8.3	Compostos para Simulação do Tecido Biológico	79
8.3.1	Intralípido	79
8.3.2	Agarose.....	81
8.3.3	Testes com Tecidos Biológicos	82
9.	<i>Outlook</i> do Projecto.....	84
10.	Conclusão e Trabalho Futuro.....	87
11.	Referências Bibliográficas.....	88
Anexo A	- Testes de Linearidade	I
Anexo B	- Câmara CCD.....	V
Anexo C	- Intensificador de Imagem do Tipo <i>Gated</i>	VII
Anexo D	- Actuador Linear de Passo	IX
Anexo E	- Difusor	XI

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Esquema de um sistema de PET, com o pormenor da aniquilação dos positrões. (6).....	6
Figura 2.2 -- Representação gráfica de várias geometrias de detectores em SPECT (8)	7
Figura 2.3 - Imagem do Imtek da Siemens. (9).....	8
Figura 2.4 - a) Imagem T1; b) ImagemT2 (13).....	11
Figura 2.5 - Imagem CT de um pequeno animal. (15).....	12
Figura 3.1 - Diagrama de Jablonski. (18).....	14
Figura 3.2 - Processo molecular que leva à emissão de fluorescência. (21)	15
Figura 3.3 - Representação gráfica dos espectros de emissão e absorção da fluoresceína (a) e da GFP (b) (24)	17
Figura 4.1 - Absorção no tecido, dependendo do comprimento de onda (26) ..	19
Figura 4.2 - a) Esquema de iluminação; b) Imagem adquirida com excitação e emissão com o mesmo comprimento de onda; c) Imagem adquirida com excitação e emissão com diferentes comprimentos de onda (25)	19
Figura 5.1 - Imagem de um dos focos com os LEDs. Pormenor da potência (12 V)	22
Figura 5.20- Espectro de emissão do filtro 460 SP 123460. Dados do fabricante.	23
Figura 5.3 - Imagem do difusor utilizado no sistema - DG10-1500-MD (29).....	25
Figura 5.4 - Gráfico representativo das características de transmissão dos diferentes modelos do difusor (29).....	25
Figura 5.5 - Foto dos LEDs no sistema e esquema que pretende demonstrar os pontos para onde cada um deles incide com maior intensidade.	27
Figura 5.6 - Duas representações, usando o ImageJ, de uma solução de fluoresceína onde é possível observar as zonas mais iluminadas.....	27
Figura 5.7 - Analogia do funcionamento do CCD. (31)	28
Figura 5.8 - Processo de transferência de carga num CCD (31)	29

Figura 5.9 - a) Bolas de fluoresceína nos poços. Tempo aquisição 200ms. Ganho MCP 100; b) Poços de fluoresceína com intralípido. Tempo aquisição 200ms. Ganho MCP 200.	31
Figura 5.10 a) Bolas de fluoresceína nos poços. Tempo aquisição 200ms. Ganho MCP 150; b) Poços de fluoresceína com intralípido. Tempo aquisição 200ms. Ganho MCP 450.	32
Figura 5.13 - Intensificador de Imagem	33
Figura 5.11 - Imagem da interface gráfica do Wasabi. Podemos observar a pequena caixa onde se controla o ganho no software e o tempo de exposição da amostra.	34
Figura 5.12 - Ambiente gráfico do programa ImageJ e de várias das funções disponíveis (34)	35
Figura 6.1 -a) - Imagem original; b) Imagem após aplicação do filtro	53
Figura 6.2 - Representação gráfica da matriz de correcção. Toda a área exterior ao anel amarelo não é detectável pela câmara CCD. Colormap - "Hot".....	54
Figura 6.3 - a) Imagem não corrigida 500 ms; b) Imagem não corrigida 1200 ms	55
Figura 6.4 - Linhas isotónicas - a) Imagem não corrigida 500 ms; b) Imagem não corrigida 1200 ms.....	55
Figura 6.5 - Imagem corrigida - 500 ms.....	55
Figura 6.6 - Imagem corrigida - 1200 ms	56
Figura 6.7 - Imagem representativa da interface gráfica	57
Figura 6.8 - Exemplo da correcção de uma imagem usando o software de correcção	58
Figura 6.9 - Representação do fantoma de testes utilizado (valores de concentração de fluoresceína em ng/ml)	59
Figura 6.10 - a) Poços de fluoresceína Situação 1 ; b) Poços de fluoresceína Situação 2.....	59
Figura 7.1 - Representação do fantoma em escada.	67
Figura 7.2 - Fantoma com buraco na zona central	68
Figura 7.3 - Representação da segunda versão do fantoma em escada.	69

Figura 7.4 - Fantoma com sistema de gavetas	69
Figura 7.5 - Fotografias do fantoma. Peças individualmente e o fantoma pronto a ser testado	70
Figura 8.1 - Set-up da experiência para o cálculo do coeficiente de absorção .	73
Figura 8.2 - - Arranjo experimental para a medição do coeficiente de dispersão	74
Figura 8.3 - Funcionamento em passo completo de um motor unipolar (46) ...	76
Figura 8.4 - Driver de potência ULN2003A. Entradas dos pinos 1 a 7 e saídas dos pinos 16 a 10. Pino 8 é a terra e pino 9 a alimentação de 12 V. É ainda utilizado um diodo de Zener na saída do alimentador para estabilizar a tensão de saída.	77
Figura 8.5 - Imagem da placa electrónica usada para controlar o motor de passo. Legenda: 1 - Contador digital; 2 - Optocoupler; 3 - Driver de potência; 4 - Fusível; 5 - Pilha 9V	78
Figura 8.6 - Ilustração da interface gráfica do software de controlo do motor de passo.....	78
Figura 8.7 - Imagem adquirida de poços com fluoresceína com intralípido 2%. Ganho no software de 200 e ganho no MCP de 455.	80
Figura 8.8 - Imagem dos poços de fluoresceína (concentrações de 1000, 500, 250 e 100 ng/ml) do fantoma em agarose. Ganho MCP=300. Tempo de aquisição=1000 ms. Primeira gaveta do fantoma. Já é possível observar-se alguma dispersão dos fotões.....	81
Figura 8.9 - Imagem dos poços de fluoresceína do fantoma em agarose. Ganho MCP=300. Tempo de aquisição=1000 ms. Segunda gaveta do fantoma. À medida que a profundidade dos poços aumenta, o efeito da dispersão é mais notório.	82
Figura 8.10 - Imagens adquiridas com o tecido biológico real (peito de frango). Os poços têm todos a mesma concentração de fluoresceína.	82
Figura 8.11 - Bife de peito de frango com bolas de fluoresceína dispersas aleatoriamente. Posições das bolas de fluoresceína assinaladas com setas amarelas	83
Figura Anexo A.1 - Situação 1 - Não corrigida	I
Figura Anexo A.2 - Situação 2 - Não corrigida	II
Figura Anexo A.3 - Situação 1 - Corrigida	III

Figura Anexo A.4 - Situação 2 - Corrigida	IV
Figura Anexo B.1 - Folha de especificações da câmara CCD	VI
Figura Anexo C.1 - Folha de especificações do intensificador de imagem	VIII
Figura Anexo D.1 - Folha de especificações do motor de passo	X
Figura Anexo E.1 - Folha de especificações do difusor	XI

Lista de Gráficos

Gráfico 5.1 - Espectro de emissão do LED. Medição feita no espectrómetro SPEX (IBILI - FMUC)	22
Gráfico 5.2 - Representação gráfica dos filtros acoplados à câmara CCD. A verde encontra-se representado o espectro de emissão resultante do conjunto dos dois filtros.....	32
Gráfico 5.3 - Curva de calibração para tempos de exposição entre 0,2 e 2 segundos. Esta experiência foi levada a cabo com um ganho MCP de 460 e uma corrente de LED de 8,90mA tendo-se obtido uma não-linearidade de 3,95%.	36
Gráfico 5.4 - Curva de calibração para diferentes valores de potência radiante emitida pelo LED. Esta experiência foi feita com um ganho MCP de 400 e um tempo de exposição de 0,75s. A potência LED foi controlada pela corrente directa no LED, que variou entre os 5mA	37
Gráfico 5.5 - Curva de calibração para valores de ganho MCP entre 260 e 780. Nesta experiência o tempo de exposição foi de 0,75s e a corrente no LED de 8,90mA. Desta curva resulta um comportamento exponencial do ganho do MCP.	37
Gráfico 5.6 - Curva de variação da resposta do detector com os valores de tempo de exposição. A percentagem de não linearidade registada para estas ocorrências foi de 3,79%.	38
Gráfico 5.7 - Curva de resposta do detector com os valores de ganho do intensificador	40
Gráfico 5.8 - - SNR para uma imagem cuja concentração de Fluoresceína é 1000 ng/ml, ganho do MCP = 500 e Tempo de Exposição 5s. As linhas contínuas mostram o SNR previsto (ADC de 12 bits e ganhos electrónicos $g_{1x}=0,099$ e $g_{4x}=0,388$).	42
Gráfico 5.9 - - Variação do SNR com os valores de m da sub-imagem I_d de tamanho $m \times m$. Imagens adquiridas com concentração de Fluoresceína de 1000 ng/ml, ganho MCP=1000 e $gain=0$	43
Gráfico 5.10 - A variância para dois ganhos electrónicos como função da resposta do detector. As linhas contínuas mostram os valores previstos para ganho	

electrónico 1x = 0,099 e-1 ADU e ganho electrónico 4x = 0,388 e-1 ADU.	
Concentração de Fluoresceína é 1000 ng/ml	44
Gráfico 5.11 - Corrente no escuro para cada tempo de exposição. Obteve-se um erro de não-linearidade de 0,14 %.....	46
Gráfico 5.12 - Espectros de excitação e de emissão de fluorescência do Composto 610.	47
Gráfico 5.13 - Resposta da câmara CCD a uma função degrau (perfil do prisma).	48
Gráfico 5.14 - Resposta a impulsos da câmara CCD (derivada da resposta a uma função degrau).....	48
Gráfico 6.1 - Gráfico representativo do número médio de contagens correspondentes a iluminação de fundo em cada um dos tempos de aquisição	51
Gráfico 6.2 - Linha regressão - Situação 1 sem correcção.....	60
Gráfico 6.3 - Linha regressão - Situação 2 sem correcção.....	61
Gráfico 6.4 - Linha regressão - Situação 1 com correcção	63
Gráfico 6.5 - Linha regressão - Situação 2 com correcção	64
Gráfico 8.1 - Espectro de fluorescência do intralípido	80

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Comparação de característica entre o SPECT e o PET.	9
Tabela 2.2 - Tabela com as características de cada uma das técnicas analisadas. (16)	12
Tabela 5.1 - - Variação da resposta do detector com os valores do tempo de exposição da câmara	38
Tabela 5.2 - Variação da resposta do detector com os valores do ganho no intensificador	39
Tabela 5.3 - SNR para vários níveis de tempo de exposição. Para cada tempo de exposição foram calculadas a SNR e a SNRmax. Concentração de Fluoresceína 1000 ng/ml; MCP=1000; gain=0.	41
Tabela 5.4 Variação do SNR e do Ganho Electrónico com o tamanho da sub- imagem de Id. Concentração de Fluoresceína 1000 ng/ml; Tempo de Exposição 1,5s; MCP 1000 e gain 0.	42
Tabela 5.5 - Ganho electrónico, fluxo e sensibilidade medidos com valores constantes de ganho MCP, concentração de Fluoresceína (1000 ng/ml), para diferentes valores de tempo de exposição.....	45
Tabela 5.6 - Corrente no escuro em ADU/s.pixel. A partir da corrente no escuro, ganho electrónico e tamanho do pixel ($6,45 \cdot \mu\text{m} \times 6,45 \cdot \mu\text{m}$) calculou-se o “Fluxo de electrões no escuro”, Φ_{dark}	46
Tabela 6.1 - Número de contagens - Iluminação de fundo (ruído térmico e luz parasita)	51
Tabela 6.2 - Análise de não-linearidade relativa à situação 1 sem correcção ..	60
Tabela 6.3 - Análise de não-linearidade relativa à situação 2 sem correcção ..	61
Tabela 6.4 - Comparação do número de contagens após a correcção para cada um dos poços.....	62
Tabela 6.5 - Análise de não-linearidade relativa à situação 1 corrigida. Erro de não linearidade de 5,80 %.....	63

Tabela 6.6 - Análise de não-linearidade relativa à situação 1 corrigida. Erro de não linearidade de 5,80 %.....	64
Tabela 6.7 - Comparação do número de contagens após a correcção para cada um dos poços.....	65
Tabela 8.1 - Ordem de activação das bobinas. Valor 1 representa que a bobina está activada. Valor 0 representa que a bobina não está activada.	76
Tabela 8.2 - Propriedades ópticas de tecido biológico quando sujeitos a luz com comprimentos de onda de 633 nm.	79

Abreviaturas

FMT	-	<i>Fluorescence Molecular Tomography</i>
PET	-	<i>Positron Emission Tomography</i>
SPECT	-	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
LED	-	<i>Light-Emitting Diode</i>
CCD	-	<i>Charge-Coupled Device</i>
MRI	-	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
CT	-	<i>Computed Tomography</i>
DNA	-	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
MOS	-	<i>Metal Oxide Semiconductor</i>
CDA	-	<i>Charge Detection Amplifier</i>
SNR	-	<i>Signal-to-Noise Ratio</i>
ADU	-	<i>Analog-to-Digital Unit</i>
ADC	-	<i>Analog-to-Digital Converter</i>
TIFF	-	<i>Tagged Image File Format</i>
GIF	-	<i>Graphics Interchange Format</i>
JPEG	-	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
BMP	-	<i>Bitmap</i>
DICOM	-	<i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i>
MCP	-	<i>Micro Channel Plate</i>
GFP	-	<i>Green Fluorescent Protein</i>
TTL	-	<i>Transistor-Transistor Logic</i>

Resumo

Este trabalho tinha como objectivo o desenvolvimento de um sistema planar de imagiologia de fluorescência para pequenos animais, baseado em iluminação LED. Para detecção é utilizado uma câmara CCD arrefecida com intensificador de imagem do tipo *gated*. Este sistema tem por objectivo o estudo da fluorescência associada à GFP (*green fluorescent protein*).

Fez-se o estudo e selecção dos componentes necessários e adequados, ao desenvolvimento do sistema de imagiologia. Adquiriram-se filtros de excitação e emissão que permitem a selecção dos comprimentos de onda característicos da GFP, e instalou-se o sistema em mesa óptica. Durante todos os procedimentos de teste do sistema, utilizou-se a fluoresceína como substituto mais barato e mais acessível da GFP, já que possuem propriedades espectrais similares.

Foram avaliadas e medidas diversas características da câmara CCD, como a sua calibração estática, a relação sinal-ruído, a corrente no escuro e a resolução lateral.

Desenvolveu-se um *software* de correcção das imagens capaz de corrigir a heterogeneidade da iluminação da amostra, tendo-se obtido, após aplicação do software, erros de não-linearidade de apenas 5,80%.

Projectou-se e construiu-se um fantoma de testes em acrílico, tendo sido testado com vários fluidos para simular o tecido biológico de pequenos animais. Foram testados intralípido e agarose, sendo que apenas este último pode ser utilizado para os comprimentos associados à fluorescência da GFP. Fizeram-se testes com tecido biológico, que comprovaram a adequação do sistema de imagiologia.

Adoptou-se ainda um procedimento experimental para a determinação das propriedades ópticas dos fluidos de teste, tendo sido construído parte do equipamento necessário para a realização destas medições.

Os resultados obtidos, mostram que o desenvolvimento do sistema de imagiologia planar por iluminação LED foi bem sucedido.

1. Objectivo e Motivação

A imagiologia de pequenos animais desempenha um papel cada vez mais proeminente na investigação biomédica. Recorrendo a estudos imagiológicos em animais é possível perceber e compreender a fisiologia, a patologia e o fenótipo num sistema vivo intacto. Outro aspecto importante é o facto de nenhum estudo biológico ter sucesso na clínica, sem que primeiro, os resultados obtidos sejam estendidos a casos *in vivo*.

Técnicas de imagiologia macroscópica que fornecem informação molecular estão numa fase cada vez mais emergente. Estas técnicas incluem métodos baseados na medicina nuclear, como o PET, SPECT, e métodos de imagiologia óptica como a imagiologia de fluorescência, FMT e imagiologia de bioluminescência. Contudo a imagiologia nuclear apenas pode ser realizada em centros especializados, devido a questões regulamentares, de produção e de manuseamento associadas aos radiofármacos, e emprega equipamento muito caro. Este facto é particularmente verdadeiro para estudos em animais onde é necessária uma grande resolução espacial, tendo que se recorrer a sistemas dedicados de microSPECT e microPET. Além disso, o uso de marcadores específicos baseados em radionuclídeos é dificultado pelo longo tempo de meia-vida requerido devido ao tempo necessário para remover o marcador não ligado da circulação. A imagiologia óptica torna-se por isso um método alternativo válido para a compreensão de processos moleculares a um preço consideravelmente mais baixo.

Com o intuito de complementar outros tipos de medidas moleculares, as técnicas imagiológicas devem ser quantitativas, fornecer alta resolução, permitir estudos longitudinais e serem sensíveis a alterações moleculares no sistema. Apesar da imagiologia de fluorescência não fornecer quantificação absoluta, como o PET ou o FMT, devido ao seu sinal ser dependente da profundidade e do tipo de amostra, fornece uma quantificação relativa, principalmente em sistemas de aquisição com *single-pixel scanning* com uma relativa complexidade e a uma fracção do custo das técnicas anteriormente referidas.

Tendo em conta estes aspectos proponho-me a desenvolver um sistema planar de imagiologia de fluorescência para pequenos animais baseado em iluminação LED. Para detecção é utilizado uma câmara CCD arrefecida com intensificador de imagem do tipo *gated* (*Hamamatsu ORCA 285*, disponível para o projecto). (1)

2. Estado da Arte

Um grande avanço nas ciências biomédicas tem acelerado a introdução de novas tecnologias de imagiologia nos últimos anos. Com o uso cada vez mais recorrente de modelos animais nas ciências básica e pré-clínicas, encontrar formas de conduzir experiências animais de forma mais precisa e eficiente torna-se um factor de sucesso na investigação. Recentes revoluções na biologia molecular e na genética proporcionaram uma grande procura e necessidade de laboratórios de animais transgénicos. A forma mais eficiente e mais usada neste tipo de pesquisa é o estudo de animais em laboratórios durante um longo período de tempo. As técnicas de imagiologia não invasiva são uma ferramenta fundamental e desempenham por isso um papel muito importante neste tipo de estudos. (2)

Os métodos de imagiologia como a tomografia de emissão de radionuclídeos (PET, SPECT), imagiologia de ressonância magnética (MRI), tomografia computadorizada (CT) e imagiologia óptica (imagiologia e tomografia infra-vermelhos, imagiologia de fluorescência e bioluminescência) possuem um grande potencial para servirem de auxílio ao estudo de pequenos animais. (3)

2.1 PET - Positron Emission Tomography

O PET é uma técnica de imagiologia nuclear que tem como base, o uso de emissores de positrões como rádio marcadores, e a reacção de aniquilação entre um positrão-electrão com subsequente emissão de fotões por raios gama para a sua localização, obtendo-se uma imagem tridimensional dos processos funcionais do corpo em análise. (4)

Após injeção do composto marcado com o radionuclido emissor de positrões, o objecto de estudo do PET é colocado no campo de visão de detectores capazes registar raios gama incidentes. O radionuclido sofre um decaimento e os positrões resultantes aniquilam em contacto com electrões poucos milímetros após viajarem no corpo. Cada uma destas aniquilações produz dois fotões com energias de 511 keV que viajam em sentidos opostos podendo ser detectados pelos cintiladores no

dispositivo de detecção. Ao incidirem nos cintiladores produzem luz que é detectada por fotomultiplicadores. Esta técnica depende da simultaneidade com que os fótons são detectados. Os fótons que não são detectados como “pares temporais”, isto é, que não cheguem numa janela temporal de poucos nano segundos, são ignorados. (5)

Após aquisição dos dados as imagens são reconstruídas usando técnicas tomográficas.

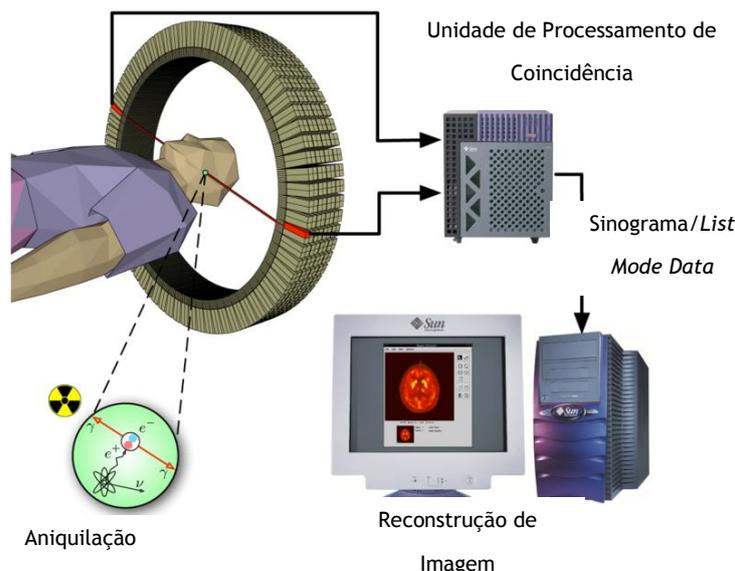


Figura 2.1 - Esquema de um sistema PET, com o pormenor da aniquilação dos pósitrons. (6)

Os sistemas de microPET partilham dos mesmos princípios físicos dos anteriores, sendo contudo sistemas dedicados para pequenos animais, oferecendo a oportunidade de estudar de forma mais dedicada manipulações genéticas e progressões de doenças em animais de forma a obter conhecimento para este tipo de processos em humanos. Pelo facto de requerem aparelhos especializados mais caros, a sua aquisição está ao alcance de poucas instituições.

2.2 SPECT - Single Photon Emission Computed Tomography

A tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) é uma técnica de imagiologia tomográfica de medicina nuclear que usa raios gama. Partilha dos mesmos princípios físicos do PET, variando contudo no número de fótons detectados

pelo detector, apenas um. Com esta técnica é possível obter informação 3D do elemento em estudo, sendo apresentada em fatias seccionadas do paciente que podem ser livremente manipuladas conforme desejado. (7)

Para aquisição de imagens SPECT a câmara gama é rodada à volta do paciente. Projecções são adquiridas em pontos pré-definidos durante a rotação, tipicamente todos os 3-6 graus. Na maioria dos casos uma rotação total de 360° é feita de forma a obter uma reconstrução óptima da imagem. O tempo médio de aquisição para cada projecção é de aproximadamente 15 segundos, sendo por isso o tempo total de scan de 15 a 20 minutos. (8)

O recurso a câmaras gama multi-cabeças pode acelerar a aquisição de dados. Na figura 2.2 estão representadas várias geometrias utilizadas.

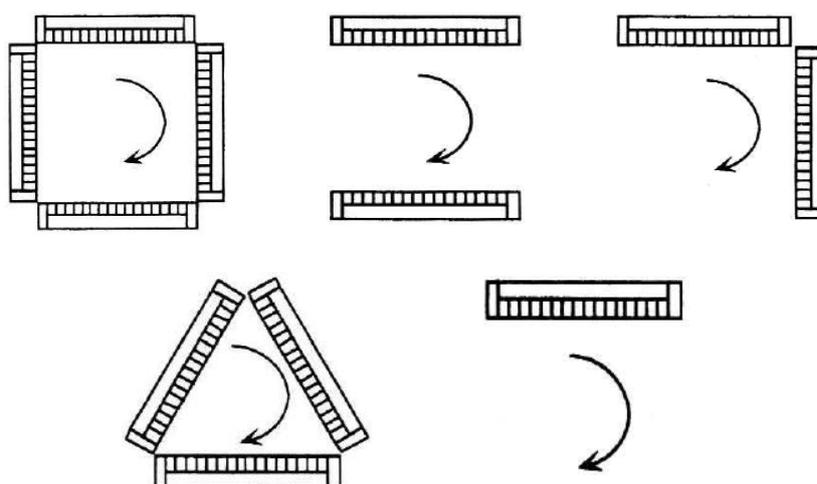


Figura 2.2 -- Representação gráfica de várias geometrias de detectores em SPECT (8)

Tal como no caso do PET e microPET, existem sistemas específicos para pequenos animais, denominados de microSPECT. Tal como no caso anterior, são sistemas mais caros e por isso de mais difícil aquisição por centros de investigação e laboratórios. Na figura 2.3 podemos ver um desses aparelhos, o *Imtek* da *Siemens*, pertencente à Faculdade de Medicina da Universidade de Stanford.



Figura 2.3 - Imagem do Imtek da Siemens. (9)

2.3 PET versus SPECT

Este ponto tem como objectivo comparar as capacidades e as limitações, as vantagens e desvantagens de cada uma destas técnicas.

Uma das características mais importantes é a sensibilidade, isto é, a capacidade de detectar e gravar uma maior percentagem de eventos emitidos. Esta sensibilidade é cerca de 2-3 ordens de magnitude mais elevada no PET que no SPECT. Isto acontece devido aos colimadores de SPECT rejeitarem fotões que não se encontram numa pequena gama angular, exibindo conseqüentemente eficácias de geometria limitadas. No caso do PET, devido à natureza da aniquilação de positrões, onde dois fotões gama são emitidos do mesmo evento, colimadores físicos podem ser eliminados, usando ao invés colimadores electrónicos recorrendo ao método coincidência-deteccção. Nisto resulta um maior ângulo de aceitação em cada posição do detector, levando a um aumento da sensibilidade. (10)

Outra das características importantes é a resolução espacial existindo vários factores que a afectam. Uma primeira observação é o facto de a resolução no SPECT ser apenas limitada pela tecnologia (desenho do colimador), enquanto que no caso do PET existe uma limitação física, relacionada com a gama dos positrões e a não-colinearidade dos fotões. O *pinhole* em SPECT foi uma tecnologia que proporcionou grandes avanços na resolução das imagens, particularmente na imagiologia de

pequenos animais (12). Contudo *pinholes* cada vez mais pequenos levam a uma diminuição da sensibilidade, estando por isso em estudo soluções, onde são usados colimadores com vários *pinholes* (U-SPECT-III usa 135 *pinholes*). (10)

Outra característica cada vez mais importante é a resolução temporal. A capacidade de se fazer imagem dinâmica é um aspecto cada vez mais importante em medicina, devido ao facto de grande parte da informação ser retirada da alteração da biodistribuição de rádio fármacos no corpo em estudo. Este aspecto está intimamente relacionado com o algoritmo de reconstrução e com a sensibilidade do scanner, logo o PET leva uma clara vantagem em relação ao SPECT. (10)

A atenuação de fótons refere-se à propriedade da radiação emitida interagir com o tecido à medida que o atravessa, é também uma característica de destaque. A probabilidade de radiação que sobrevive depende de L (13), caminho percorrido, e do coeficiente de atenuação linear. No PET o caminho L é representado pelo LOR (*line of response*) ao longo do qual os dois fótons emitidos viajam, sendo por isso independente do ponto de origem. No caso do SPECT, ao ser apenas um o fóton emitido, este valor L depende da origem da emissão, tornando muito mais complexo o cálculo da correcção de atenuação. (10)

Em seguida é apresentado uma tabela-resumo com as diferenças entre ambas as técnicas de imagem.

SPECT		PET	
✓	Um fóton gama detectado	✓	Dois fótons de 511 keV detectados
✓	Pior sensibilidade	✓	Melhor sensibilidade
✓	Resolução espacial diminui com aumento da distância ao objecto	✓	Resolução espacial não diminui com aumento da distância ao objecto
✓	Único cristal cintilador por cabeça	✓	Array pequenos cristais
✓	Resolução espacial não é fisicamente limitada	✓	Resolução espacial é fisicamente limitada
✓	Cálculo da correcção de atenuação é muito complexo (geralmente não medida)	✓	Correcção de atenuação é fácil e precisa

Tabela 2.1 - Comparação de características entre SPECT e PET.

A novidade, e provavelmente o futuro, serão sistemas que comportam estas duas técnicas, que ao se complementarem melhoram a qualidade da imagem adquirida essencialmente a nível da resolução. Investigadores holandeses conseguiram com sucesso combinar as duas técnicas num só equipamento. As duas técnicas em simultâneo fornecem uma maior resolução do que o tradicional microSPECT e o microPET. O novo equipamento conhecido como *VECTor (Versatile Emission Computed Tomography)* consegue distinguir e mostrar detalhes com distâncias entre si inferiores a meio milímetro. (11)

2.4 MRI - Magnetic Resonance Imaging

A imagiologia por ressonância magnética é uma técnica que permite a obtenção de imagens de elevada qualidade do interior do corpo em estudo. (12)

Esta técnica varia das restantes pelo facto de não recorrer a qualquer tipo de radiação (Raios-X por exemplo) ou radiofármacos. Cria imagens detalhadas do corpo a partir da aplicação de um forte campo magnético e ondas rádio.

O campo magnético aplicado interfere com o núcleo e não com os electrões dos átomos. Este campo magnético faz com que os prótons do átomo de hidrogénio girem com uma frequência proporcional ao campo magnético aplicado. Ao aplicarmos campos espacialmente dependentes, é possível que diferentes partes da anatomia gerem sinais com frequências distintas, sendo assim possível distingui-las espacialmente.

Após o momento magnético criado pela soma dos spins dos prótons de hidrogénio (que originalmente apontam numa direcção Z), estes são rodados 90° para uma direcção Y. Este momento induzido pela rotação, tende a retornar à direcção Z original devido ao realinhamento dos spins. O momento magnético demora um tempo T1 para se realinhar na direcção Z crescendo aproximadamente para o seu valor inicial. A outra componente Y, perpendicular a Z decresce para perto de 0 à medida que se dá o realinhamento do momento magnético, num tempo T2. (13)

É a quantificação destes dois intervalos de tempo que nos permite a obtenção da imagem em ressonância magnética.

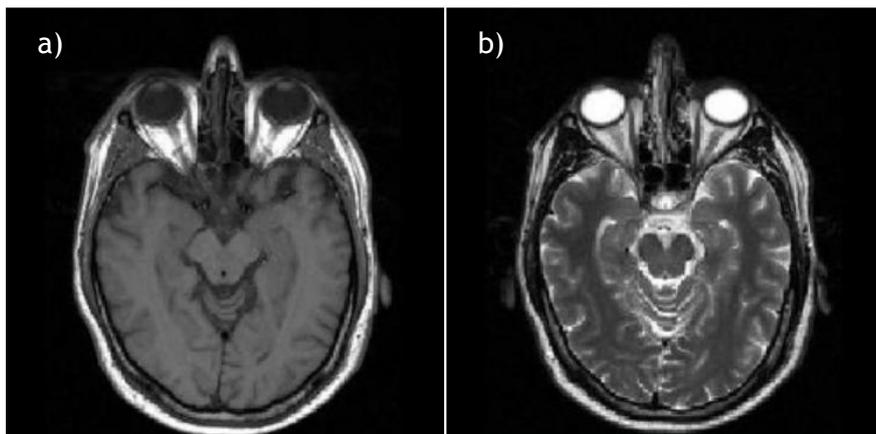


Figura 2.4 - a) Imagem T1; b) Imagem T2 (13)

Algumas das vantagens deste tipo de técnica relativamente a outras técnicas imagiológicas são, entre outras, o fornecimento de diferentes tipos de informação anatómica quando comparada à informação obtida através de um raio-X. Para além disso não requer ingestão de material radioactivo como acontece em exames de PET ou CT. (13)

2.5 CT - Computed Tomography

A tomografia computadorizada é uma técnica poderosa que permite obtenção de imagens 2D e 3D de um objecto a partir da emissão de raios-X.

A tomografia computadorizada tem como princípio fundamental a obtenção de várias imagens “sombra”, isto é, gráficos de intensidade de raios-X não absorvidos pelo objecto em estudo. Ao fazer-se este mapa de intensidades após incidência do raio de vários ângulos, é possível fazer-se uma reconstrução da imagem segundo um determinado plano. Na figura 2.5 podemos ver um exemplo de imagem obtida por um sistema de um pequeno animal. (14)

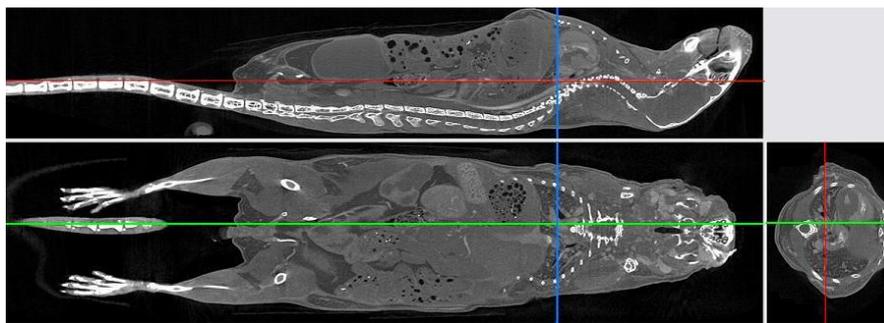


Figura 2.5 - Imagem CT de um pequeno animal. (15)

A técnica de maior interesse para o desenvolvimento deste trabalho, é imagiologia óptica. Por isso será abordada com mais profundidade, estando destinado um capítulo para o estudo desta técnica.

Na tabela 2.2 são apresentadas as vantagens e desvantagens de cada uma das técnicas de imagiologia estudadas.

Técnica	Sinal	Vantagens	Desvantagens	Custo	Resolução
PET	Positrões de Radionuclidos	Alta Sensibilidade	Requer radioactividade, detecta apenas uma radionuclido	Alto	1-2 mm
SPECT	Raios gama	Distingue vários radionuclidos, vários processos captados	Requer radioactividade	Alto	1-2 mm
CT	Raios X	Rápido, imagens transversais seccionadas	Baixa resolução para tecidos moles	Alto	50 μ m
MRI	Alterações campo magnético	Inofensivo, alta resolução para tecidos moles	Não consegue seguir vários marcadores	Alto	50 μ m
Óptica	Luz	Fácil, inofensiva, técnica usada para o estudo eventos moleculares específicos	Baixa penetração nos tecidos	Baixo	1-2 mm

Tabela 2.2 - Tabela com as características de cada uma das técnicas analisadas. (16)

3. Fluorescência

Durante os últimos 20 anos houve um considerável crescimento no uso da fluorescência nas ciências biomédicas. É uma metodologia usada nos ramos da biotecnologia, citometria de fluxo, diagnóstico médico, sequenciamento de DNA, ciências forenses entre outras. As vantagens desta técnica prendem-se com a sua elevada sensibilidade, não havendo necessidade de recorrer a marcadores radioactivos, que para além de serem mais caros, requerem bastantes cuidados a nível do manuseamento. No ramo da imagiologia, aquele que mais nos interessa, a fluorescência permite a localização de moléculas intracelulares, sendo possível a detecção de apenas uma molécula. (17)

Neste capítulo expõem-se os princípios da fluorescência, da sua importância na área da imagiologia de pequenos animais e do fluoróforo utilizado ao longo do projecto, a fluoresceína.

3.1 Princípios da Fluorescência

A luminescência é a emissão de luz de uma substância devido a transições entre diferentes estados electrónicos excitados. Esta pode-se dividir em fosforescência (não relevante para o projecto desenvolvido) e fluorescência, consoante a natureza (multiplicidade de *spin*) dos estados excitados envolvidos na transição. (17)

Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão de luz são geralmente ilustrados recorrendo ao famoso diagrama de Jablonski, proposto por Alexander Jablonsky em 1935.

No diagrama de Jablonski (figura 3.1) os níveis electrónicos são representados por S_0 (estado electrónico fundamental), S_1 (primeiro nível electrónico excitado singuleto) e S_2 (segundo nível electrónico excitado singuleto). Dentro de cada um destes níveis, os fluoróforos podem existir ainda em diferentes níveis energéticos vibracionais (representados no diagrama pelas barras horizontais).

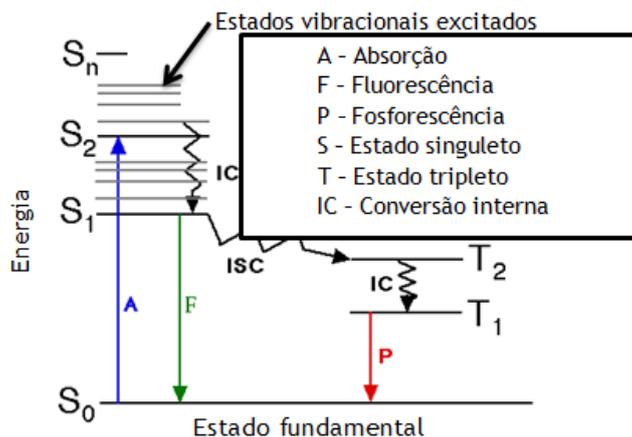


Figura 3.1 - Diagrama de Jablonski. (18)

As transições entre estados energéticos derivadas da absorção são muito rápidas, na ordem dos 10^{-15} s, tempo demasiado curto para uma deslocação significativa do núcleo (princípio de Cordon (19)).

À temperatura ambiente da sala, a cerca de 25°C (298 K), a diferença energética entre o estado vibracional fundamental e o primeiro estado vibracional excitado é tal, que a maior parte das moléculas se encontram no estado fundamental, estando os restantes estados vibracionais excitados muito pouco populados. Esta distribuição de moléculas entre os estados vibracionais é descrita pela lei da distribuição de *Boltzmann*. Esta lei diz-nos que se considerarmos dois estados com energias E_i e E_j , a distribuição de *Boltzmann* para uma determinada temperatura K é nos dada por,

$$\frac{N_i}{N_j} = e^{-\left(\frac{E_i - E_j}{kT}\right)}$$

onde k é a constante de *Boltzmann*, $1,38 \times 10^{-23}$ J K⁻¹

Facilmente se retira da equação que as populações de estados energéticos vibracionais superiores decrescem de forma exponencial comparativamente aos estados vibracionais inferiores. (20)

Desta forma se justifica a utilização de luz ao invés de calor para se provocar fluorescência. Devido à grande diferença energética entre os estados energéticos S₀ e

S_1 , seria necessária uma grande quantidade de calor para se povoar de forma eficaz o primeiro estado electrónico excitado (S_1).

De uma forma sintética o processo molecular que leva à emissão de fluorescência é o seguinte:

Ao absorverem luz os fluoróforos são excitados para estados vibracionais quer de S_1 , quer de S_2 (figura 3.2). Salvo raras excepções, as moléculas relaxam rapidamente para o estado vibracional mais baixo de S_1 . Este processo é denominado de conversão interna e ocorre em cerca de 10^{-12} s. Como os tempos de fluorescência são da ordem dos 10^{-8} s, a conversão interna ocorre totalmente antes da emissão. Esta emissão de fluorescência ocorre a partir de um estado excitado em equilíbrio térmico, o nível vibracional mais baixo de S_1 . Ao regressar ao estado fundamental, em cerca de 10^{-9} s, é emitida fluorescência. (17)

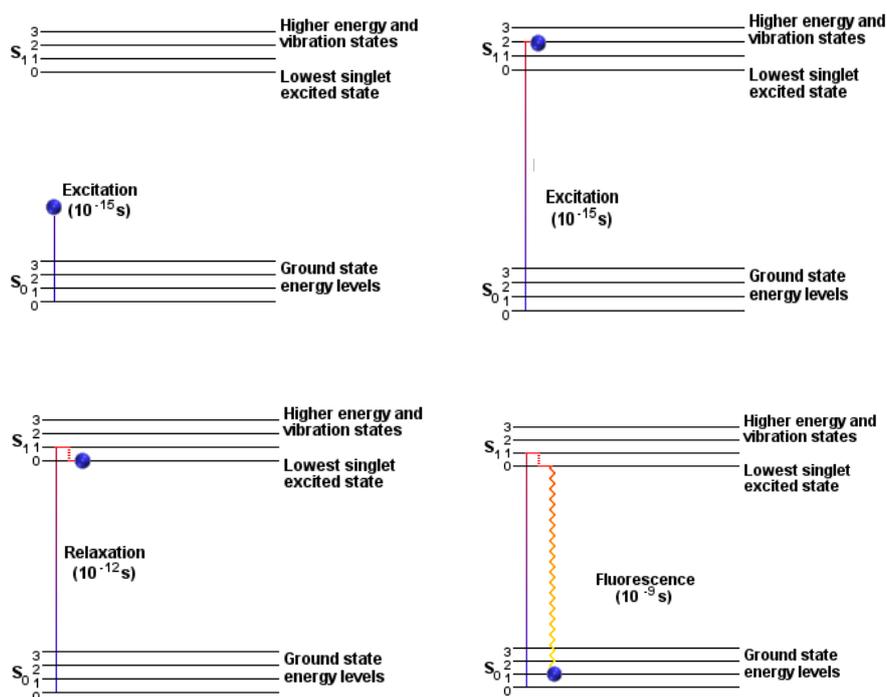


Figura 3.2 - Processo molecular que leva à emissão de fluorescência. (21)

Uma variação acontece quando as moléculas em S_1 sofrem uma transição para um estado de diferente multiplicidade de spin por cruzamento inter-sistemas, para o primeiro estado tripleto, denominado de T_1 . A emissão a partir de T_1 é denominada de fosforescência.

Uma análise mais cuidada ao diagrama de Jablonksi, permite observar que a energia de emissão é sempre menor que a de absorção. A fluorescência ocorre a energias mais baixas, ou se quisermos a comprimentos de onda mais elevados. Este fenómeno denomina-se de deslocamento de Stokes.

Outro aspecto de relevo é o facto de o espectro de emissão de uma molécula ser tipicamente uma imagem no espelho do espectro de absorção da transição $S_0 \rightarrow S_1$. Esta similaridade ocorre pois a excitação electrónica não altera significativamente a geometria nuclear da molécula. Deste modo, o espaço dos níveis energéticos vibracionais dos estados excitados é idêntico aos dos estados energéticos iniciais. Como resultado, as estruturas vibracionais vistas nos espectros de absorção e emissão são idênticas. (17)

3.2 Fluoróforos

Os fluoróforos são moléculas que quando submetidas a transições electrónicas emitem fluorescência. Estes podem ser divididos em duas grandes classes, intrínsecos e extrínsecos.

Os fluoróforos intrínsecos são aqueles que existem de forma natural no elemento de estudo em questão, sendo produzidos por este. Os fluoróforos extrínsecos, os mais relevantes para o projecto, são corantes sintéticos ou moléculas bioquímicas modificadas que são adicionadas à amostra para produzir fluorescência com propriedades espectrais específicas. (17) (21)

A tendência no estudo de animais é utilizar, cada vez mais, fluoróforos com espectros de excitação e emissão no vermelho e infra-vermelho, uma vez que nesta gama espectral, a absorção e a dispersão nos tecidos biológicos é muito menor, como é possível observar na figura 5.1 (Capítulo 5).

No entanto ainda são realizados diversos estudos com emissão na zona do verde, nomeadamente estudos de bioluminescência utilizando luciferase (22), e estudos de fluorescência utilizando GFP (23). O nosso sistema foi desenvolvido com o intuito de estudar animais com células transfetadas com GFP. Por razões de custo e de

disponibilidade, utilizou-se durante o desenvolvimento do sistema, para todo o tipo de testes, a fluoresceína, pois tem características espectrais de fluorescência bastante similares à da GFP.

A fluoresceína é um fluoróforo extrínseco, amplamente utilizado em sistemas de imagiologia de fluorescência. Algumas das vantagens da fluoresceína relativamente a outros fluoróforos, são a não sensibilidade à polaridade do solvente e possuir um elevado coeficiente de absorção molar (de cerca de $80.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma das principais razões pela qual se optou por usar este composto, foi o seu baixo custo e a facilidade com que se conseguia obter no IBILI, uma vez que se trata de um fluoróforo extensamente utilizado na prática clínica em oftalmologia. Assim podem-se efectuar os testes necessários, sempre com grande facilidade na aquisição da fluoresceína. (17)

A fluoresceína ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$) tem um máximo de absorção a rondar os 495 nm e um máximo de emissão na ordem dos 521 nm (em água). Estes valores podem variar devido a alterações de pH e de temperatura. Por exemplo, em ambientes ácidos ($\text{pH} < 7$), os valores máximos de absorção e de emissão são ligeiramente inferiores. (24)

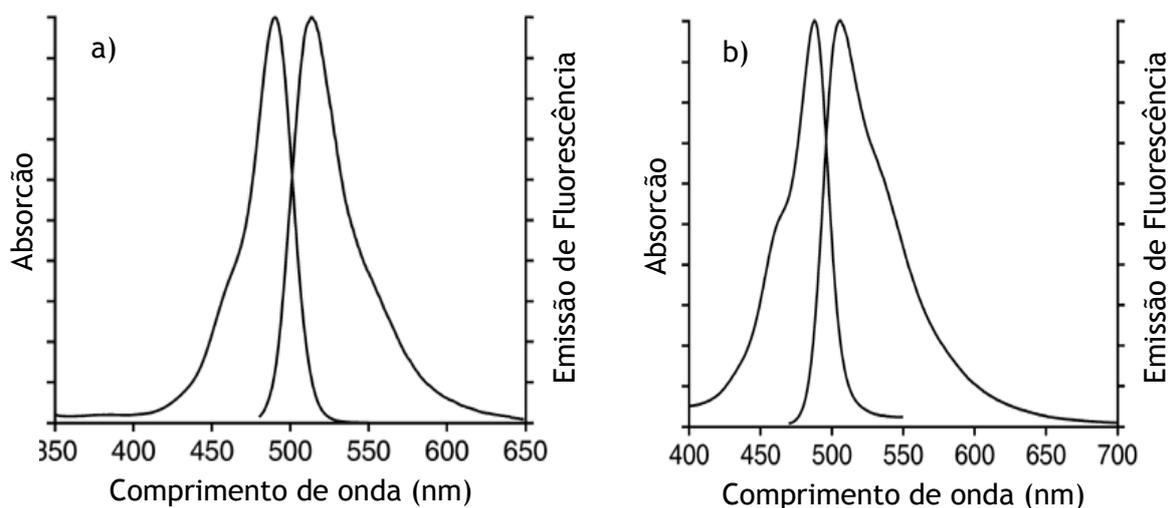


Figura 3.3 - Representação gráfica dos espectros de emissão e absorção da fluoresceína (a) e da GFP (b) (24)

4. Imagiologia Óptica

A imagiologia óptica é uma ferramenta fundamental na investigação biomédica, pois é utilizada em diferentes tarefas como a simples inspecção macroscópica de um tecido biológico, até a técnicas microscópicas avançadas que permitem a obtenção de imagens dos tecidos com elevada resolução espacial. Esta é uma área de investigação que incorpora um elevado número de abordagens devido às diferentes fontes de iluminação utilizadas, à variada combinação de detectores, bem como aos diferentes mecanismos de interacção entre a luz e o tecido que podem ser empregues para obter imagens. Estes mecanismos de contraste vão desde a absorção e dispersão de luz, até à auto-fluorescência dos tecidos. Este contraste do tecido endógeno possibilita a obtenção de vários tipos de imagens como por exemplo da anatomia do tecido em estudo, da sua função fisiológica ou até de possíveis alterações no tecido provocadas por doenças.

Estes mecanismos de contraste podem ser utilizados quer com técnicas macroscópicas, quer com técnicas de microscopia.

Em imagiologia óptica a profundidade de visualização é limitada pelos processos de absorção e de dispersão. O estudo a profundidades maiores é conseguido para zonas de comprimentos de onda superiores aos utilizados no projecto. Como pode ser observado na figura, ao usar-se luz vermelha e infravermelha como fonte de excitação, é possível penetrar mais no tecido devido ao menor coeficiente de absorção e, conseqüentemente, à menor atenuação de luz (25). Nesta região espectral, a dispersão também é menor, o que diminui a degradação da resolução lateral com a profundidade. Todavia as fontes de iluminação nestes comprimentos de onda são bastante mais caras, comparativamente ao tipo de iluminação utilizada por nós. O mesmo sucede com as câmaras CCD. Não sendo uma prioridade o estudo de tecidos a tão altas profundidades decidiu-se usar luz na região do visível.

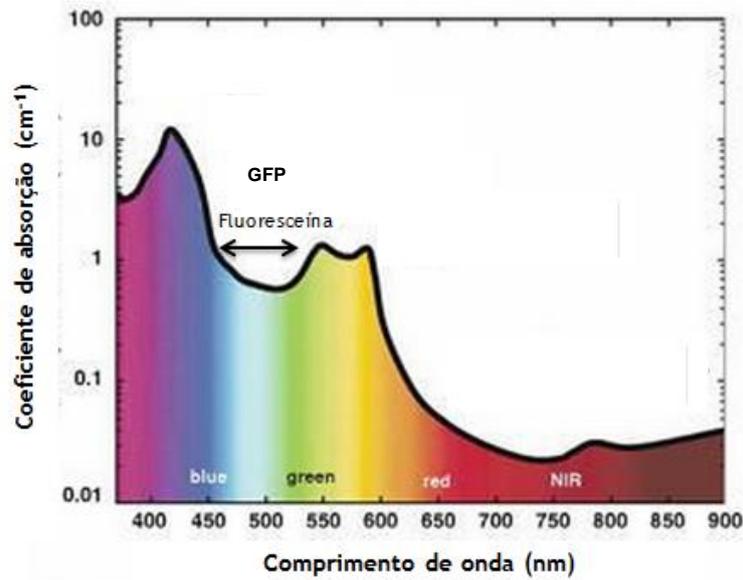


Figura 4.1 - Absorção no tecido, dependendo do comprimento de onda (26)

Um dos grandes entraves neste tipo de técnica é a dispersão dos fotões. Os fotões propagam-se no tecido não em linhas rectas, mas num trajecto difuso que prejudica não só a capacidade de quantificação dos fotões, mas também compromete a resolução da imagem.

Dentro da imagiologia óptica macroscópica são utilizadas duas técnicas principais. A primeira classe de métodos obtém uma simples imagem fotográfica a duas dimensões. Neste tipo de técnica uma fonte de luz ilumina o animal ou o tecido estudado, e a atenuação da luz na superfície ou a emissão de fluorescência no tecido é adquirida com uma câmara CCD usando filtros adequados (caso deste projecto).

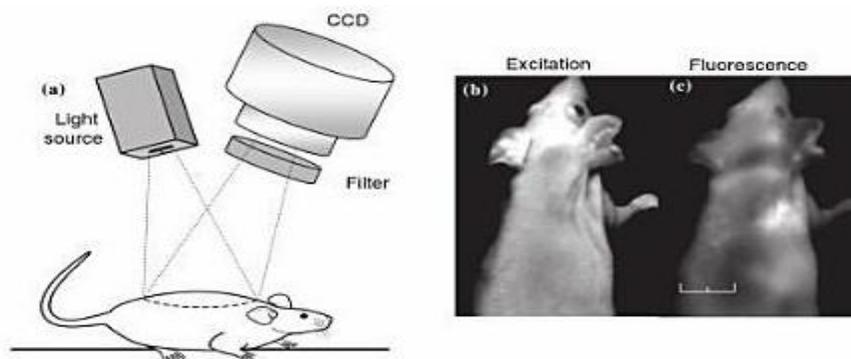


Figura 4.2 - a) Esquema de iluminação; b) Imagem adquirida com excitação e emissão com o mesmo comprimento de onda; c) Imagem adquirida com excitação e emissão com diferentes comprimentos de onda (25)

Na imagem parte a) da imagem 4.2, observamos a iluminação da superfície em estudo e a re-emissão de luz capturada pela câmara CCD equipada com filtros apropriados. Em b) temos o exemplo onde a luz capturada é do mesmo comprimento de onda da emitida, de forma a obtermos registos da atenuação do tecido. Em c) usando um filtro diferente, as imagens são capturadas a um comprimento de onda superior, de forma a obter fluorescência causada pela luz incidente.

A segunda classe utiliza como método a transiluminação, na qual a fonte e o detector são colocados em pontos opostos. Por razões de relevância deste método para o projecto, não será desenvolvido, constando apenas como mais um exemplo da diversidade de métodos da imagiologia óptica. (25)

Uma das grandes vantagens deste tipo de técnica relativamente a outras técnicas de imagem, é o facto de utilizar radiação não-ionizante, contribuindo para exames mais seguros quer para os pacientes, quer para os próprios profissionais de saúde (27). Sendo o baixo custo um dos principais pilares deste projecto, nenhuma outra técnica oferece uma relação qualidade de imagem/custo tão boa como a imagiologia óptica.

Ao longo dos últimos anos, as tecnologias de imagem óptica para pequenos animais têm vindo a atrair cada vez mais atenção por parte da comunidade científica. A razão é a abundância de novos marcadores ópticos altamente específicos para aplicações *in vitro*. A transição dos estudos *in vitro* para *in vivo* é um grande desafio para aos cientistas. Daí que se deposite uma grande esperança na imagiologia óptica, pois crê-se que seja uma ferramenta importante e fiável para que esta transição seja feita com sucesso. (26)

5. Sistema de Imagiologia de Fluorescência

Neste capítulo é feita uma descrição do sistema de fluorescência desenvolvido ao longo do projecto, fazendo-se uma descrição de cada um dos componentes e explicando, de uma forma geral, o seu funcionamento.

5.1 Constituintes do Sistema

Todos os sistemas de imagiologia óptica são constituídos por 3 componentes essenciais: fontes de luz, filtros para eliminar sinal de fundo e seleccionar os comprimentos de onda pretendidos, e detectores de fotões para aquisição de sinal.

O nosso sistema, em particular, é constituído por dois focos de luz LED, filtros de emissão, difusores, um macaco de elevação de amostras, filtros para a câmara CCD, intensificador de imagem e um terminal de aquisição e processamento do sinal obtido.

5.1.1 Iluminação

As fontes de iluminação são um dos componentes essenciais quando se fala de imagiologia de fluorescência. As principais características das fontes de luz são o espectro de emissão, a sua potência, o pulso e a frequência de modulação da luz. No nosso sistema foram utilizadas lâmpadas LED brancas, com uma potência de 12 V. Devido aos recentes desenvolvimentos de LEDs extremamente luminosos (LumiLEDs) e à sua variedade de emissões espectrais (entre os 300 nm e os 700 nm), os LEDs tornaram-se uma alternativa estável, e acima de tudo muito mais barata, relativamente a outras fontes de iluminação como, por exemplo, os lasers.

O espectro de emissão de luz das lâmpadas LED utilizadas está ilustrado no gráfico 5.1.



Gráfico 5.1 - Espectro de emissão do LED. Medição feita no espectrômetro SPEX (IBILI - FMUC)

Fazendo uma rápida análise ao gráfico podemos observar que estes LEDs possuem as características necessárias para que sirvam de fonte de iluminação para o sistema em desenvolvimento. Têm um elevado número de contagens (cerca de 4×10^{12} contagens) para os comprimentos de onda em que a fluoresceína é excitada (490 nm). Apesar de haver zonas do espectro onde o número de fótons emitidos pelos LEDs é superior, estes não são relevantes para o sistema, pois serão bloqueados pelos filtros de emissão. Importante é, de facto, termos um elevado número de contagens nos comprimentos de onda que excitam a fluoresceína.



Figura 5.1 - Imagem de um dos focos com os LEDs. Pormenor da potência (12 V)

5.1.1.1 Filtros

Uma das práticas mais recorrentes em imagiologia de fluorescência, é a combinação dos LEDs com sistemas de filtros. Os filtros são provavelmente a componente mais importante em imagiologia óptica, já que têm como principal

função a eliminação da luz prejudicial ao processo de fluorescência. Esta eliminação de luz é conseguida devido ao facto de os filtros conseguirem fazer uma separação das bandas de excitação e de emissão. Explicando esta característica recorrendo ao exemplo da fluoresceína, é vital que os filtros que actuam nas fontes de luz do sistema (luz de excitação), sejam capazes de eliminar toda a luz verde (com um comprimento de onda de cerca de 520 nm), pois esta luz seria reflectida na amostra e adquirida pela câmara como luz de fluorescência, algo que não corresponde à realidade. Da mesma forma que é importante que os filtros na câmara CCD aceitem apenas comprimentos de onda na zona dos 520. Pelo facto de ser espectralmente cega, a câmara adquire todos os fótons de luz, não conseguindo distinguir os seus comprimentos de onda. Ao garantirmos que apenas os fótons com determinado comprimento de onda sejam adquiridos, estamos a garantir que apenas são detectados os fótons provenientes da fluorescência da amostra. São igualmente importantes para o desempenho geral de um sistema pois são vitais para a relação sinal-ruído dos sistemas ópticos. (26)

Foram adquiridos dois filtros 460 SP 123460 da *Omega Optical* (Vermont, USA), de forma a seleccionar o comprimento de onda dos fótons que atingem a amostra. Sabendo que a fluoresceína absorve luz preferencialmente na zona do azul, foi escolhido um filtro que cumprisse com essas características. Na figura 5.20 podemos observar o espectro de transmitância do filtro adquirido.

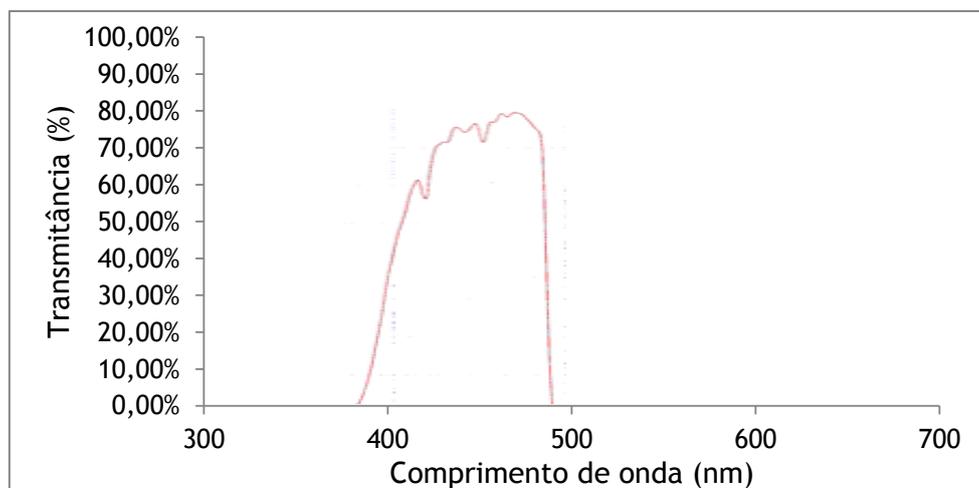


Figura 5.20 - Espectro de emissão do filtro 460 SP 123460. Dados do fabricante.

5.1.1.2 Difusores

Um dos primeiros problemas a resolver foi a iluminação do sistema. Não só a nível de escolha e aquisição dos filtros de excitação, mas principalmente para garantir que todo o campo de visão da câmara CCD fosse homoganeamente iluminado. Esta homogeneidade de iluminação é essencial quando se pretende detectar fluoresceína em diferentes concentrações. Como é lógico, quanto maior a quantidade de fótons absorvidos, maior será o número de fótons emitidos e posteriormente detectados. Esta heterogeneidade de iluminação poderia levar a aquisição de imagens com um número de contagens não correspondente à concentração da amostra. Vejamos o exemplo de dois poços de fluoresceína, com concentrações diferentes. Caso o poço de menor concentração fosse iluminado com mais fótons que o poço de maior concentração, poderia acontecer os poços terem a mesma intensidade (igual número de fótons detectados) no terminal de aquisição e processamento de dados. Obviamente, numa situação de iluminação homogénea da amostra, teriam de ser detectados mais fótons no poço de maior concentração, já que existe uma relação de proporcionalidade directa entre a concentração e o número de fótons detectados.

Os difusores, tal como o próprio nome indica, são dispositivos ópticos, que tem como principal função difundir a luz, espalhando-a de forma homogénea por uma superfície. Existem vários tipos de difusores ópticos consoante o método usado para difundir a luz. Existem difusores holográficos, difusores de opala e difusores *ground glass* (28).

A grande vantagem dos difusores holográficos em relação a outros tipos de difusores é a elevada eficiência de transmissão, que pode chegar aos 90 %. São, de todos os tipos de difusores, os mais caros (28).

Os difusores de opala são similares aos difusores *ground glass*, sendo revestidos num dos lados com uma pequena camada de opala que lhe confere uma iluminação mais uniforme da luz. Contudo têm a grande desvantagem de dispersarem muita luz (28).

Os difusores *ground glass*, apesar de não difundirem tão bem a luz, não têm tantas perdas por dispersão como acontece nos difusores de opala. Estes foram os tipos de difusores escolhidos, pelo facto de serem os mais baratos, mas também por representarem um compromisso entre perda de luz por dispersão e a difusão da luz que se adequa ao pretendido para este projecto.

Após pesquisa e estudo das várias possibilidades, decidiu-se adquirir dois difusores *DG10-1500-MD* da *Thor Labs* (figura 5.3), um para cada foco de iluminação.



Figura 5.3 - Imagem do difusor utilizado no sistema - DG10-1500-MD (29)

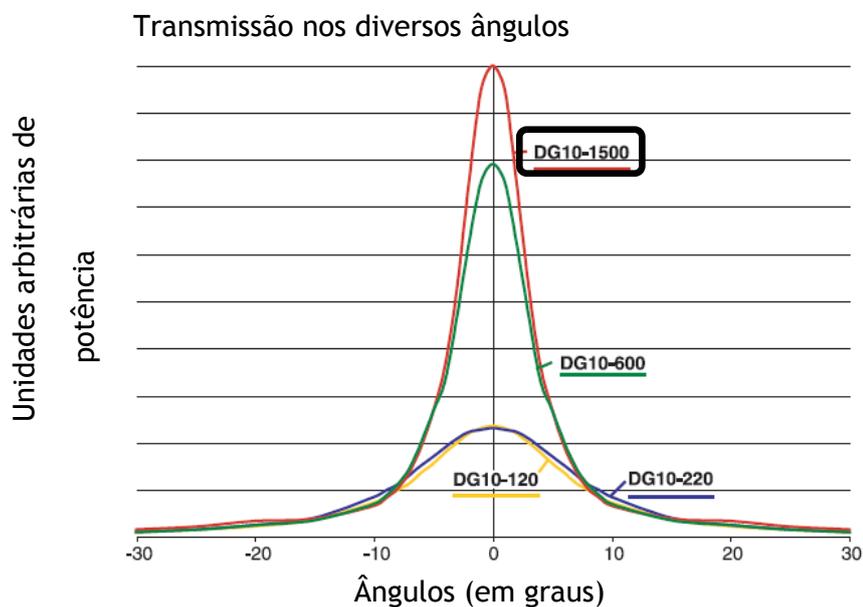


Figura 5.4 - Gráfico representativo das características de transmissão dos diferentes modelos do difusor (29)

Dentro deste tipo de difusor, há quatro modelos, que divergiam entre si pelo *grit* (120, 220, 600 ou 1500), isto é pelo tipo de polimento a que eram sujeitos. Estes quatro tipos de polimento conferem diferentes dispersões e transmissões de luz aos

difusores. Tendo em conta a descrição dos vários modelos (29) um *grit* maior (1500), garante uma elevada taxa de transmissão, oferecendo uma dispersão de luz menor, enquanto que um *grit* baixo (120), garante uma maior dispersão de luz em detrimento da taxa de luz transmitida. Tendo em conta que a área a iluminar é relativamente pequena, consideramos de maior importância uma boa transmissão de luz em detrimento duma grande dispersão. Desta forma optou-se pelo modelo com um *grit* de 1500.

As características do difusor bem como a folha de especificações podem ser consultadas no Anexo E.

5.1.2 Geometria

Uma das primeiras tarefas do projecto foi o estudo da geometria de iluminação. Como foi anteriormente exposto, um dos aspectos mais importantes para que se adquiram imagens com informação quantitativa, é a iluminação uniforme da área a analisar.

Uma das ideias iniciais foi a colocação de um *array* de LEDs em torno da câmara. Contudo esta ideia foi rapidamente abandonada, pelo facto de ser muito difícil a aquisição de filtros que permitissem a filtragem adequada da luz proveniente do array de LEDs. Seria necessário um filtro em anel, que deixasse passar para a câmara a emissão de fluorescência da amostra de estudo. Optou-se então pela aquisição de dois focos de luz LED. Estes garantiam uma boa iluminação da superfície com os elementos ópticos adequados (filtros, difusores). Teve-se sempre em mente um compromisso entre o preço e a qualidade de iluminação do sistema. Claro que a um maior número de fontes de iluminação, estaria associado um maior custo de construção, pois estariam implicados um número superior quer de filtros, quer de difusores, quer de postes de suporte. Achamos por isso ser suficiente iluminar a área de estudo com duas fontes de iluminação, sendo que esta opção garantia à partida bons resultados, com um custo dentro dos valores aceitáveis para um projecto desta natureza.

O passo seguinte foi a montagem do sistema e o estudo das várias posições possíveis para a colocação dos focos. Após analisar várias posições (apontando os focos para uma zona próxima do centro do campo de visão da câmara procurando obter o máximo de uniformidade de iluminação), conclui-se que a opção mais viável e a que poderia garantir melhores resultados foi a colocação dos focos, conforme representado na imagem 5.5. Não foi considerado ser necessário fazer um estudo exaustivo da posição dos focos uma vez que ficou especificado que seria empregue uma correcção por *software* da não-uniformidade da iluminação. No topo do macaco, que tem como função variar a distância entre a câmara e o objecto em estudo, existe um alvo preto com marcações que nos permitem colocar o objecto sempre no campo de visão da câmara. A figura 5.5 mostra a geometria da iluminação escolhida.

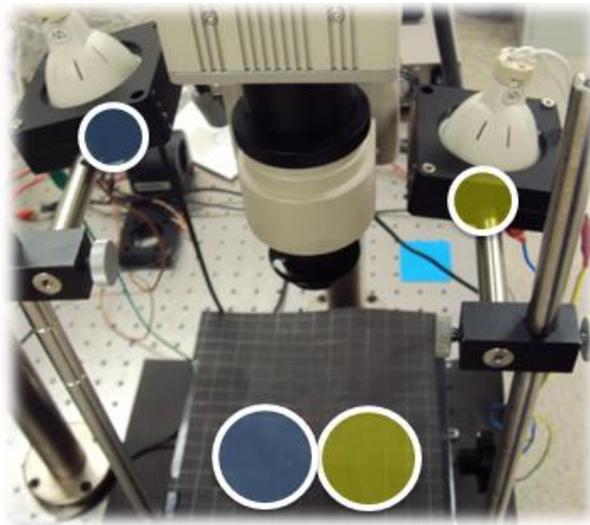


Figura 5.5 - Foto dos LEDs no sistema e esquema que pretende mostrar os pontos para onde cada um deles incide com maior intensidade.

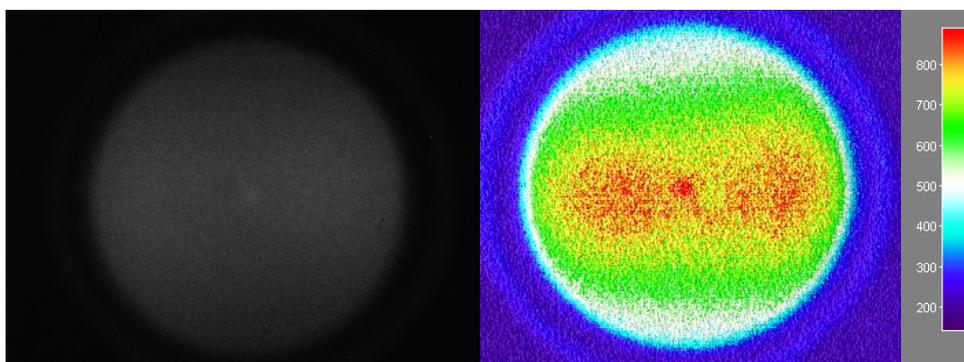


Figura 5.6 - Duas representações, usando o ImageJ, de uma solução de fluoresceína onde é possível observar as zonas mais iluminadas

5.1.3 Câmara CCD Arrefecida

A câmara CCD tem por função, produzir imagens em que o valor dos pixéis é proporcional ao fluxo de fotões de fluorescência, emitido dos pontos objecto correspondentes. É por isso o elemento do sistema de maior importância.

5.1.3.1 Funcionamento

As câmaras CCD foram inicialmente concebidas para operar como aparelhos de memória. Esta função obriga à existência de uma quantidade física que represente o bit de informação e, de formas de reconhecer (leitura), criar e eliminar essa informação (escrever e apagar). Na câmara CCD a informação é representada por conjuntos de cargas (electrões) e é armazenada na zona de depleção de condensadores MOS. O sensor CCD contém uma matriz de condensadores MOS, que correspondem aos pixéis do sensor. As cargas movem-se no circuito CCD controlando as tensões nos condensadores, para que as cargas passem de uns condensadores para o seguinte. Os CDA detectam a presença de cargas, amplificando-as para uma tensão de saída suficiente para que possa ser processada. (30)

O funcionamento dos CCDs é facilmente ilustrado recorrendo a uma analogia feita por Jerome Kristian e Morley Blouke. A determinação da distribuição dos electrões numa imagem CCD pode ser comparada à medição do volume de chuva em diferentes pontos de um campo preenchido com baldes. (figura 5.7). (30)

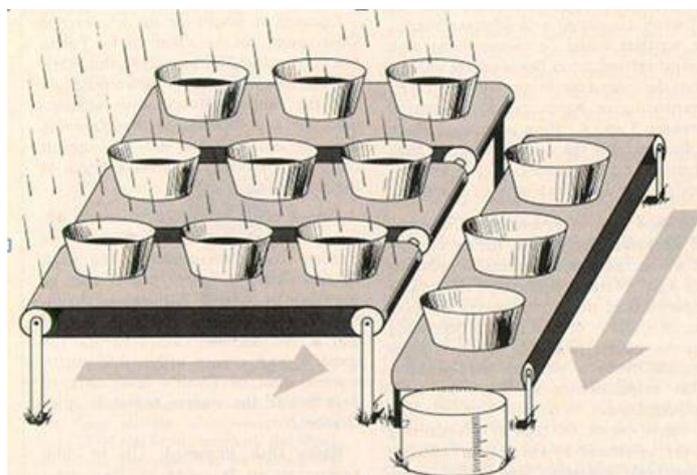


Figura 5.7 - Analogia do funcionamento do CCD. (31)

Assim que a chuva pára, os baldes movimentam-se horizontalmente ao longo do campo num tapete rolante. Ao chegarem ao fim do tapete são esvaziados noutros baldes que se movimentam verticalmente até uma estação de medição onde o volume de água é calculado.

Na figura 5.8 está representado o processo de transferência de carga num CCD, usado como exemplo um CCD simplificado de 9 pixéis, um registo de saída e um amplificador.

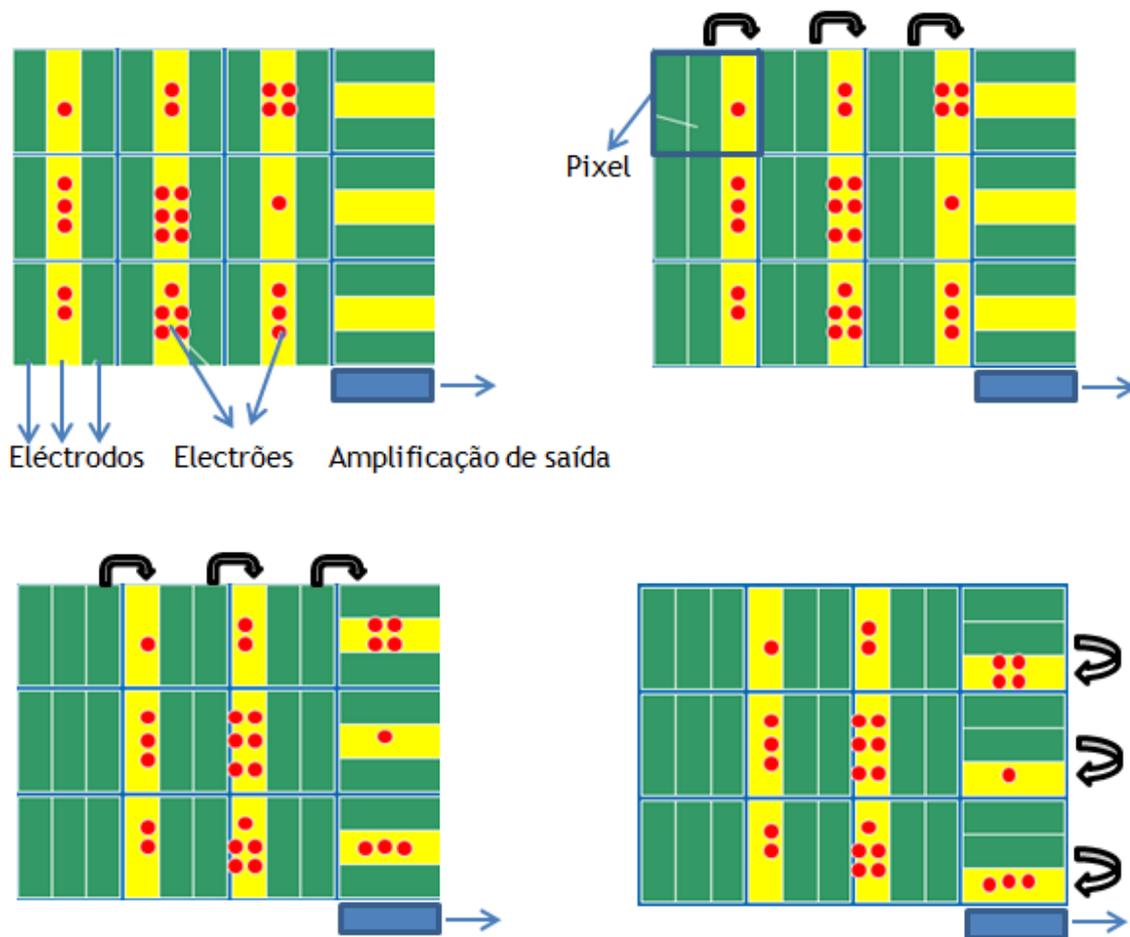


Figura 5.8 - Processo de transferência de carga num CCD (31)

Cada pixel está dividido em três regiões (eléctrodos que servem para criar um poço de potencial). Quando é feita uma exposição, o eléctrodo central é mantido a um potencial superior ao dos outros eléctrodos. A carga resultante do processo de exposição é recolhida no eléctrodo central onde fica armazenada (figura 5.8 - 1). Terminada a exposição, os potenciais dos eléctrodos são modificados e a carga é

transferida para o eléctrodo vizinho (figura 5.8 - 2). Os electrões são transferidos de pixel para pixel através da alteração sincronizada do potencial dos eléctrodos. As cargas à direita são conduzidas para o registo de deslocamento (figura 5.8 - 3). (31)

A transferência horizontal das cargas é interrompida, e a carga no registo de saída é transferida verticalmente, uma a uma para um amplificador de saída. À saída do amplificador o valor analógico é digitalizado.

A câmara CCD utilizada neste projecto, a *ORCA-285* da *Hamamatsu*, é uma câmara digital de alta resolução (1,37 milhões pixéis) com uma saída digital de 12 bits. O arrefecimento de Peltier¹, leva a câmara a funcionar a uma temperatura de 5°C negativos, o que reduz drasticamente a corrente no escuro e minimiza o ruído térmico. Permite 4 tipos de *binning* (1x1, 2x2, 4x4 e 8x8) para melhorar a sensibilidade e aumentar o número de *frames* por segundo (máximo de 41 *frames/s*). Permite a aquisição de imagens com tempos de exposição desde 10 μ s até 10 segundos. Mais especificações da câmara CCD podem ser consultadas nos Anexo B.

5.1.3.2 Filtros

Tal como acontece nas fontes de luz, onde são acoplados filtros que seleccionam a luz de excitação provenientes dos LEDs, também na câmara CCD são montados filtros com o objectivo de seleccionar a luz desejada (fluorescência) proveniente da amostra. É necessário ter um filtro, ou vários, que apenas deixem passar luz de comprimentos de onda próximos do máximo de emissão da substância fluorescente. Desta forma minimiza-se o número de fotões detectados com comprimentos de onda diferentes dos desejados, como por exemplo os fotões que são reflectidos na amostra ou os fotões da luz parasita presente na sala. Pelo facto de a câmara ser espectralmente cega, isto é, não distingue os comprimentos de onda dos fotões detectados, uma boa escolha de filtros é ainda mais importante, pois não temos forma de saber se os fotões detectados são provenientes da fluorescência ou de outra fonte qualquer.

¹ Produção de um gradiente de temperatura em duas junções de dois condutores (ou semi- condutores) de materiais diferentes quando submetidos a uma tensão eléctrica em circuito fechado (consequentemente, percorrido por uma corrente eléctrica).

² Número de pixéis da sub-imagem de I_d

³ Estrutura composta por dois transístores bipolares (BJT), em que o emissor do primeiro transistor liga

Uma vez que a fluoresceína tem um máximo de emissão por volta dos 520 nm, torna-se necessário um sistema de filtros que seja capaz de seleccionar este tipo de luz, rejeitando os comprimentos de onda empregues para iluminar a amostra. Para tal foi inicialmente adquirido um filtro *XF3084 535AF45* da *Omega Optical*. Contudo, após a montagem, foi detectado um problema quando se analisou as imagens. Um anel de luz surgia em todas as imagens adquiridas, em torno do perímetro do campo de visão da câmara CCD. Um exemplo deste problema pode ser visualizado na figura 5.9 .

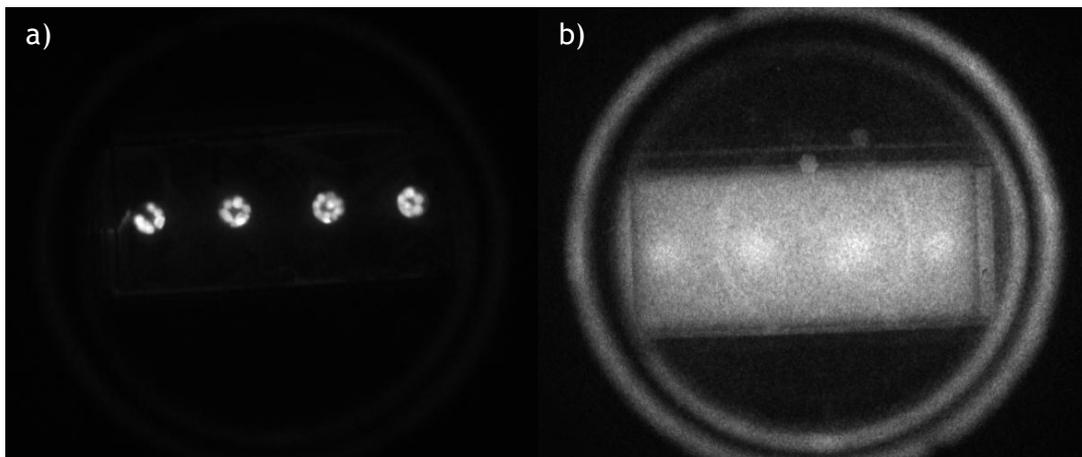


Figura 5.9 - a) *Bolas de fluoresceína nos poços. Tempo aquisição 200ms. Ganho MCP 100;* b) *Poços de fluoresceína com intralípido. Tempo aquisição 200ms. Ganho MCP 200.*

Perante este problema, conclui-se que a selecção de comprimentos de onda da luz emitida pela amostra teria que ser mais precisa, mesmo que tal implicasse uma perda de transmitância total do sistema de filtros. Decidiu-se utilizar 2 filtros colocados em série para tentar resolver este problema. Após estudar as características de vários filtros existentes no laboratório, aquele cujas características eram as mais adequadas foi testado na câmara juntamente com o filtro *XF3084 535AF45*. As imagens assim adquiridas (figuras 5.10) mostram que não foi possível uma eliminação total deste anel, havendo contudo uma redução significativa do problema.

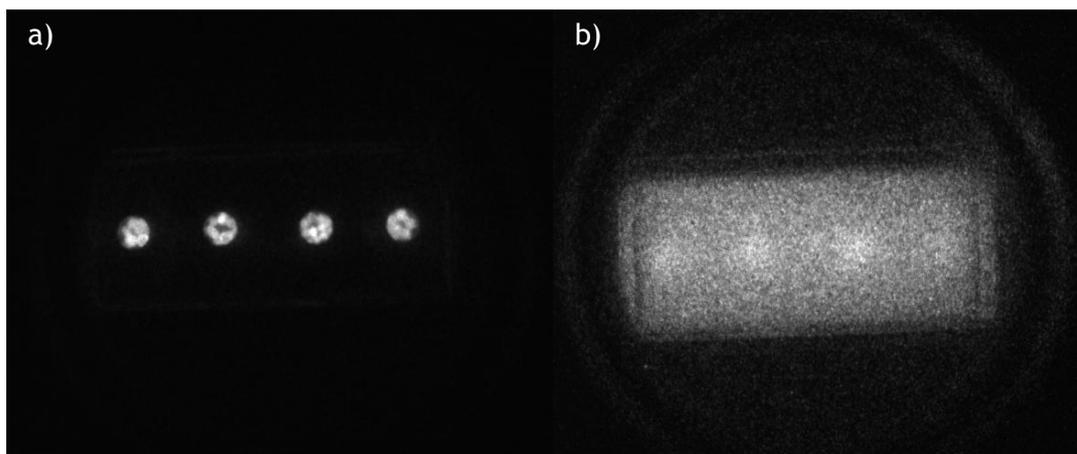


Figura 5.10 a) Bolas de fluoresceína nos poços. Tempo aquisição 200ms. Ganho MCP 150; b) Poços de fluoresceína com intralípido. Tempo aquisição 200ms. Ganho MCP 450.

O gráfico 5.2 contém as curvas de transmitância dos 2 filtros da câmara CCD, bem como a curva resultante da utilização de ambos.

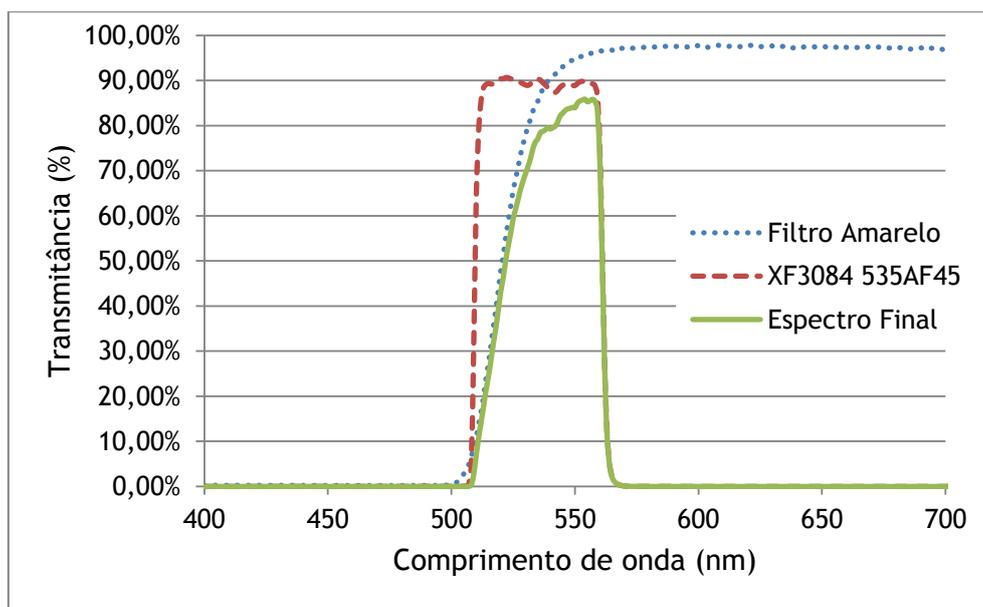


Gráfico 5.2 - Representação gráfica dos filtros acoplados à câmara CCD. A linha contínua encontra-se representado o espectro de emissão resultante do conjunto dos dois filtros.

5.1.4 Intensificador de Imagem do Tipo *Gated*

Os intensificadores de imagem do tipo *gated* permitem tempos de exposição muito curtos através da aplicação de um pulso de gate entre o fotocátodo e o prato de micro-canais (*PMC*). Geralmente um intensificador de imagem é constituído por um fotocátodo, um prato de micro-canais e um ecrã fosforescente (figura 5.13). (31)

O intensificador acoplado à câmara CCD entra em funcionamento quando recebe um pulso entre o fotocátodo e o PMC. O intensificador pode operar em modo gate, contudo na nossa aplicação nunca se utiliza este modo de funcionamento, já que não é necessário fazer estudos resolvidos no tempo. Quando a tensão à entrada dos micro-canais é positiva, os electrões são acelerados, multiplicados e convertidos em fótons no ecrã fosforescente de fósforo. (32)

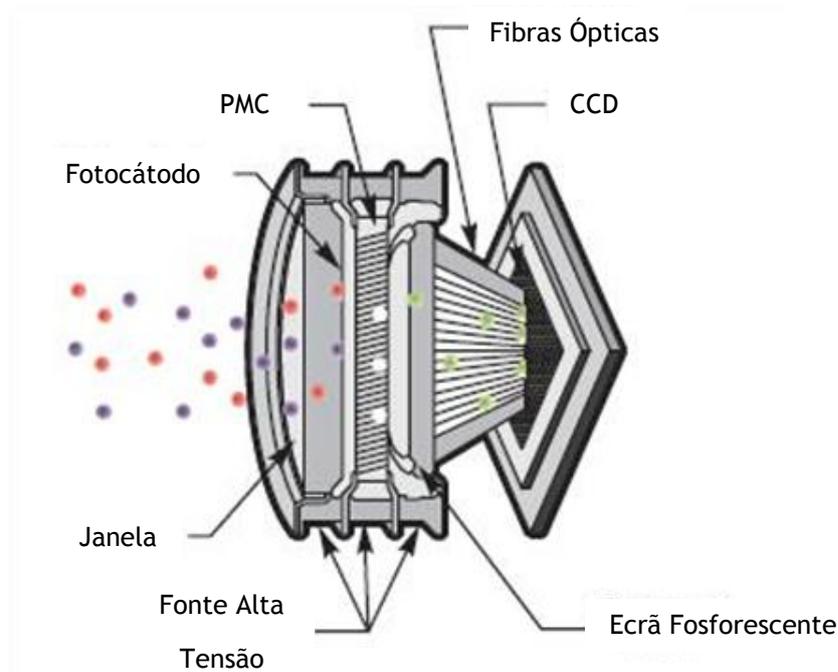


Figura 5.11 - Intensificador de Imagem

A incerteza no ganho do intensificador de imagem constitui uma fonte de ruído. A contribuição desta fonte de ruído é muitas vezes traduzida num factor de escala aplicado ao ruído quântico: cerca de 1.6 a 2.2 para intensificadores de 2ª geração e 3.5 a 4.2 para intensificadores de 3ª geração (com fotocátodos semicondutores). (31)

5.1.5 Estação de Controlo e Processamento

A última, mas não menos importante componente do sistema de fluorescência, é a estação de aquisição de dados. Neste terminal existe um computador, com um *software* de aquisição e processamento de imagem, denominado *Wasabi*. Nesta secção é feita uma apresentação do *software* usado quer para aquisição das imagens,

quer para o seu processamento. Serão apresentadas imagens do *software* e da interface do utilizador de cada um dos programas.

5.1.5.1 Wasabi®

Este *software* é uma aplicação *stand-alone* para aquisição e processamento de imagem. Possui um grande número de funções, geralmente aplicadas nas imagens adquiridas pela câmara CCD. Algumas das funções disponíveis são a pintura de imagens a preto e branco com a cor do fluoróforo usado (por exemplo colorir os poços de fluoresceína de verde com o devido gradiente consoante a intensidade), sobreposição de imagens, mudança do contraste das imagens, análise por ponto ou por área da amostra que está a ser estudada entre outras. (33)

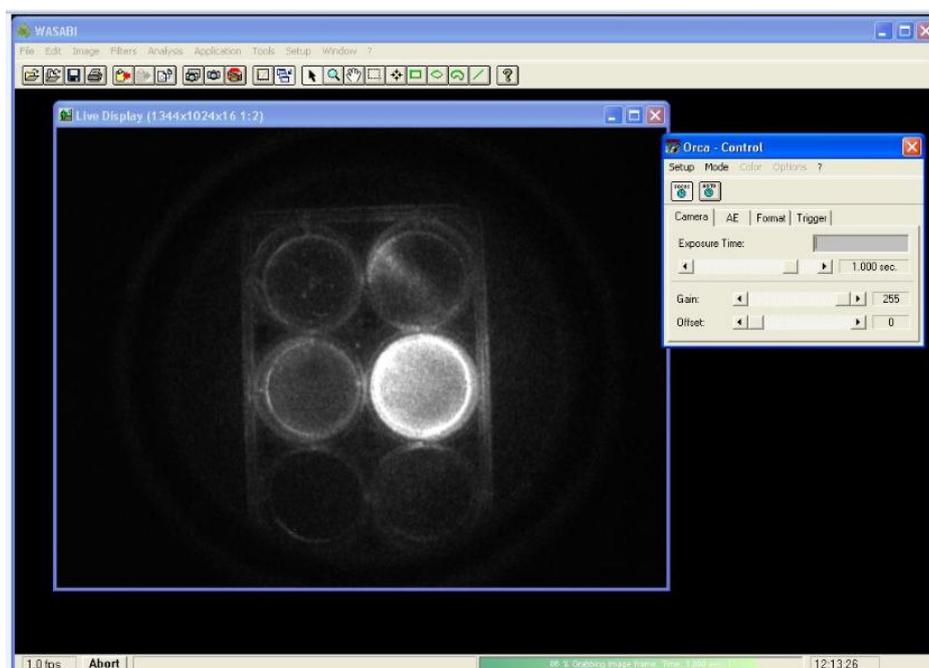


Figura 5.12 - Imagem da interface gráfica do Wasabi. Podemos observar a pequena caixa onde se controla o ganho no software e o tempo de exposição da amostra.

5.1.5.2 ImageJ®

O *ImageJ*® é um programa *freeware* de processamento de imagem em *Java* que corre quer num domínio online, quer em qualquer computador com uma *virtual machine* 1.4 ou posterior, estando disponível para diversos sistemas operativos, incluindo o *Windows*. Tem a capacidade de editar, analisar, processar e guardar

imagens de 8 até 32 bits, podendo lidar com diversos formatos como por exemplo *TIFF*, *GIF*, *JPEG*, *BMP*, *DICOM* entre outras.

Uma das principais características deste programa é ser multi processos, permitindo o processamento de várias imagens em simultâneo.

Com este *software* é possível calcular áreas, distâncias, ângulos, histogramas de densidade e perfis de distribuição. Uma das funções mais utilizadas ao longo do projecto foi a função *Interactive3D Surface Plot* onde é possível trabalhar as imagens segundo vários ângulos a 3D. É possível a utilização de diversos mapas de cores que facilitam em muito a visualização da informação apresentada. (34)

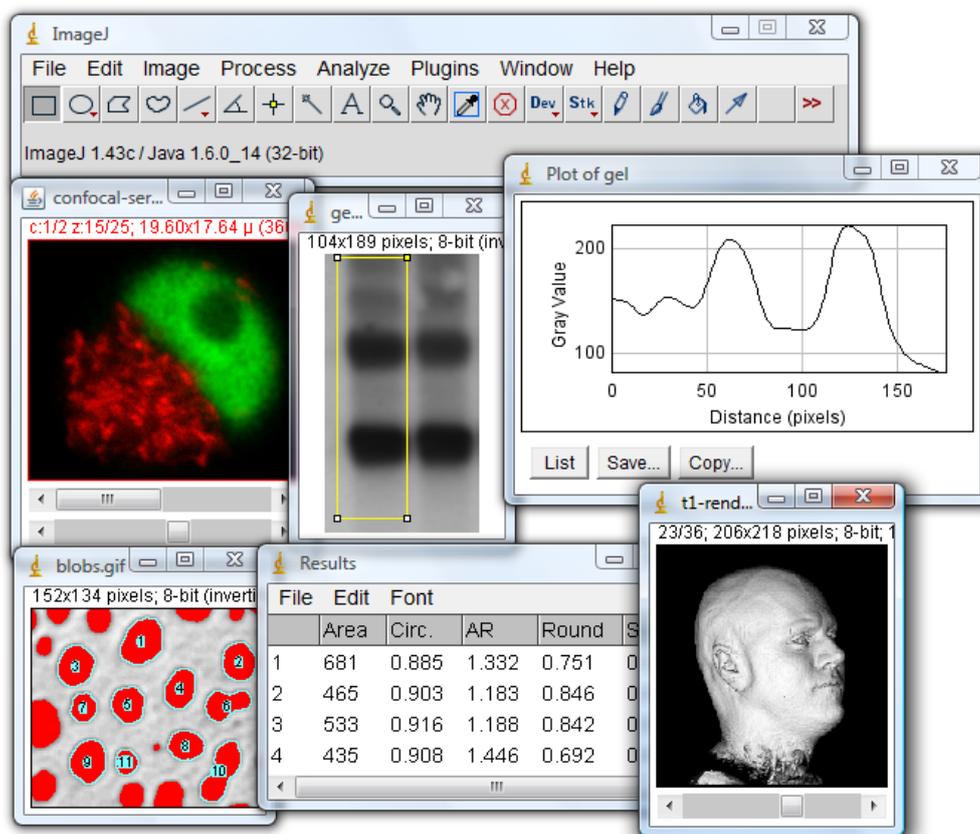


Figura 5.13 - Ambiente gráfico do programa ImageJ e de várias das funções disponíveis (34)

5.2 Teste e Caracterização da Câmara CCD

Nesta secção, é apresentada a caracterização da câmara CCD, em termos de calibração estática, linearidade, sensibilidade, resolução axial, relação sinal-ruído e corrente no escuro. De referir que as experiências descritas não foram por mim

realizadas. Com o devido consentimento aproveitei os dados obtidos das experiências realizadas pela minha supervisora Eng^a Ana Ferreira.

Para a determinação da relação sinal-ruído e da sensibilidade empregaram-se os métodos propostos por *Mullkin et al* (35).

5.2.1 Calibração Estática

Quando se desenvolvem projectos recorrendo a este tipo de detectores, é essencial conhecer o seu comportamento. Para tal é necessário proceder-se à calibração estática da câmara CCD face aos diferentes valores de entrada e parâmetros de funcionamento.

De maneira a analisar o comportamento do sistema, usou-se como fonte de sinal, um LED laranja, cujo comportamento é conhecido. Os gráficos mostram os resultados da calibração estática para os parâmetros de funcionamento tempo de exposição (gráfico 5.3), ganho do intensificador de imagem (ganho MCP) (gráfico 5.5) e para diferentes valores de potência radiante incidente na câmara, controlada a partir da intensidade de corrente que percorre o LED (gráfico 5.4):

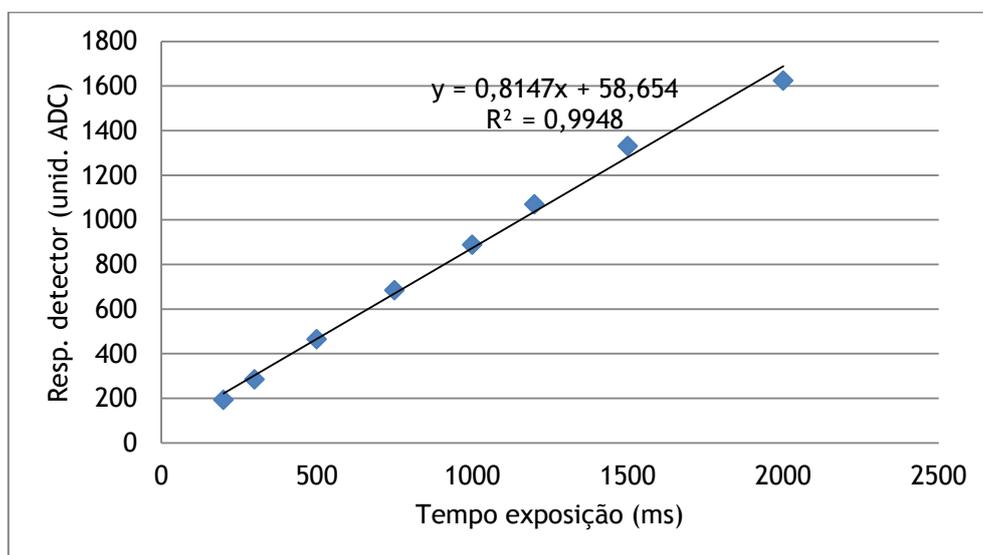


Gráfico 5.3 - Curva de calibração para tempos de exposição entre 0,2 e 2 segundos. Esta experiência foi levada a cabo com um ganho MCP de 460 e uma corrente de LED de 8,90mA tendo-se obtido uma não-linearidade de 3,95%.

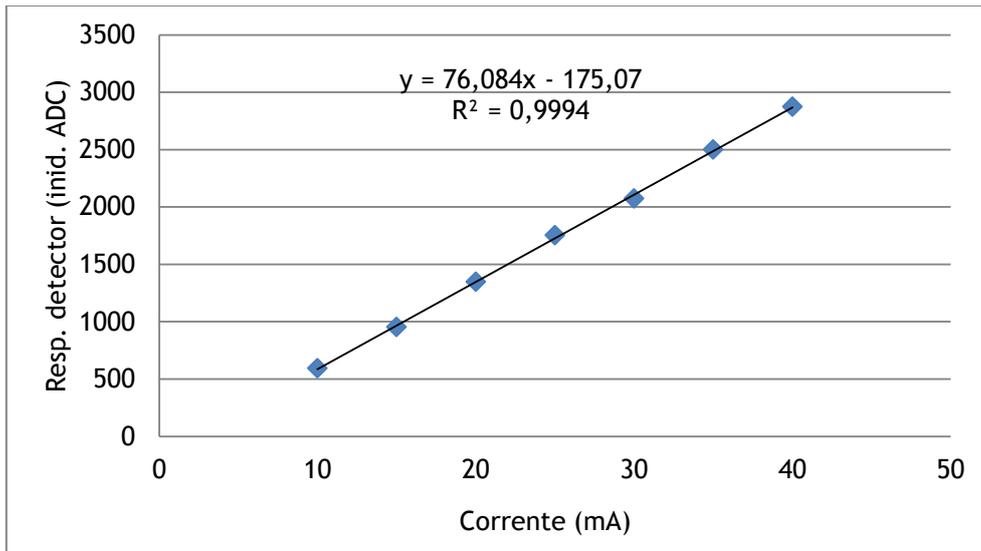


Gráfico 5.4 - Curva de calibração para diferentes valores de potência radiante emitida pelo LED. Esta experiência foi feita com um ganho MCP de 400 e um tempo de exposição de 0,75s. A potência LED foi controlada pela corrente directa no LED, que variou entre os 5mA

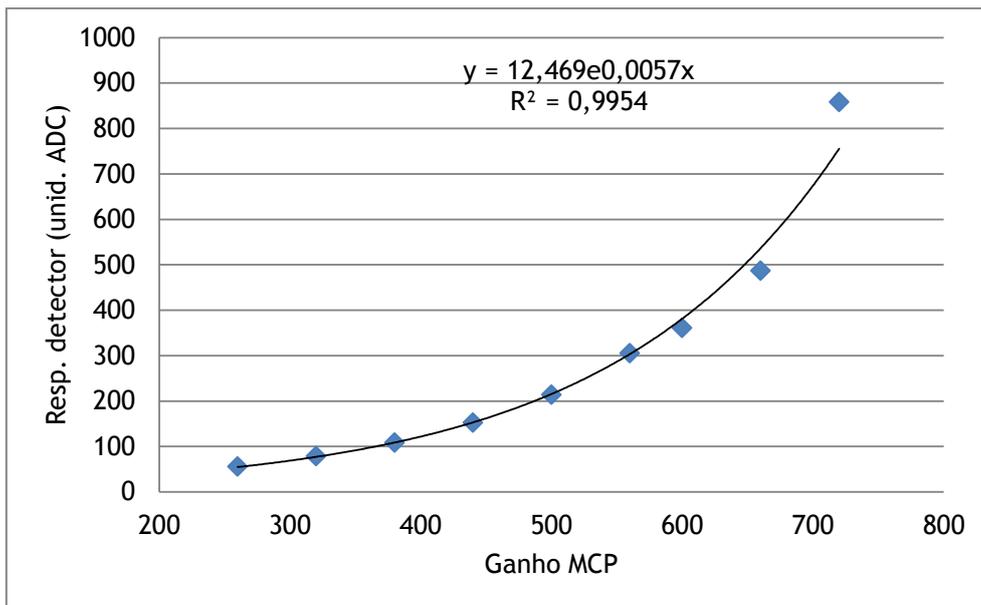


Gráfico 5.5 - Curva de calibração para valores de ganho MCP entre 260 e 780. Nesta experiência o tempo de exposição foi de 0,75s e a corrente no LED de 8,90mA. Nesta situação resulta um comportamento exponencial do ganho do MCP.

As experiências descritas foram repetidas usando como fonte de sinal soluções de fluoresceína com concentrações conhecidas. Foram adquiridas, para a mesma concentração de fluoresceína (500 ng/ml), 8 imagens de fluorescência, variando apenas o valor do tempo de exposição. Os parâmetros fixos tiveram os seguintes

valores: ganho do intensificador = 450, ganho no *software* = 255. Na tabela 5.1 está representada a variação da resposta do detector em função do tempo de exposição e no gráfico 5.6 é apresentada a curva de linearidade resultante do tratamento das imagens obtidas.

Tempo de Exposição (ms)	Resposta média do detector (unidades ADC)
200	171,44
300	175,93
500	222,72
750	324,00
1000	403,64
1200	497,32
1500	571,14
2000	728,47
3000	1111,43
5000	1816,53
7500	2531,83

Tabela 5.1 - - Variação da resposta do detector com os valores do tempo de exposição da câmara

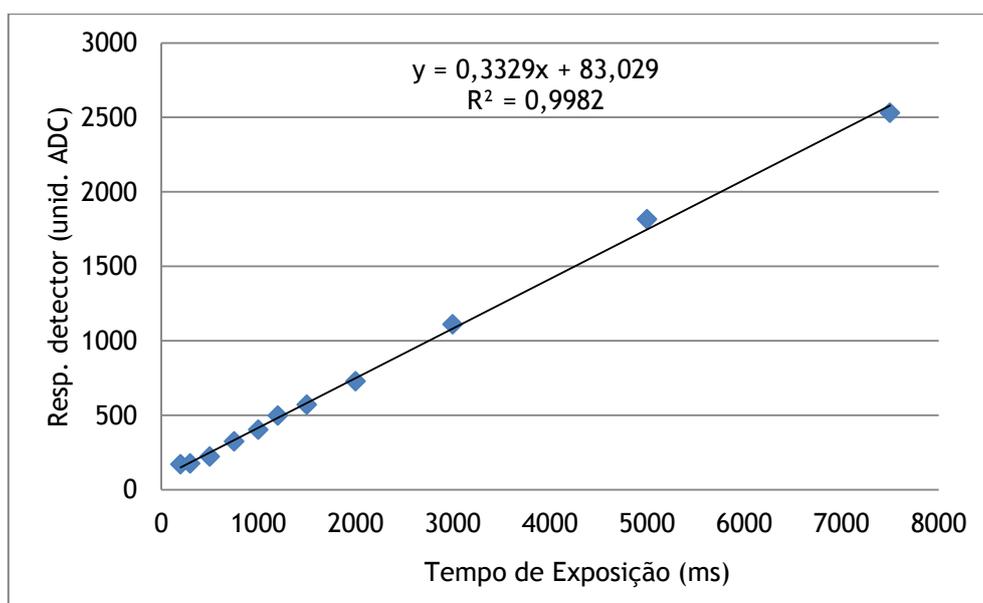


Gráfico 5.6 - Curva de variação da resposta do detector com os valores de tempo de exposição. A percentagem de não linearidade registada para estas ocorrências foi de 3,79%.

Tanto no teste com o LED laranja, como no teste da solução de fluoresceína, apenas se fez variar o tempo de aquisição das imagens. Como era de esperar, os valores de não-linearidade obtidos foram bastante idênticos (3,95 % e 3,79 %). De referir que nos testes, a câmara respondia de forma linear, qualquer que fosse o parâmetro de entrada variado. A exceção foi o teste de variação do ganho MCP onde o número de contagens subia de forma exponencial.

Foram ainda adquiridas, para a mesma concentração de fluoresceína (500 ng/ml), 8 imagens de fluorescência, variando apenas o valor do ganho do intensificador de imagem. Os parâmetros fixos tiveram os seguintes valores: tempo de exposição = 1000 ms, ganho=255. Na tabela 5.2 estão indicados os valores de ganho e de intensidade. No gráfico 5.7 está representada a curva resultante do tratamento das imagens obtidas.

Ganho do MCP	Resposta do detector (unid. ADC)
200	90,93
260	126,97
320	192,45
380	265,12
440	363,03
500	501,17
560	703,57
600	870,96
660	1268,49
720	1676,33

Tabela 5.2 - Variação da resposta do detector com os valores do ganho no intensificador

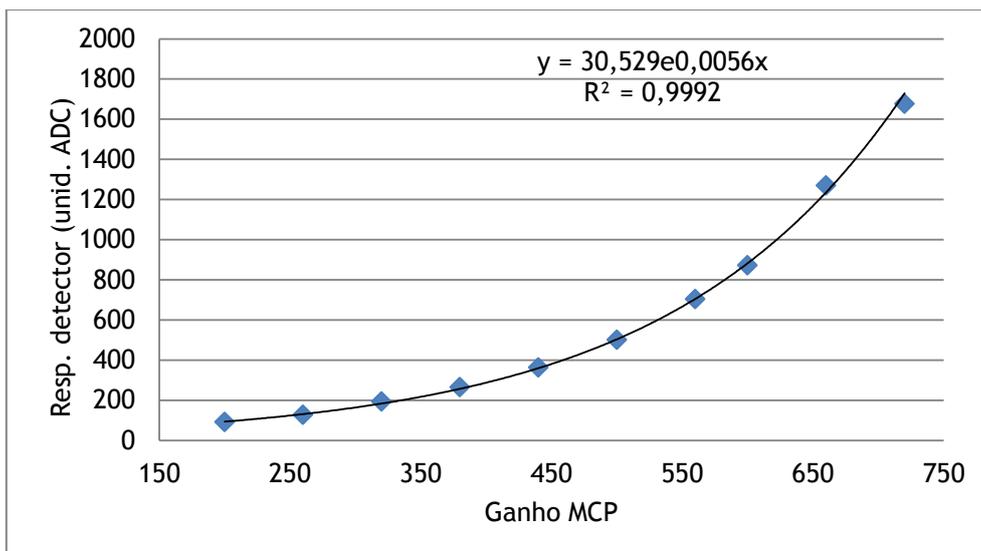


Gráfico 5.7 - Curva de resposta do detector com os valores de ganho do intensificador. Tal como no LED, existe uma subida exponencial do número de contagens.

Observamos que o sistema responde de forma idêntica à variação do ganho MCP no teste com o LED laranja. O número de contagens também sobe de forma exponencial segundo a mesma tendência, $e^{0,056x}$ no caso do LED e $e^{0,057x}$ nesta situação.

5.2.2 Relação Sinal-Ruído

O sinal adquirido pelas câmaras CCD contém vários tipos de ruído, sendo o mais dominante o ruído que resulta da natureza quântica dos processos de emissão e detecção de fótons, que obedecem a uma estatística de Poisson (ruído *shot* dos fótons). As outras fontes de ruído são o ruído de leitura, que tem origem no pré-amplificador da electrónica de leitura e conversão, e o ruído da corrente no escuro que também segue uma estatística de Poisson, já que a emissão térmica de electrões é igualmente um processo quântico. Uma vez que o ruído *shot* dos fótons domina, a relação sinal-ruído (SNR) num detector CCD tem um máximo teórico, que depende do valor máximo de electrões por *pixel*.

A relação sinal-ruído é calculada através das seguintes expressões,

$$SNR = 10 \log \frac{\bar{I}^2}{var(I)}$$

$$var(I) = \frac{1}{2} var(I_1 - I_2)G = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{N^2 - 1} \sum (I_d - \bar{I}_d)^2 \right)$$

em que I_1 e I_2 se referem a 2 imagens de um objecto de teste uniforme, adquiridas nas mesmas condições de tempo de exposição e ganho da câmara, \bar{I} corresponde ao valor médio de um sub-conjunto de N pixéis das imagens I_1 e I_2 , expresso em ADUs, I_d corresponde à imagem obtida fazendo a diferença pixel a pixel entre as imagens.

A relação sinal-ruído máxima pode ser calculada através da seguinte equação:

$$SNR_{max} = 10 \log \left(\frac{2^{\#bits} - 1}{G} \right)$$

com *#bits* o número de bits do ADC da câmara e G o ganho electrónico (número de ADUs por electrão).

Para a determinação da relação sinal-ruído, foram adquiridas duas imagens de um alvo homogéneo, nas mesmas condições, fazendo-se variar apenas o tempo de exposição (750 ms, 1000 ms, 1500 ms, 2000 ms e 3000 ms). Os valores calculados estão reunidos na tabela 5.3.

Tempo Exposição (s)	SNR (dB)	SNR _{Max}
0,75	32,81	40,03
1	34,18	40,72
1,2	34,70	40,34
1,5	35,77	40,94
2	37,00	41,21
3	38,70	41,23

Tabela 5.3 - SNR para vários níveis de tempo de exposição. Para cada tempo de exposição foram calculadas a SNR e a SNRmax. Concentração de Fluoresceína 1000 ng/ml; MCP=1000; gain=0.

² Número de pixéis da sub-imagem de I_d

No gráfico 5.8 o SNR medido e previsto para dois valores de ganho electrónico encontra-se sobreposto. Como se verifica a câmara CCD possui um SNR limitado pelos fótons (igual ao SNR ideal) para a gama dinâmica do sinal de saída aqui estudada.

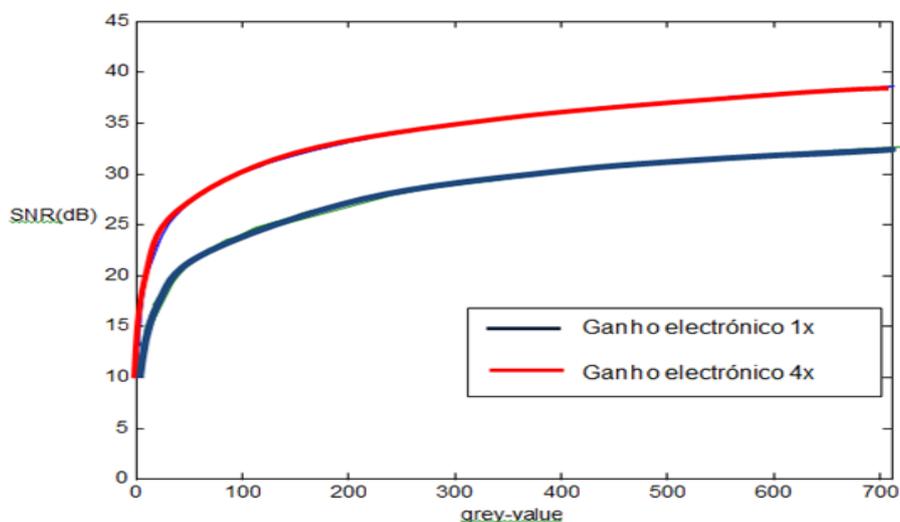


Gráfico 5.8 - - SNR para uma imagem cuja concentração de Fluoresceína é 1000 ng/ml, ganho do MCP = 500 e Tempo de Exposição 5s. As linhas contínuas mostram o SNR previsto (ADC de 12 bits e ganhos electrónicos $g_{1x}=0,099$ e $g_{4x}=0,388$).

Valores de m da sub-imagem de tamanho $m \times m$	SNR (dB)	Ganho Electrónico (ADU/e)
20	37,77	0,208
40	37,50	0,222
60	37,30	0,232
80	36,97	0,250
100	36,87	0,256
120	36,53	0,277
140	36,10	0,306
160	35,56	0,346
180	34,86	0,407

Tabela 5.4 Variação do SNR e do Ganho Electrónico com o tamanho da sub-imagem de Id . Concentração de Fluoresceína 1000 ng/ml; Tempo de Exposição 1,5s; MCP 1000 e gain 0.

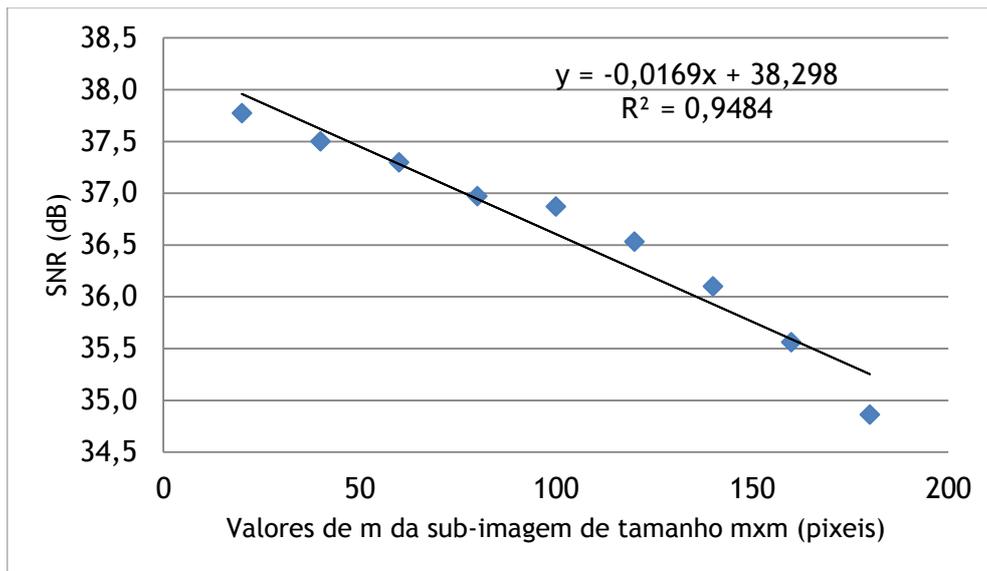


Gráfico 5.9 - - Variação do SNR com os valores de m da sub-imagem I_d de tamanho $m \times m$.
Imagens adquiridas com concentração de Fluoresceína de 1000 ng/ml, ganho MCP=1000 e $gain=0$.

A sensibilidade relaciona o número de unidades do conversor A/D da câmara (ADU - A/D converter *units*) com o número de fótons incidentes capturados por pixel. Experimentalmente pode ser determinada adquirindo duas imagens de corrente no escuro I_{d1} e I_{d2} , obtidas com o obturador fechado exactamente nas mesmas condições, para vários tempos de exposição.

De facto, numa câmara limitada pelo ruído *shot* dos fótons, pode-se relacionar a variância $var(I)$ com o valor médio \bar{I} através de:

$$var(I) = G(\bar{I} - \bar{I}_{dark}) + var(I_{ddark})$$

em que I_{ddark} corresponde à imagem obtida fazendo a diferença pixel a pixel entre as imagens I_{d1} e I_{d2} e \bar{I}_{dark} é o valor médio da imagem I_{dark} calculado para o subconjunto de N pixéis. A variância nas imagens de corrente no escuro $var(I_{dark})$ corresponde a

$$var(I) = \frac{1}{2} var(I_1 - I_2)G = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{N-1} \sum (I_{ddark} - \bar{I}_{ddark})^2 \right)$$

Aqui \bar{I}_{ddark} é o valor médio da imagem I_{ddark} calculado para o mesmo subconjunto de N pixéis.

Assim, a partir das duas imagens de corrente no escuro é possível calcular o ganho electrónico, usando as expressões anteriores. Conhecendo o ganho electrónico pode-se obter a sensibilidade S através de

$$S = QE \times G \times F \times \tau_w$$

onde QE é a eficiência quântica da câmara, F é a fracção do pixel foto-sensível (*filling factor*) e τ_w é o coeficiente de transmissão da janela da câmara.

É ainda possível calcular o fluxo de fotões, de acordo com:

$$\Phi_f = \frac{\bar{I} - \bar{I}_{dark}}{A_i \times t_e} \times S^{-1}$$

em que A_i é a área do pixel e t_e o tempo de exposição.

O gráfico 5.10 mostra a variância na imagem para dois valores de ganho electrónico, representada em função da resposta do detector. As linhas contínuas mostram os valores previstos para o ganho electrónico $1x = 0,099e^{-1}$ ADU e o ganho electrónico $4x = 0,388e^{-1}$ ADU. Como se pode observar a variância medida está muito próxima dos valores previstos.

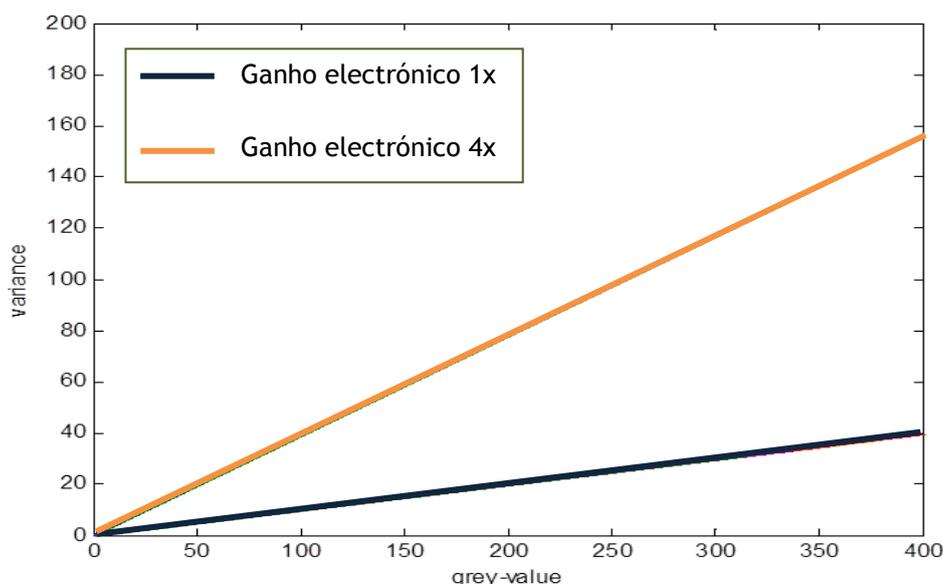


Gráfico 5.10 - A variância para dois ganhos electrónicos como função da resposta do detector. As linhas contínuas mostram os valores previstos para ganho electrónico $1x = 0,099 e^{-1}$ ADU e ganho electrónico $4x = 0,388 e^{-1}$ ADU. Concentração de Fluoresceína é 1000 ng/ml

A tabela 5.5 reúne os valores medidos e calculados para diferentes tempos de exposição.

Tempo de Exposição (s)	Ganho electrónico (ADU/e)	Fluxo (e/s.µm ²)	Sensibilidade (ADU/e)	I/I _{max}
0,75	0,406	89,60	0,211	591/4095
1	0,347	96,27	0,180	722/4095
1,2	0,378	94,87	0,197	932/4095
1,5	0,330	99,01	0,171	1059/4095
2	0,310	101,97	0,161	1368/4095
3	0,309	104,83	0,160	2099/4095

Tabela 5.5 - Ganho electrónico, fluxo e sensibilidade medidos com valores constantes de ganho MCP, concentração de Fluoresceína (1000 ng/ml), para diferentes valores de tempo de exposição

5.2.3 Corrente no Escuro

Os electrões armazenados nos poços do CCD, não são apenas produzidos por fotões, mas também por energia térmica. A corrente no escuro pode ser definida como sendo o fluxo induzido de electrões por pixel de outra fonte que não os fotões.

Para se calcular o fluxo de electrões no escuro utiliza-se a seguinte equação:

$$\Phi_f = \frac{\bar{I}_{dark}}{A_i \times t_e} \times S^{-1}$$

A tabela 5.6 apresenta os valores de corrente no escuro para diferentes tempos de exposição.

Tempo Exposição (s)	Corrente no Escuro (ADU/s.pixel)	Fluxo Electrões no escuro (e/s.µm ²)
0,75	184,61	28,00
1	185,42	24,72
1,2	185,35	18,87
1,5	186,44	17,43
2	187,64	13,99
3	189,75	9,48

Tabela 5.6 - Corrente no escuro em ADU/s.pixel. A partir da corrente no escuro, ganho electrónico e tamanho do pixel (6,45 · µm x 6,45 · µm) calculou-se o Fluxo de electrões no escuro, Φ_{dark}

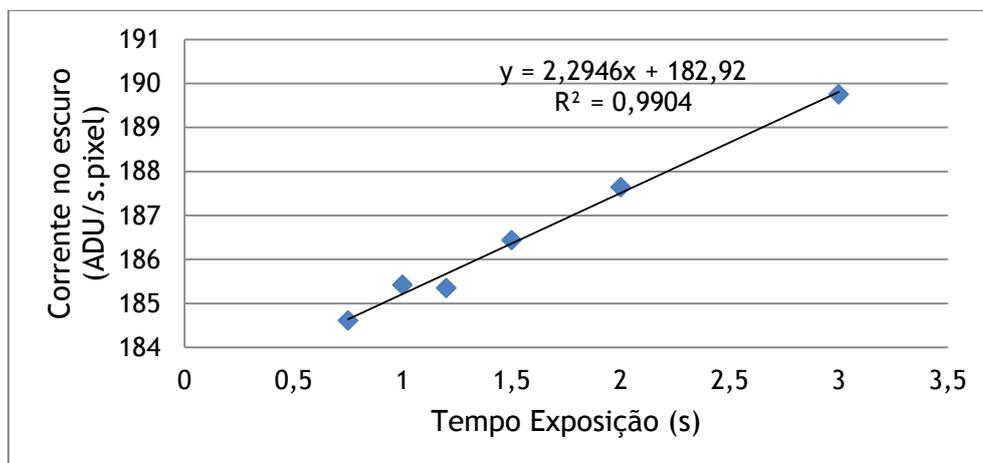


Gráfico 5.11 - Corrente no escuro para cada tempo de exposição. Obteve-se um erro de não-linearidade de 0,14 %.

5.2.4 Resolução Lateral

A resolução lateral de uma câmara CCD é a distância mínima entre dois pontos, situados no mesmo plano focal, de forma a serem distinguíveis pela câmara. Estimámos a resolução lateral da câmara a partir da largura a meia altura da sua resposta a impulsos. No modo de fluorescência o problema da medição da resposta a impulsos da câmara reside em obter uma fonte de fluorescência pontual. Para contornar essa dificuldade mediu-se a resposta do sistema a uma função degrau, que equivale ao integral da função de resposta a impulsos. Para medir a resposta a impulsos no modo de fluorescência foi utilizado um prisma de dimensões 4.5x1.25x1.25 cm (*Compound 610, Starna Brand*). No gráfico 5.12 podem-se ver os espectros de excitação e de emissão do Composto 610. Os resultados obtidos estão representados nos gráficos 5.13 e 5.14. Através da imagem do prisma calculou-se também o tamanho do pixel no plano objecto, que corresponde a $\pm 250 \mu\text{m}$ (H) x $\pm 220 \mu\text{m}$ (V).

A análise dos dados resultou numa função resposta a impulsos com uma largura a meia altura inferior a 1 pixel, o que corresponde a uma resolução lateral inferior a $250 \mu\text{m}$.

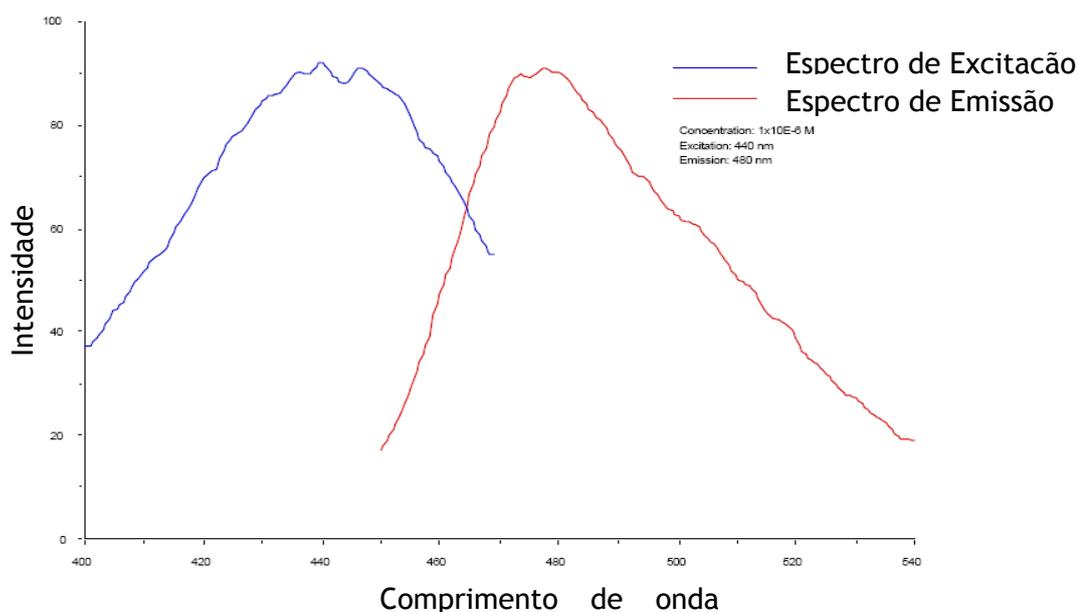


Gráfico 5.12 - Espectros de excitação e de emissão de fluorescência do Composto 610.

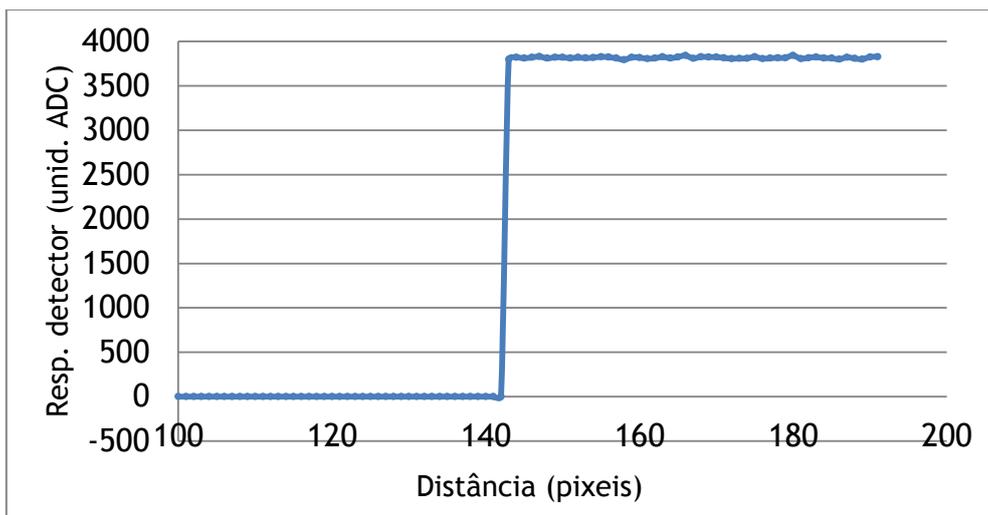


Gráfico 5.13 - Resposta da câmara CCD a uma função degrau (perfil do prisma).

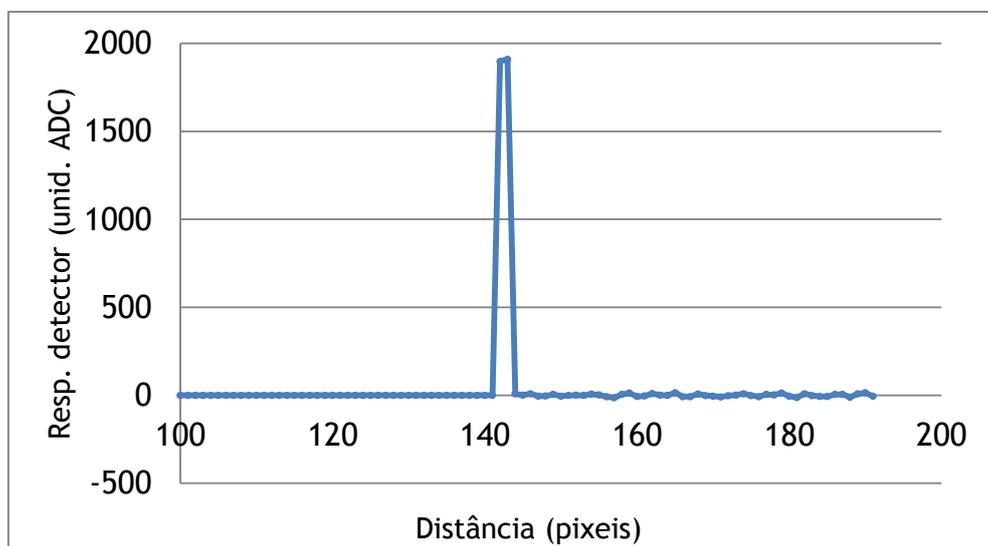


Gráfico 5.14 - Resposta a impulsos da câmara CCD (derivada da resposta a uma função degrau).

6. Processamento das Imagens de Fluorescência

Como já foi referido por diversas vezes ao longo desta dissertação, um dos aspectos mais importantes para o sucesso deste trabalho prende-se com o processamento das imagens de fluorescência. Um dos pontos fundamentais é o desenvolvimento de um *software* que corrija a heterogeneidade da iluminação da área a ser analisada. Com o uso dos difusores, esta característica do sistema melhorou significativamente. Contudo, justifica-se ainda aplicação de correcções por *software* de imagens. Neste capítulo são apresentados os princípios regidos para o desenvolvimento do programa de correcção. Serão apresentadas algumas das funcionalidades do mesmo, bem como os resultados e testes que comprovam a melhoria da qualidade das imagens.

6.1 Princípios do Software

O *software* de correcção de imagens foi desenvolvido usando o *Matlab*® 2009b. Esta escolha deveu-se a várias razões:

- Uma maior aptidão nesta ferramenta de desenvolvimento comparativamente a outras (*Java* ou *Visual Basic*);
- Ser uma ferramenta de desenvolvimento na qual é mais intuitiva e mais rápida a criação de interfaces, devido à função *guide*;
- A existência de várias funções predefinidas em *toolboxes* que facilitam em muito a análise e processamento de imagens adquiridas pelo sistema;
- Como um dos princípios do *software* de correcção é a aplicação de uma matriz de correcção às imagens, o *Matlab* é particularmente adequado ao desenvolvimento de tal *software*, pois é um sistema interactivo cujo elemento básico de informação é a matriz. Este sistema permite a resolução de muitos problemas numéricos numa fracção do tempo que seria empregue para escrever um programa semelhante em outra linguagem. (36)

Uma das primeiras preocupações, no desenvolvimento do *software* foi a variância presente em imagens adquiridas nas mesmas condições, devido às contribuições do ruído *shot* dos fótons, que obedece a uma estatística de Poisson. Esta variância assume maior importância relativa para tempos de aquisição muito curtos, na ordem dos 300 ms. Uma vez que, para uma distribuição de Poisson, a variância é igual ao valor médio, para menor número de contagens, este ruído inerente aos processos de emissão e detecção é percentualmente mais elevado quando comparado com situações de maior número de contagens. De forma a minimizar o efeito da variância nas imagens no cálculo da correção de iluminação, e a uniformizar as aquisições nas mesmas condições independentemente do tempo de exposição, foi desenvolvido um programa simples, *media_imagens.m*. Este programa analisa o número de contagens das 6 imagens pixel a pixel, removendo, quer o número de contagens mais alto, quer o número de contagens mais baixo de cada pixel. Em seguida faz a média aritmética dos valores do pixel das 4 imagens restantes. Todas as imagens corrigidas foram previamente processadas usando este método.

O segundo passo a executar era a eliminação da luz de fundo, isto é, subtrair às imagens o número de contagens provenientes quer da luz “parasita” existente no laboratório, quer do ruído térmico. Apesar de todas as precauções, como o uso de cartolinas pretas na porta de entrada e nas fontes de luz da sala (como por exemplo o mostrador da fonte de alimentação e o monitor do terminal de aquisição de imagens), existe sempre um número de fótons detectados pela câmara CCD que não são provenientes da fonte de sinal. Para minimizarmos o efeito desta luz nas imagens adquiriram-se, com as fontes de iluminação ligadas e sem qualquer tipo de amostra na área de estudo, imagens de fundo com diferentes tempos de aquisição. Quanto maior o tempo de aquisição maior será o número de fótons detectados pela câmara CCD. Por esta razão, para cada tempo de aquisição terá que estar associada uma imagem de fundo diferente.

A tabela 6.1 mostra o número de contagens para vários tempos de aquisição. Os dados na tabela foram obtidos considerando uma região de interesse circular com 600 pixels de diâmetro, sendo que o valor apresentado para cada uma das situações

corresponde ao valor médio dos píxeis dentro dessa área. De referir que estas imagens foram adquiridas com uma abertura do diafragma da câmara, que não foi alterada nos testes que foram sendo realizados. Só desta forma se podem utilizar estas imagens no *software* de correcção. No caso da abertura do diafragma ser alterada, novas imagens de fundo terão que ser adquiridas.

Tempo de Aquisição (ms)	Média (contagens)	Desvio Padrão (contagens)
200	199,5	11,6
300	201,8	11,9
500	205,3	12,4
750	210,1	13,1
1000	215,3	13,7
1200	218,9	14,1
1500	225,2	14,9
2000	235,1	16,4

Tabela 6.1 - Número de contagens - Iluminação de fundo (ruído térmico e luz parasita)

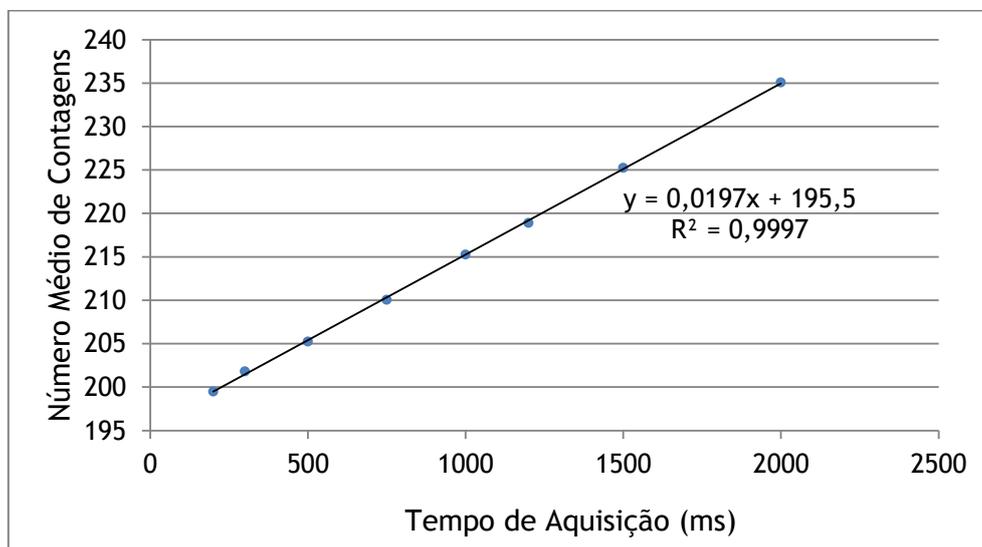


Gráfico 6.1 - Gráfico representativo do número médio de contagens correspondentes a iluminação de fundo em cada um dos tempos de aquisição

Tal como era expectável, existe uma proporcionalidade directa entre o tempo de aquisição da imagem e o número médio de contagens.

É no seguimento desta análise que surge a primeira correcção do *software*, em que é subtraída a cada pixel da imagem que se está a estudar, o fundo correspondente ao tempo de aquisição empregue.

O passo seguinte envolve a aplicação da matriz de correcção às imagens. Ao contrário do que acontece na subtracção das imagens de fundo, existe apenas uma matriz de correcção geral para todas as imagens, independentemente do tempo de aquisição.

Para avaliar a iluminação do nosso sistema, adquiriram-se imagens de uma solução de fluoresceína de 150 ng/ml de concentração, que se encontrava num recipiente de vidro, que ocupava todo o campo de visão da câmara. Uma vez que o alvo é constituído por uma solução homogénea de fluoresceína, é possível obter, desta forma, o perfil de iluminação do campo de visão da câmara. Isto porque o fluxo de fotões de fluorescência emitidos por uma solução de um fluoróforo é proporcional ao fluxo de fotões incidentes na solução, desde que não ocorra *photobleaching*. Foram adquiridas imagens com tempos de aquisição de 200 ms, 300 ms, 500 ms, 750 ms, 1000 ms, 1200 ms, 1500 ms e 2000 ms, sendo adquiridas 6 imagens para cada um dos tempos de aquisição o que perfaz um total de 48 imagens. As imagens foram pré-processadas através do programa *media_imagens.m* e fazendo a subtracção de fundo adequada.

A imagem resultante foi ainda filtrada de modo a diminuir as discrepâncias existentes entre píxeis vizinhos. Assim aplicou-se um filtro gaussiano à imagem. Este filtro foi criado recorrendo à função *fspecial* existente no *Matlab*. Esta função permite a criação de um filtro passa-baixo gaussiano definindo o seu tamanho e desvio padrão. O filtro foi definido com sendo uma matriz quadrada de 15x15 píxeis, mantendo-se o valor do desvio padrão em *default* (0,5). Na figura 6.1 apresentamos um exemplo da acção deste filtro numa imagem.

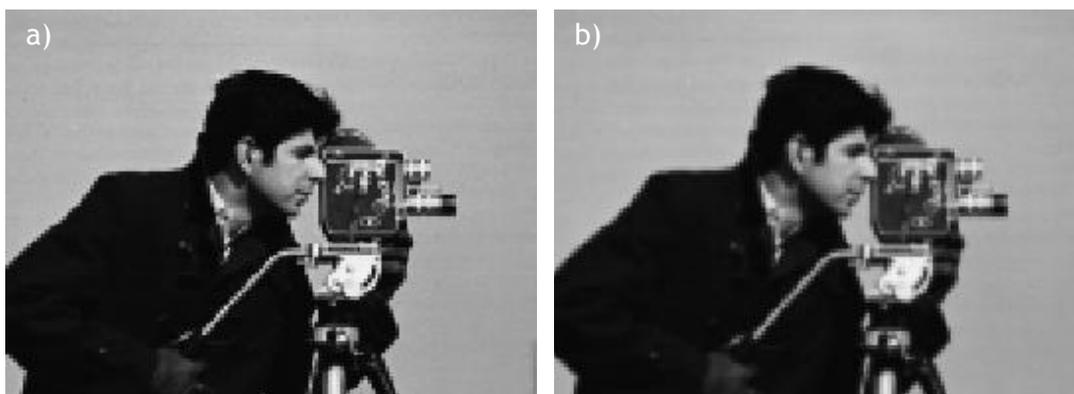


Figura 6.1 - a) Imagem original; b) Imagem após aplicação do filtro

Após esta primeira fase de processamento da imagem, estamos prontos para o cálculo da matriz de correcção. Esta matriz de correcção tem como objectivo garantir uma maior homogeneidade de iluminação da amostra, isto é, garante que todos os píxeis do campo de visão da câmara são iluminados com aproximadamente a mesma intensidade de luz. A imagem é analisada e obtém-se o pixel de maior intensidade, ou seja, aquele que tem um maior número de contagens. É este valor que vai servir de base para o cálculo de todos os coeficientes. Este ponto terá logicamente um valor de coeficiente igual a 1. Todos os outros coeficientes serão calculados para que após a aplicação da matriz de correcção, a imagem tenha o mesmo número de contagens (o tal valor máximo da imagem) para todos os píxeis (situação ideal de iluminação perfeitamente uniforme numa solução toda ela com a mesma concentração).

Os coeficientes para cada ponto são calculados fazendo a divisão entre o valor de intensidade máximo e o valor em cada um dos pontos da imagem. Obtém-se assim uma matriz com um valor mínimo de 1 (pontos de valor igual ao máximo) e um valor máximo de 10 pois decidiu-se desprezar todos os valores cujo coeficiente fosse superior a 10, predefinindo-o com o valor 1. Estes pontos cujos coeficientes são superiores a 10 correspondem, grosso modo, aos pontos que ficam fora do campo de visão da câmara CCD. Esta situação é mais facilmente compreendida observando a figura 6.2.

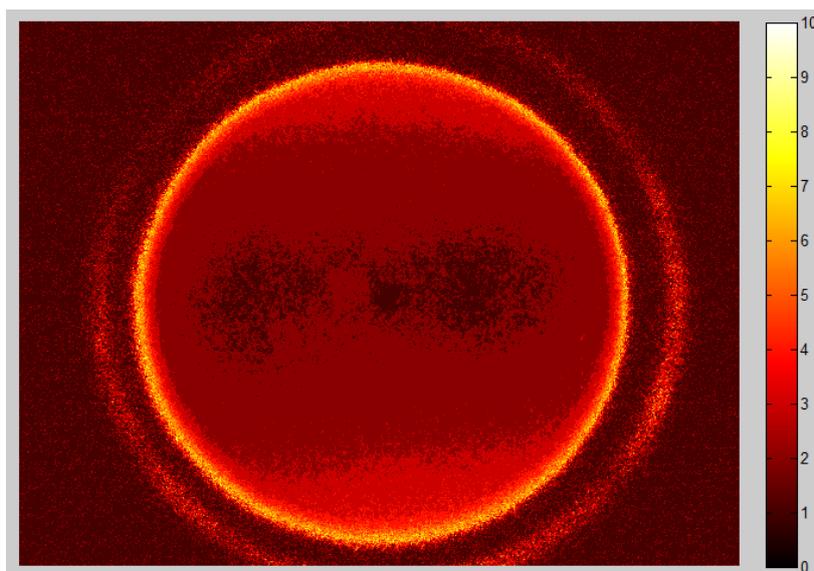


Figura 6.2 - Representação gráfica da matriz de correção. Toda a área exterior ao anel amarelo não é detectável pela câmara CCD. Colormap - "Hot".

Por fim é obtida uma matriz de correção para cada uma das imagens com os diferentes tempos de aquisição. Como era esperado que as matrizes de correção fossem bastante idênticas, independentemente do tempo de aquisição da imagem, fez-se uma média pixel a pixel das matrizes obtidas. Tal como no programa *media_imagens.m* foram excluídos do cálculo da média os valores máximo e mínimo em cada um dos pixéis. Obtém-se por fim a matriz de correção final para o nosso sistema de fluorescência.

Nas figuras 6.3 e 6.4 são apresentadas as imagens usadas para aferir a iluminação antes da correção. Toda esta apresentação é feita recorrendo à função *Interactive 3D Surface Plot* do *ImageJ* que nos permite uma melhor visualização dos dados.

Como podemos observar existe ainda alguma discrepância no que toca a valores de intensidade nas imagens adquiridas com tempos de aquisição 500 ms e 1200 ms. Estas serão as imagens que servirão de exemplo para demonstrar a melhoria resultante da aplicação da matriz de correção.

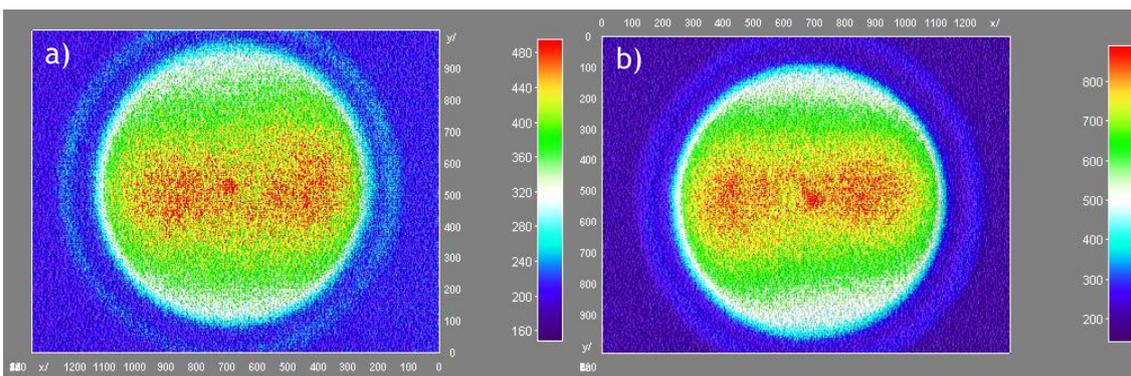


Figura 6.3 - a) Imagem não corrigida 500 ms; b) Imagem não corrigida 1200 ms

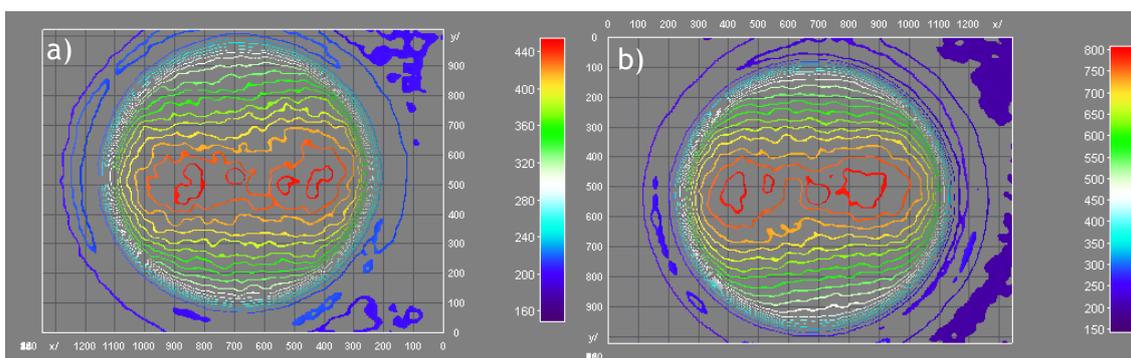


Figura 6.4 - Linhas isotônicas: a) Imagem não corrigida 500ms; b) Imagem não corrigida 1200ms

Nas figuras 6.5 e 6.6 são apresentadas as imagens corrigidas após subtração do fundo, aplicação do filtro gaussiano e aplicação da matriz de correção geral.

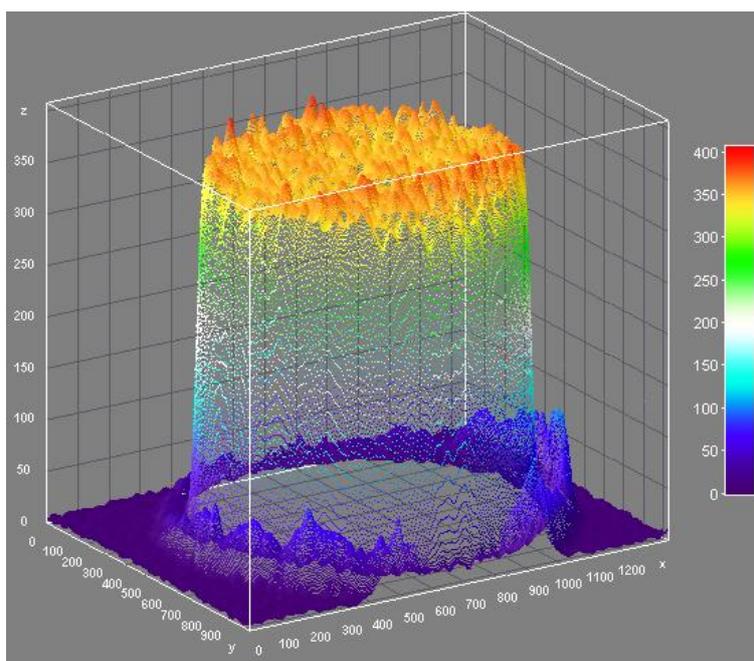


Figura 6.5 - Imagem corrigida - 500 ms

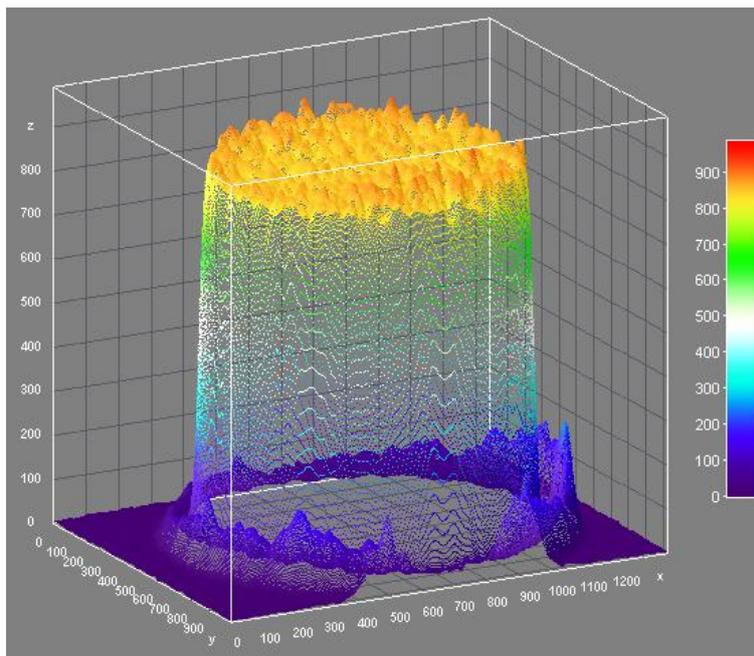


Figura 6.6 - Imagem corrigida - 1200 ms

Como é possível observar, houve uma melhoria significativa em ambas as imagens, o que demonstra que o *software* desenvolvido consegue corrigir grande parte da heterogeneidade da iluminação. Mais resultados e comparações de imagens antes e após a correção, poderão ser observadas na secção *Resultados e Desempenho do Software*.

6.2 Interface para o Utilizador

Aqui será apresentada a interface gráfica a ser usada pelo utilizador do sistema de fluorescência. Toda a interface foi desenvolvida com o auxílio da função *guide* do *Matlab 2009b*. Serão apresentadas todas as potencialidades do sistema, fazendo uma descrição das funções e dos procedimentos correctos para a utilização do programa.



Figura 6.7 - Imagem representativa da interface gráfica

Esta interface foi desenvolvida com a intenção de ser de fácil utilização para qualquer pessoa. É bastante intuitiva e simples, sendo possível fazer o processamento de várias imagens num curto intervalo de tempo. Seguidamente é feita uma descrição das várias funções existentes na interface.

- 1- Botão “Abrir Imagem”. Tem como função abrir a imagem que se quer corrigir. Ao ser escolhida, essa imagem é apresentada na janela “Imagem Original”.
- 2- Lista “Tempo de Aquisição”. Permite seleccionar todos os tempos de aquisição desde 200 ms a 2000 ms. Ao escolher-se o valor da lista é feita a subtracção automática do fundo correspondente ao tempo de aquisição seleccionado. Esta imagem é apresentada na janela “Imagem Sem Fundo”.
- 3- Botão “Corrigir Imagem”. Ao ser premido aplica o filtro gaussiano à imagem, aplicando posteriormente a matriz de correcção geral previamente armazenada em disco. A imagem corrigida é apresentada na janela “Imagem Corrigida”.
- 4- Lista “Colormap”. Lista como todos os mapas de cores existentes no *Matlab 2009b*. É possível seleccionar um dos vários mapas de cores de forma a obter

diferentes apresentações e visualizações da mesma imagem. Ao ser seleccionado altera as 3 imagens apresentadas na interface.

- 5- Botão “*Guardar Imagem*”. Como o próprio nome indica esta função permite armazenar a imagem em disco, em diferentes formatos como, por exemplo *TIFF*, *JPEG* ou *PNG*.
- 6- Botão “*Sair*”. Termina o programa.

No caso de se querer corrigir uma nova imagem basta reiniciar este processo sem que seja necessária reinicializar a aplicação.

De referir que este *software* é utilizado apenas para corrigir a imagem. Todos os testes feitos à imagem que nos permitem retirar uma maior número de informações, como por exemplo mapas de intensidade, foram feitos recorrendo ao *ImageJ*.

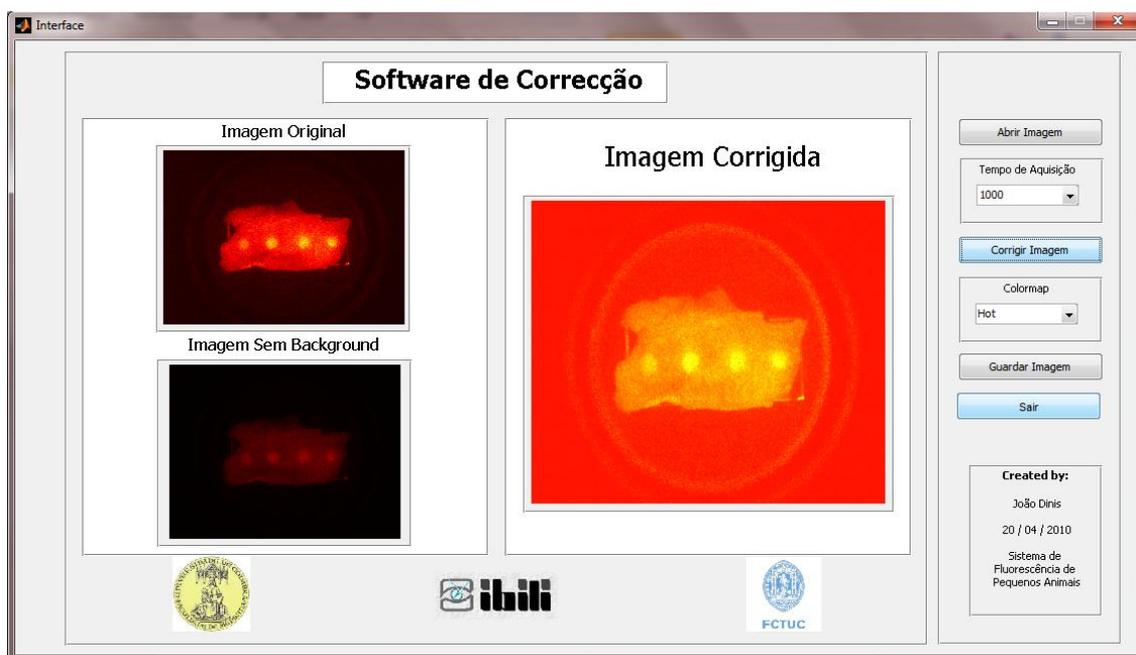


Figura 6.8 - Exemplo da correcção de uma imagem usando o software de correcção

6.3 Resultados e Desempenho

Nesta secção, são apresentados os resultados do teste de desempenho do *software* de correcção de iluminação. O desempenho de correcção é avaliado

calculando a não-linearidade do sistema antes e depois da aplicação da matriz de correcção.

Para estes testes foram adquiridas 13 imagens (6 por cada disposição mais uma imagem de fundo) em iguais condições de iluminação, ganho no intensificador, ganho no *software* (*Wasabi*), abertura do diafragma da e mesmo tempo de exposição.

Como fantoma de testes foi utilizada uma caixa de plástico com 6 poços de tamanho semelhante (diâmetro e profundidade). Estes poços foram preenchidos com aproximadamente o mesmo volume de uma solução de fluoresceína, fazendo-se variar a concentração em cada um dos poços, desde 0 ng/ml até 75 ng/ml. Na figura 6.9 apresenta-se um esquema que nos permite uma melhor percepção do fantoma utilizado.

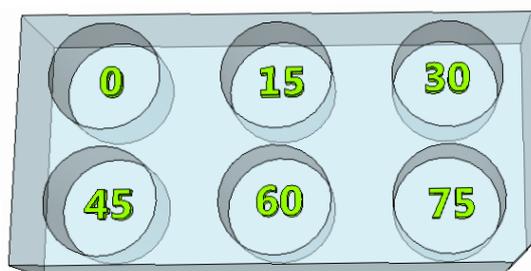


Figura 6.9 - Representação do fantoma de testes utilizado (valores de concentração de fluoresceína em ng/ml)

Os testes foram efectuados usando duas disposições diferentes. Estas duas situações estão representadas na figura 6.10:

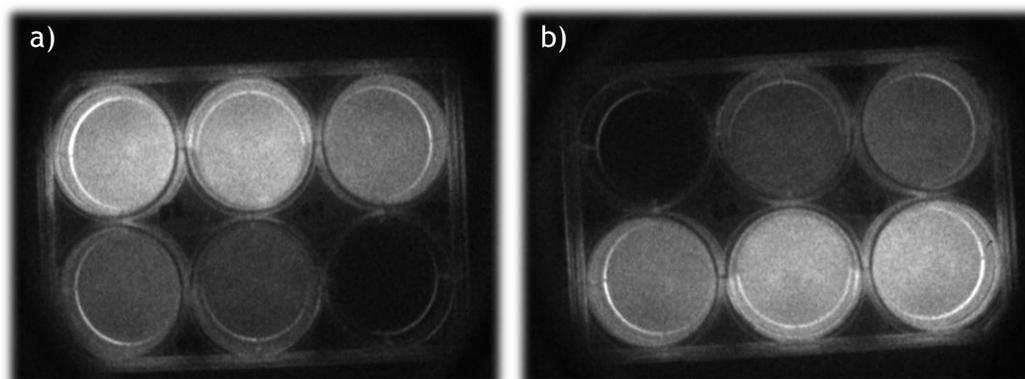


Figura 6.10 - a) Poços de fluoresceína Situação 1; b) Poços de fluoresceína Situação 2

Das 6 imagens adquiridas em cada uma das situações, foram obtidas duas imagens após um pré-processamento usando o *media_imagens.m*. Estas imagens foram as usadas na primeira parte dos testes.

Considerou-se um círculo de 150 pixels de diâmetro estando apresentados em baixo os dados obtidos para cada uma das situações. No Anexo A é possível visualizar com mais pormenor os dados obtidos, com gráficos de distribuição, mínimos e máximos de contagens.

Situação 1:

Na tabela 6.2 são apresentados os resultados obtidos:

Concentração (ng/ml)	Contagens de fluorescência (valor médio)	Contagens de fluorescência (valor ajustado)	Diferença Absoluta	Não-linearidade
0	381,376	372,02	9,356	
15	950,079	879,02	71,059	
30	1217,989	1386,02	168,03	
45	1812,719	1893,02	80,301	
60	2733,852	2400,02	333,832	12,21%
75	2741,196	2907,02	165,824	

Tabela 6.2 - Análise de não-linearidade relativa à situação 1 sem correcção

No gráfico 6.2 é apresentada a linha de regressão obtida no Excel® 2010:

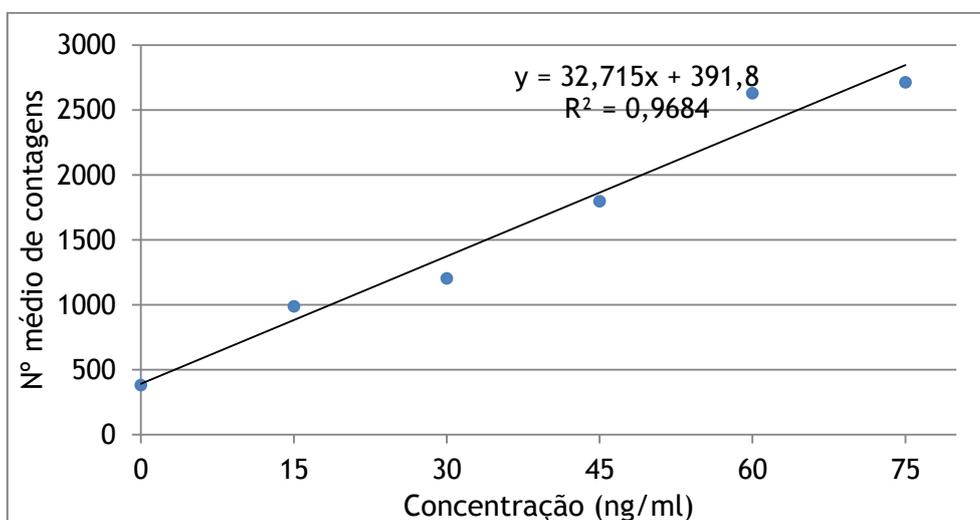


Gráfico 6.2 - Linha regressão - Situação 1 sem correcção

Nesta situação obtemos um erro de não linearidade de 12,21%. Este valor corresponde à maior diferença absoluta entre um valor experimental e o correspondente valor obtido a partir da recta de ajuste, calculado pelo método dos mínimos quadrados, expresso como percentagem do valor experimental. Neste caso a maior diferença ocorre para o poço que contém a solução de fluoresceína com a concentração de 60 ng/ml.

Em seguida será feito exactamente o mesmo tratamento de dados para a segunda situação, que varia da primeira apenas na ordem dos poços de fluoresceína.

Situação 2:

Na tabela 6.3 são apresentados os resultados obtidos:

Concentração (ng/ml)	Contagens de fluorescência (valor médio)	Contagens de fluorescência (valor ajustado)	Diferença Absoluta	Não-linearidade
0	380,839	391,8	10,961	
15	988,135	882,525	105,61	
30	1203,645	1373,25	169,605	
45	1797,459	1863,975	66,516	
60	2628,976	2354,7	274,276	10,43%
75	2712,665	2845,425	132,76	

Tabela 6.3 - Análise de não-linearidade relativa à situação 2 sem correcção

No gráfico 6.3 é apresentada a linha de regressão obtida no Excel® 2010:

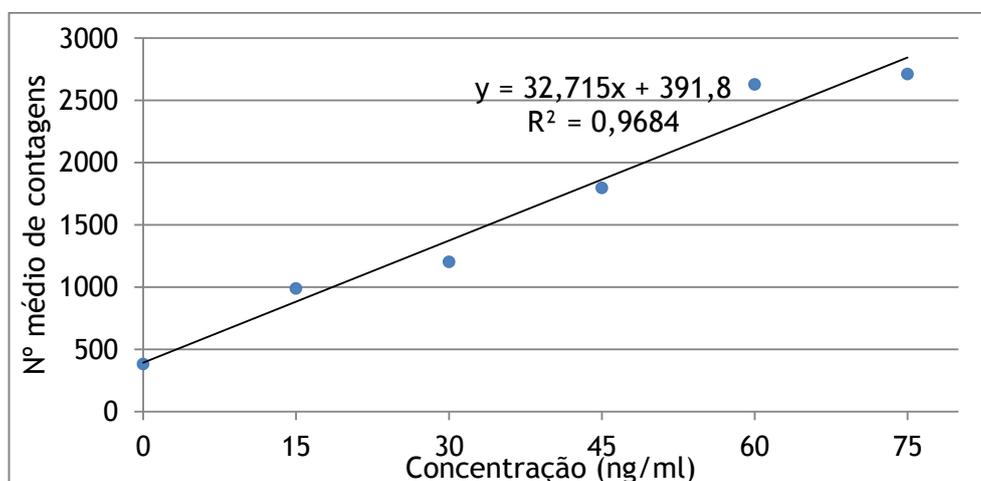


Gráfico 6.3 - Linha regressão - Situação 2 sem correcção

Podemos observar que os valores obtidos quer na situação 1 quer na situação 2 são semelhantes, obtendo-se contudo uma não linearidade inferior no segundo caso (10,43 %).

Concentração (ng/ml)	Número médio de contagens - Situação 1	Número médio de contagens - Situação 2	Diferença Absoluta	Não-linearidade
0	381,376	380,839	0,537	0,14%
15	950,079	988,135	38,056	3,93%
30	1217,989	1203,645	14,344	1,18%
45	1812,719	1797,459	15,26	0,85%
60	2733,852	2628,976	104,876	3,91%
75	2741,196	2712,665	28,531	1,05%

Tabela 6.4 - Comparação do número de contagens após a correcção para cada um dos poços

Se compararmos o número de contagens em cada um dos poços para cada uma das situações observamos que existe uma diferença bastante baixa entre o número de contagens em cada um dos poços. Esta diferença atinge o valor máximo no poço de 60 ng/ml (3,91%).

Apresentam-se em seguida os resultados obtidos após processamento das imagens com o *software* de correcção. De referir que foram adquiridas imagens de fundo na mesma altura em que as imagens de teste foram adquiridas, nas mesmas condições de ganho e tempo de aquisição. Desta forma podemos fazer uma correcção muito mais exacta do que utilizando o fundo predefinido no *software*.

Situação 1:

Na tabela 6.5 são apresentados os resultados obtidos:

Concentração (ng/ml)	Contagens de fluorescência (valor médio)	Contagens de fluorescência (valor ajustado)	Diferença Absoluta	Não-linearidade
0	666,773	601,72	65,053	
15	1492,381	1377,37	115,011	
30	1957,808	2153,02	195,212	
45	2714,645	2928,67	214,025	
60	3932,567	3704,32	228,247	5,80%
75	4480,801	4479,97	0,831	

Tabela 6.5 - Análise de não-linearidade relativa à situação 1 corrigida. Erro de não linearidade de 5,80 %.

No gráfico 6.4 é apresentada a linha de regressão obtida no Excel® 2010:

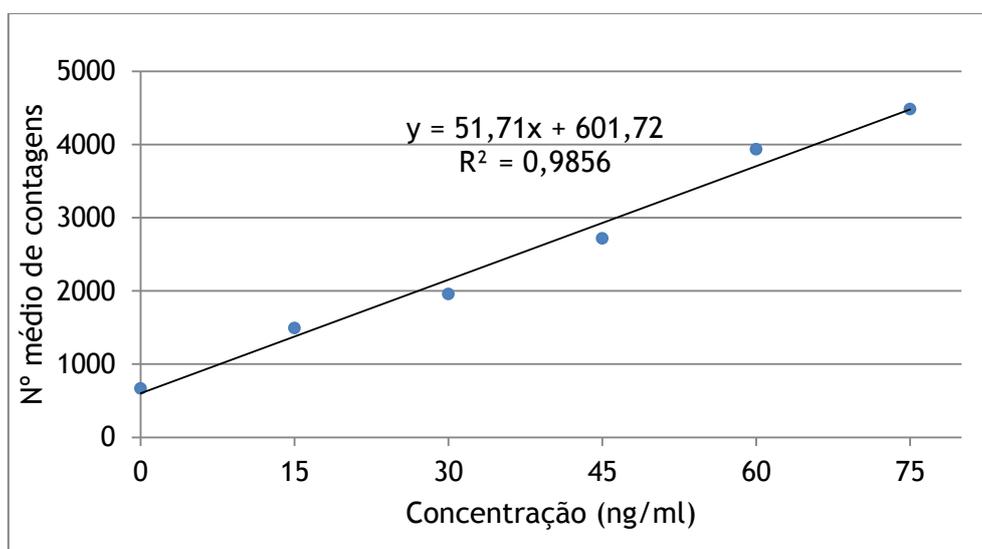


Gráfico 6.4 - Linha regressão - Situação 1 com correcção

Em seguida faz-se exactamente o mesmo processamento de dados para a segunda situação, que varia da primeira apenas na ordem dos poços de fluoresceína.

Situação 2:

Na tabela 6.6 são apresentados os resultados obtidos:

Concentração (ng/ml)	Contagens de fluorescência (valor médio)	Contagens de fluorescência (valor ajustado)	Diferença Absoluta	Não-linearidade
0	693,999	729,21	35,211	
15	1584,121	1438,80	145,321	
30	2055,045	2148,39	93,345	
45	2673,608	2857,98	184,372	
60	3811,126	3567,57	243,556	6,39%
75	4201,193	4277,16	75,967	

Tabela 6.6 - Análise de não-linearidade relativa à situação 1 corrigida. Erro de não linearidade de 5,80 %.

No gráfico 6.5 é apresentada a linha de regressão obtida no Excel® 2010:

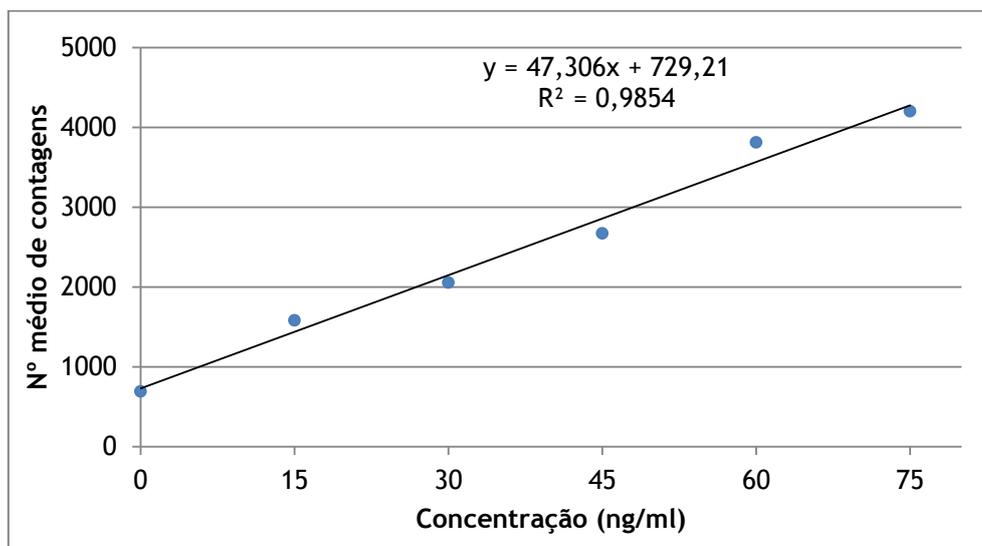


Gráfico 6.5 - Linha regressão - Situação 2 com correcção

Observa-se uma clara melhoria, isto é, uma diminuição do erro de não linearidade em ambas as situações. Nas situações 1 e 2 observamos um erro de não linearidade de 5,80 % e de 6,39 % respectivamente. Desta forma diminui-se para cerca de metade o erro de não-linearidade associado à recta de regressão.

Concentração	Situação 1	Situação 2	Diferença Absoluta	Diferença / Média
0	666,773	693,999	27,226	4,00%
15	1492,381	1584,121	91,740	5,96%
30	1957,808	2055,045	97,237	4,85%
45	2714,645	2673,608	41,037	1,52%
60	3932,567	3811,126	121,441	3,14%
75	4480,801	4201,193	279,608	6,44%

Tabela 6.7 - Comparação do número de contagens após a correção para cada um dos poços

Se compararmos o número de contagens para cada um dos poços em cada uma das situações podemos observar um ligeiro aumento na diferença entre o número de contagens nos poços. Esta diferença atinge o valor máximo no poço de 75 ng/ml (6,44 %).

7. Fantoma

Os fantasmas em imagiologia, são objectos especialmente projectados e concebidos para testes com o intuito de avaliar, analisar o desempenho e configurar vários dispositivos imagiológicos. (37)

A utilização deste tipo de artefactos tem como vantagens a fácil acessibilidade e disponibilidade para utilização, e principalmente, evitar utilizar e sacrificar animais sempre que se deseja executar um procedimento. Outra das vantagens é a possibilidade de obtermos resultados consistentes ao longo do tempo, pelo facto de se testar sempre com o mesmo elemento de estudo, algo que não aconteceria caso se usassem diferentes animais. Numa fase de desenvolvimento de um sistema de imagiologia como o nosso, fazer-se uma comparação de resultados e ter-se uma noção da evolução e da melhoria do mesmo, é essencial.

Historicamente, numa fase inicial, os fantasmas foram usados em sistemas de imagiologia a 2 dimensões, como por exemplo em raios-X. Mais recentemente têm sido desenvolvidos fantasmas avançados, para testes com técnicas de imagiologia a 3 dimensões como, MRI, CT, ultra-sons e PET.

Sendo um dos principais objectivos dos fantasmas a substituição de elementos de estudo reais, como por exemplo pequenos animais, é necessário que possuam características que lhe permitiam simular tão bem como possível a resposta do elemento real, quando expostos a condições semelhantes de teste. Por exemplo, fantasmas desenvolvidos para radiografias a 2 dimensões, devem conter várias quantidades de agentes de contraste com propriedades de absorção similares ao tecido humano. Neste caso, aspectos como textura do tecido ou propriedades mecânicas, não são tão relevantes como nos fantasmas para imagiologia por ultra-sons. (37)

O fantoma desenvolvido para o nosso sistema de imagiologia, tem como principal objectivo a medição de diferentes concentrações de fluoresceína, a várias profundidades. É importante que permita a introdução de líquidos e géis, em zonas

inferiores e superiores aos poços, de forma a mimetizar da melhor forma a interacção da luz com os tecidos biológicos de um pequeno animal. O material de construção deveria absorver pouca luz, para os comprimentos de onda de interesse (excitação e emissão) preferencialmente barato e de fácil manuseamento, que facilitasse a construção.

Nas secções seguintes serão apresentados os vários passos do desenvolvimento do fantoma, como a sua concepção, escolha do material, líquidos/géis de teste, e a sua construção.

7.1 Projecto do Fantoma

Como ferramenta para o projecto do fantoma foi utilizado o Google SketchUp Pro v7.0. Este *software* permite-nos criar, de uma forma simples e intuitiva, modelos 3D, bem como visualizar o fantoma de todos os ângulos possíveis, dando uma importante percepção do mesmo, à medida que vai sendo desenvolvido.

Foram testadas várias abordagens que são apresentadas na próxima secção deste capítulo. Será feita uma breve descrição do conceito de cada uma das possibilidades e das suas vantagens e desvantagens. No final, será apresentado o projecto escolhido para o fantoma.

7.1.1 Fantoma Escada

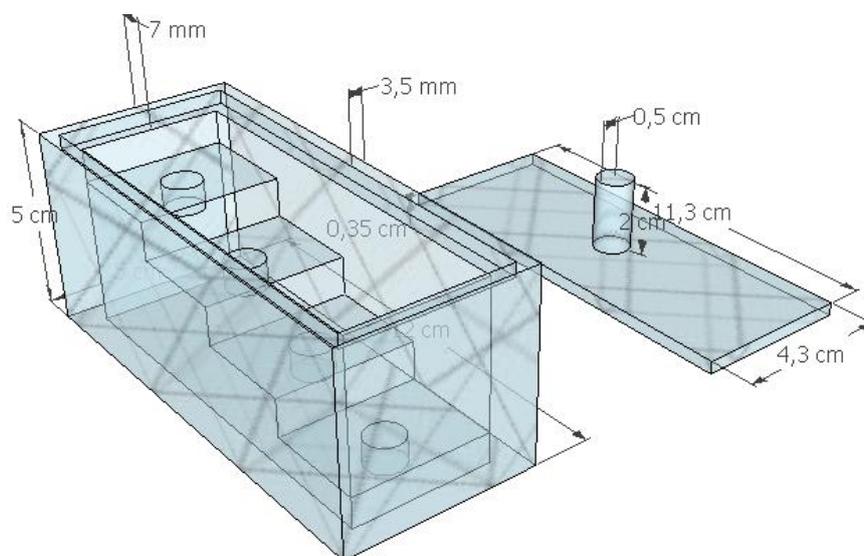


Figura 7.1 - Representação do fantoma em escada.

Este fantoma permitiria o estudo de várias concentrações de fluoresceína a diferentes profundidades, mas não o estudo de diferentes concentrações à mesma profundidade. Outra das desvantagens era a impossibilidade de colocação de líquido ou de gel em profundidades superiores às dos poços, pois todo este volume seria preenchido pelo material do fantoma. Para além destes aspectos a quantidade de material necessário à construção do fantoma seria excessivo, ocupando cerca de metade do volume total do fantoma, o que poderia interferir com as características ópticas do mesmo.

7.1.2 Fantoma com Buraco

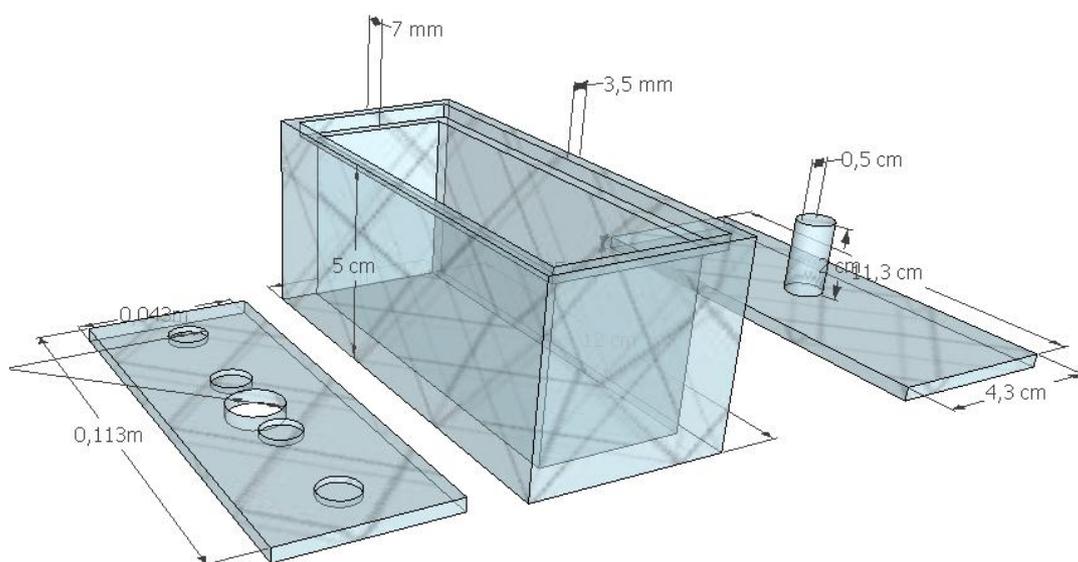


Figura 7.2 - Fantoma com buraco na zona central

Este projecto apresenta algumas vantagens relativamente ao anterior. Para além da quantidade de material necessária à construção ser muito menor, permitiria a introdução de líquido/gel a profundidades superiores às dos poços. Como desvantagens, não é possível medir diferentes concentrações simultaneamente, nem possibilita o estudo a diferentes profundidades.

7.1.3 Fantoma Escada 2.0

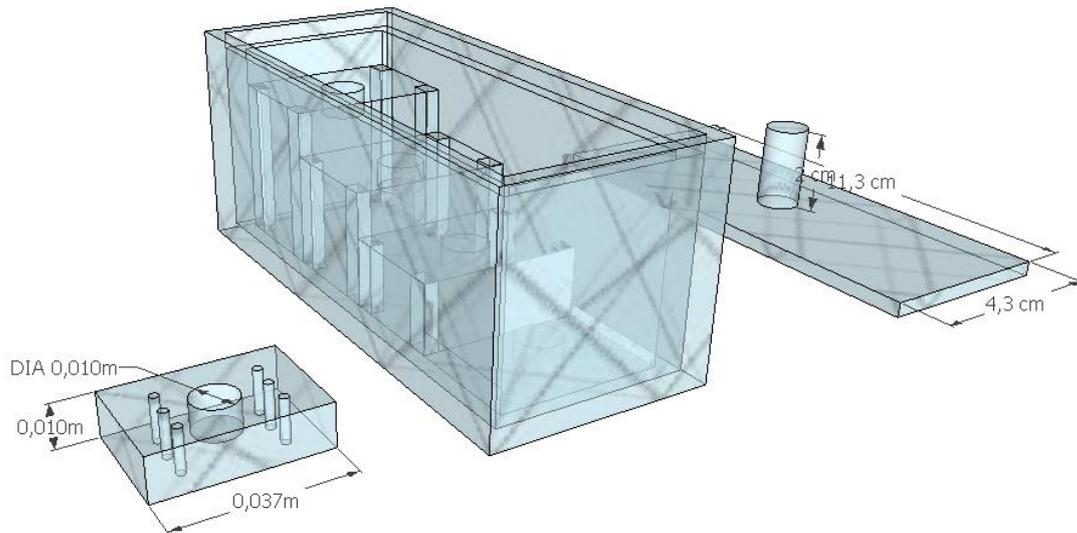


Figura 7.3 - Representação da segunda versão do fantoma em escada.

Este fantoma parte do mesmo princípio do fantoma de escada, mas com uma outra abordagem pretendendo ser visto como uma evolução do primeiro. Possibilita a introdução de líquidos quer em baixo, quer em cima dos poços. O volume de material utilizado para construção é menor, mas devido à sua complexidade, a sua construção torna-se praticamente impossível para alguém com pouca experiência em construções deste tipo.

7.1.4 Fantoma com Sistema de Gavetas

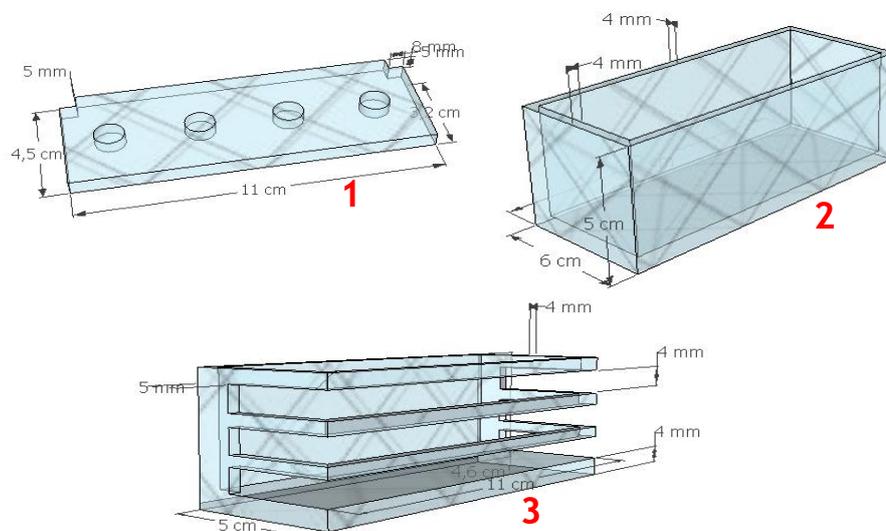


Figura 7.4 - Fantoma com sistema de gavetas

Esta foi a solução final encontrada para o fantoma. Um sistema composto por 3 peças distintas, facilitando assim a sua construção. A peça 1 é composta por 4 poços equidistantes, possibilitando assim o estudo em simultâneo de 4 concentrações diferentes de fluoresceína. A peça 2 é a caixa que servirá de albergue para o líquido utilizado no decorrer dos testes. Por fim aquela que apresenta uma maior complexidade de construção, será a peça 3, a peça “gaveta”. Serve de suporte para a peça dos poços, permitindo o seu encaixe a 4 profundidades diferentes (3 gavetas + peça colocada no topo). Desta forma conseguimos conciliar todas as características do fantoma inicialmente propostas, sendo possível realizar com facilidade testes a várias profundidades e com várias concentrações.

As peças do fantoma foram cortadas individualmente, de forma a facilitar a sua colagem. A colagem das peças foi feita com clorofórmio. Este actua nas peças que se desejam colar, corroendo-as e fazendo com que as partes em contacto se misturem. Desta forma mantem-se a transparência na zona de colagem, dando assim o aspecto de uma peça única, sem restos ou vestígios de cola.

Na figura 7.5 podemos visualizar o resultado final da construção, bem como cada uma das peças individualmente.

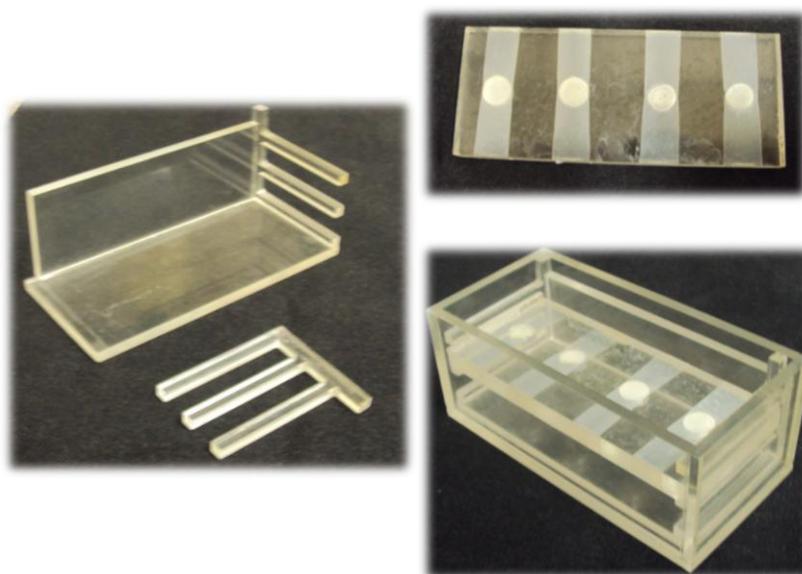


Figura 7.5 - Fotografias do fantoma. Peças individualmente e o fantoma pronto a ser testado

7.2 Acrílico

O material escolhido para a construção do fantoma foi o polimetil-metacrilato, mais conhecido como acrílico. Pertence à família dos polímeros termoplásticos, que são materiais sintéticos que quando sujeitos à acção do calor, facilmente se deformam podendo ser moldados e novamente solidificados, mantendo a sua nova estrutura.

Algumas das suas principais vantagens são a sua reciclabilidade, rigidez, leveza, alta resistência e, principalmente a facilidade com que podem ser trabalhados, bem como o seu baixo custo (38). Possuem ainda uma elevada resistência a ácidos orgânicos pouco concentrados e óleos minerais (39). É um dos materiais que melhor transmite a luz, tendo uma transmitância de cerca de 92 %, para os comprimentos de onda que utilizamos neste projecto. (40) Todas estas características fazem do acrílico um dos materiais mais utilizados na construção de fantomas para imagiologia. (41) (42) (43)

Outras das possibilidades para a construção do fantoma seria o vidro. Contudo, apresenta uma série de desvantagens relativamente ao acrílico como o facto de ser muito mais denso (2400 a 2800 kg/m³ contra os 1150 a 1190 kg/m³ do acrílico) e ter um menor ponto de impacto, o que poderia levar a que se fragmentasse quando da construção. Tal não sucede com o acrílico que, apesar de ser partido em grandes blocos, não se fragmenta. A principal desvantagem do vidro, relativamente ao acrílico é a dificuldade em moldá-lo, cortá-lo e montá-lo segundo um projecto previamente definido. Apesar de não ser uma peça extremamente complexa, exige ainda assim um certo grau de pormenor, que é muito mais facilmente obtido com o acrílico.

8. Propriedades Ópticas dos Fluídos de Teste

O cálculo dos coeficientes de absorção e de dispersão dos líquidos a serem utilizados como simuladores dos tecidos dos animais, não era um dos objectivos inicialmente propostos na apresentação do projecto. Contudo uma avaliação rigorosa da adequação do sistema para imagiologia de fluorescência em pequenos animais implica fantasmas com propriedades ópticas representativas dos tecidos de tais animais. Embora, como foi dito, a planificação inicial do projecto não incluísse estes estudos, por se considerar que não poderiam ser realizados em tempo útil, acabou por ser possível avançar algum trabalho neste tema, trabalho esse aqui apresentado.

Uma das substâncias mais utilizadas para simular as propriedades ópticas dos tecidos biológicos, em estudos com fantasmas, é o Intralípido, um nutriente intravenoso utilizado em unidades de saúde, composto por micelas de fosfolípidos e água. É bastante utilizado em experiências de dosimetria de luz, pois para além de ter pouca absorção de luz na zona do visível, é relativamente barato e de fácil aquisição. (44)

Para a medição das propriedades ópticas dos líquidos de teste, nomeadamente dos coeficientes de absorção e de dispersão, tivemos como base o procedimento utilizado por Elizabeth M. C. Hilman, descrito na sua tese de doutoramento *“Experimental and theoretical investigations of near infrared tomographic imaging methods and clinical applications”*.

8.1 Cálculo do Coeficiente de Absorção

Para o cálculo do coeficiente de absorção de uma solução não dispersora, pode-se recorrer à equação de Beer-Lambert:

$$I = I_0 \times e^{-u_a x}$$

em que, I é a intensidade de luz num ponto a uma distância x da fonte, I_0 é a intensidade inicial de luz e u_a o coeficiente de absorção da solução.

O arranjo experimental empregue para medir a variação da intensidade I com a distância x , está representada na figura 8.1. A luz emitida por uma fonte (LEDs, por exemplo) passa pelo cilindro de vidro e entra na esfera integradora, onde é distribuída de forma uniforme na superfície interna da esfera, de tal forma que uma fibra montada na parede adquira uma fracção constante da luz. A fibra transporta a luz para um espectrómetro, onde é registado o espectro da luz. Uma bomba de infusão permite uma adição de amostra a um fluxo constante e bem definido.

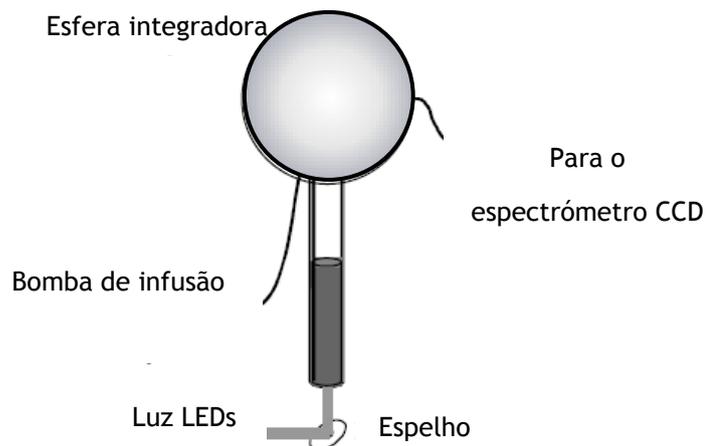


Figura 8.1 - Arranjo experimental para o cálculo do coeficiente de absorção

A expressão que permite a conversão do tempo em distância é dada por:

$$\frac{1}{x} = \frac{1}{\text{tempo}} \times \frac{\text{área superfície}}{\text{fluxo}}$$

O coeficiente de absorção poderia ser facilmente obtido através da análise da variação do logaritmo da intensidade com a distância.

Esta experiência não foi concluída pelo facto de não ter sido possível a obtenção de uma esfera integradora em tempo útil.

8.2 Cálculo do Coeficiente de Dispersão

Se considerarmos uma solução dispersora, é possível representar a variação da intensidade da luz com a distância por uma expressão análoga à lei de Beer-Lambert,

desde que se utilize o coeficiente efectivo de atenuação, que combina os efeitos dos processos de absorção e de dispersão. Assim,

$$I = I_0 \times e^{-u_{eff}x}$$

$$u_{eff} = \sqrt{3u_a(u_a + u'_s)}$$

onde, u_{eff} é o coeficiente de atenuação efectivo, u_a o coeficiente de absorção e u'_s o coeficiente de dispersão.

Para que estas expressões sejam aplicáveis, tem que se mimetizar um meio infinito onde a luz se propague. Isto é conseguido iluminando a superfície frontal de uma caixa de acrílico (no nosso caso) com luz branca colimada e revestindo as paredes internas da caixa revestidos com papel de alumínio. Tal faz com que a luz incidente nas paredes laterais seja totalmente reflectida (na prática o papel de alumínio não um reflector perfeito) para o interior da caixa, simulando um meio de extensão infinita. No topo do tanque existe uma peça baseada num parafuso sem fim, que permite posicionar, de forma precisa um detector de luz, ao longo do eixo da caixa paralelo à direcção de incidência da luz. O detector está colocado dentro do líquido cujas propriedades ópticas se pretendem medir, equidistante às paredes da caixa. São feitas medições enquanto o detector se movimenta em direcção ao fundo da caixa (com o auxílio do actuador linear de passo, que nos permite movimentos rigorosos). Assim que o limite de detecção de fotões é atingido, o detector retorna à posição inicial de forma a obter uma repetição das medições. O esquema da experiência pode ser observado na figura 8.2.

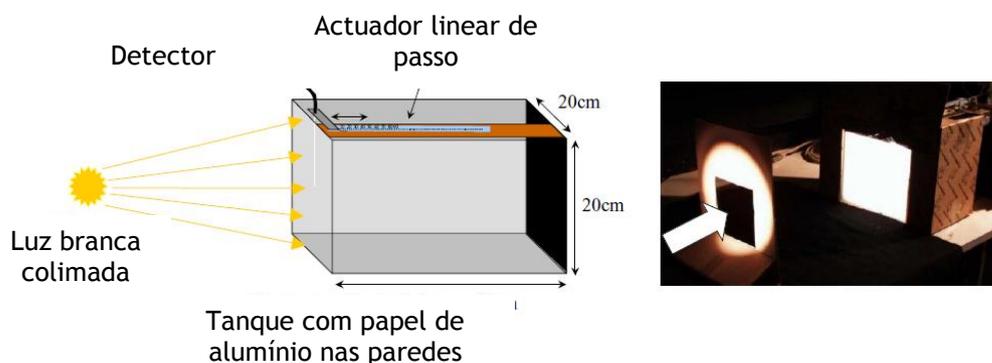


Figura 8.2 - Arranjo experimental para a medição do coeficiente de dispersão

A partir do logaritmo da intensidade em função da distância, conseguimos facilmente obter o valor de u_{eff} .

Um dos métodos para determinar u_a e u'_s de um líquido envolve a adição constante de fracções de corante para uma solução dispersora, medindo o u_{eff} após cada adição, e resolvendo para u'_s e Δu_a para os valores medidos de u_{eff} . A forma como tal é feito ainda não está completamente clarificada, sendo necessário um estudo mais profundo desta situação.

8.2.1 Motor de Passo

Para a movimentação da sonda do detector, dentro da caixa de acrílico, decidiu-se utilizar actuador linear de passo, que não é nada mais nada menos que motor de passo acoplado a um parafuso sem fim. Este parafuso passa no eixo do motor, fazendo com que este se movimente ao longo do eixo do parafuso.

Os motores de passo são dispositivos electromecânicos, que podem ser controlados digitalmente através de um conjunto *hardware-software* específico (45). Uma das principais razões da sua popularidade é a capacidade de produzir, com elevada precisão, deslocamentos angulares discretos ($1,8^\circ - 90^\circ$). São amplamente utilizados na construção de mecanismos que requeiram precisão em aplicações de posicionamento, tais como *scanners*, *plotters*, impressoras e robôs (45).

Quando o motor recebe um impulso de corrente, o eixo do motor (rotor) roda um pequeno ângulo (passo), permanecendo estável nessa posição, se mais nenhum impulso for aplicado. Estes impulsos desempenham um papel fulcral nas funções do motor pois controlam parâmetros como o sentido da rotação (sentido da corrente de impulso), a velocidade de rotação (frequência com que estes impulsos são enviados) e o número total de rotações do motor (número de impulsos enviados).

Para esta aplicação usou-se um motor de passo unipolar de 4 fases (*RS 318-705*), que tem uma tensão de alimentação de 12 V e um passo de 0,05 mm (distância que o motor percorre no parafuso sem fim, se este estiver preso nas duas extremidades).

Nos motores unipolares a corrente pode fluir nos dois sentidos, permitindo rotação nos dois sentidos (horário e anti-horário).

O funcionamento básico de um motor de passo é explicado pela utilização de bobinas alinhadas em pares, que quando activadas atraem o rotor do motor, fazendo-o alinhar com o eixo determinado pelas bobinas, causando uma pequena variação de ângulo (passo). A activação de uma bobina de cada vez produz um pequeno deslocamento, pelo facto do rotor ser magneticamente activo. Essa activação das bobinas cria um campo magnético que obriga o rotor a alinhar com as bobinas. Desta forma, polarizando adequadamente as bobinas, podemos movimentar o rotor entre elas (meio-passo) ou alinhado com as mesmas (passo-completo). No nosso caso usou-se passo completo para movimentar o rotor. (46)

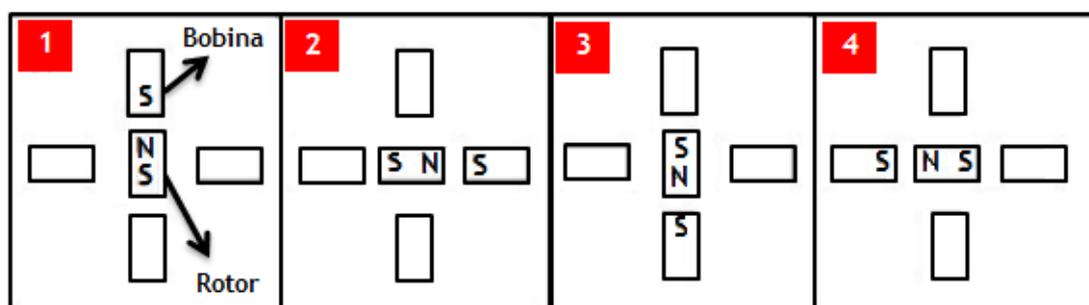


Figura 8.3 - Funcionamento em passo completo de um motor unipolar (46)

Para que o rotor execute os passos, cada bobina tem que ser activada segundo uma determinada sequência (tabela 8.1). Ao inverter-se a sequência dos impulsos, é alterado o sentido de rotação do rotor.

Passo	$\Phi 1$	$\Phi 2$	$\Phi 3$	$\Phi 4$
1	1	0	0	0
2	0	1	0	0
3	0	0	1	0
4	0	0	0	1

Tabela 8.1 - Ordem de activação das bobinas. Valor 1 representa que a bobina está activada. Valor 0 representa que a bobina não está activada.

8.2.1.1 Controlador de Motor de Passo

Para o controlo dos motores de passo necessitamos de activar sequencialmente e repetitivamente os vários terminais dos motores. Uma das formas mais simples de o fazer é, utilizando como interface com o computador, a porta paralela. Contudo, necessitamos de um circuito que permita aumentar a potência de saída do computador, pois esta é de apenas de 5 V a 25 mA, o que não é suficiente para pôr o motor em funcionamento. O motor está projectado para ser alimentado por uma tensão de 12 V e tem resistência interna de 84 Ω . De acordo com a lei de Ohm o motor consome uma corrente de 140 mA. Por esta razão podemos utilizar o circuito integrado *ULN2003*, um *driver* de potência, com saídas de par *Darlington*³ em colector aberto. Este circuito trabalha com tensões até 50 V e suporta uma corrente até 500 mA. Possui 7 entradas TTL que podem controlar um máximo de 7 saídas de *Darlington*. Figura 8.4 mostra um esquema do *driver* de potência *ULN2003A*.

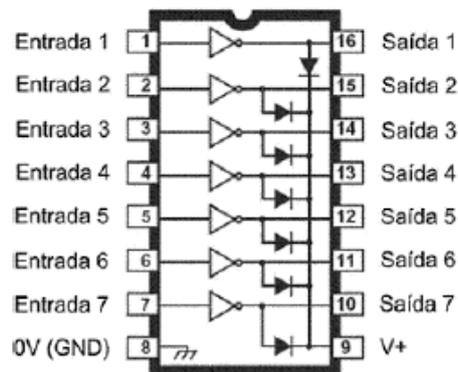


Figura 8.4 - Driver de potência *ULN2003A*. Entradas dos pinos 1 a 7 e saídas dos pinos 16 a 10. Pino 8 é a terra e pino 9 a alimentação de 12 V. É ainda utilizado um diodo de Zener na saída do alimentador para estabilizar a tensão de saída.

No circuito usa-se também um *optocoupler* *ISP845*. É um dispositivo de acoplamento óptico, para transferir um sinal electrónico entre elementos do circuito, mantendo-os electricamente isolados. Desta forma garante-se uma protecção física entre o controlo e o motor. O fusível serve também para garantir a segurança do PC onde se controla o motor. Existe também um contador digital, cujo objectivo é

³ Estrutura composta por dois transístores bipolares (BJT), em que o emissor do primeiro transistor liga directamente à base do segundo transistor. O ganho de corrente do par *Darlington* é igual ao produto entre os ganhos de corrente de cada transistor individual.

sinalizar sempre que um passo é executado no motor. A pilha de 9 V fornece a tensão aos colectores dos transístores do *optocoupler*. Como apenas é necessária uma tensão de 6V (folha de especificações do *optocoupler*), utiliza-se um díodo de Zener para fazer a estabilização da tensão.

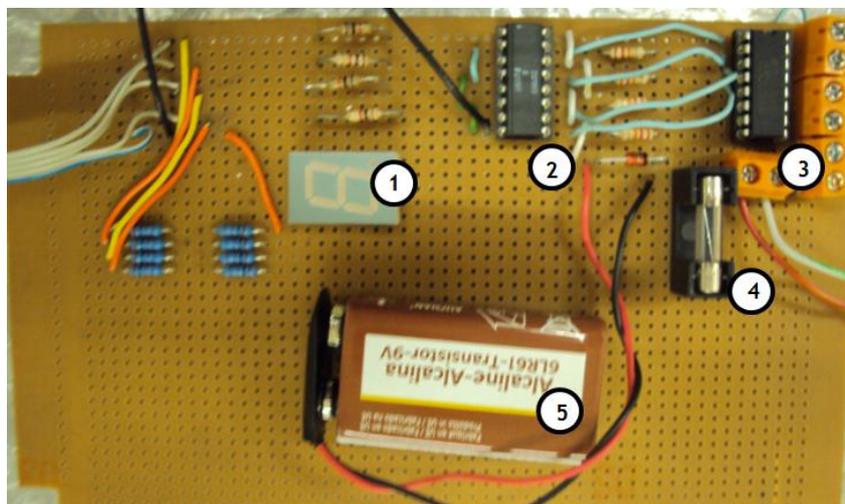


Figura 8.5 - Imagem da placa electrónica usada para controlar o motor de passo.
Legenda: 1 - Contador digital; 2 - Optocoupler; 3 - ULN2003A; 4 - Fusível; 5 - Pilha 9V

8.2.1.2 Software de Controlo do Motor de Passo

Foi desenvolvido, em *Matlab*, um *software* de controlo do motor de passo. Baseia-se no envio sequencial e repetido de impulsos através da porta LPT1 (porta paralela). Com este *software* é possível controlar a frequência a que os passos do motor são efectuados, a distância percorrida e o sentido da rotação. Na figura 8.6 está ilustrada a interface gráfica do controlador do motor de passo.



Figura 8.6 - Ilustração da interface gráfica do software de controlo do motor de passo.

8.3 Compostos para Simulação do Tecido Biológico

8.3.1 Intralípido

Para produzir o fantoma de teste é necessário utilizar um líquido que possui-se propriedades ópticas semelhantes às dos tecidos biológicos de um pequeno animal. Um dos líquidos amplamente usado neste tipo de sistemas (44) (47), é o intralípido. Segundo Stephen T. Flock et al (44), para uma amostra de intralípido com uma concentração de 10 %, e para comprimentos de onda na zona dos 490 nm, o coeficiente de absorção varia entre 0,015 a 0,001 cm^{-1} e o coeficiente de dispersão varia entre 92 e 50 cm^{-1} . Na tabela 8.2, podemos ver as propriedades ópticas de tecidos de pequenos animais. Os valores da tabela foram retirados de J F Beeky et al (48).

Tecido	Animal	$\mu_a (\text{cm}^{-1})$	$\mu'_s (\text{cm}^{-1})$
Fígado	Rato	3,8	13,0
Pulmão	Coelho	2,8	30,8
Músculo	Coelho	1,4	16,5
Pele	Coelho	0,94	40
Tumor	Rato	1,4	15,0

Tabela 8.2 - Propriedades ópticas de tecido biológico quando sujeitos a luz com comprimentos de onda de 633 nm.

Tendo em conta que estes valores são para um comprimento de onda superior que nós utilizamos, é de esperar que os coeficientes de absorção e dispersão na nossa situação sejam superiores aos apresentados na tabela. Desta forma, apesar de o intralípido ter valores de coeficiente de dispersão algo superiores e de coeficientes de absorção inferiores aos dos tecidos biológicos, podemos considerá-lo como uma boa base para o estudo do desempenho do nosso sistema.

Com os primeiros testes, deparou-se com algo que não era de todo expectável. Ao efectuarem-se os primeiros testes no fantoma, com a introdução do intralípido, verificou-se que não era possível distinguir as fontes de fluorescência do restante.

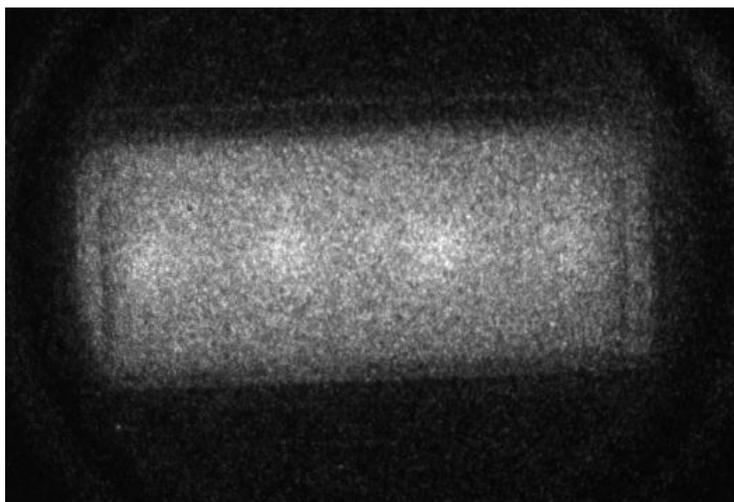


Figura 8.7 - Imagem adquirida de poços com fluoresceína com intralípido 2%. Ganho no software de 200 e ganho no MCP de 455.

Analisando a imagem adquirida, duas situações poderiam estar a ocorrer. Ou a luz de excitação reflectida pela amostra estaria a ser adquirida pela câmara, sendo que nesta situação o problema residiria nos filtros da câmara CCD, ou o intralípido estaria a emitir fluorescência na mesma banda de comprimentos de onda que a fluoresceína. Para esclarecer esta situação mediu-se o espectro de fluorescência do intralípido num espectrofotómetro *Shimadzu UV-2100* do Departamento de Química da Universidade de Coimbra⁴. O resultado está no gráfico 8.1.

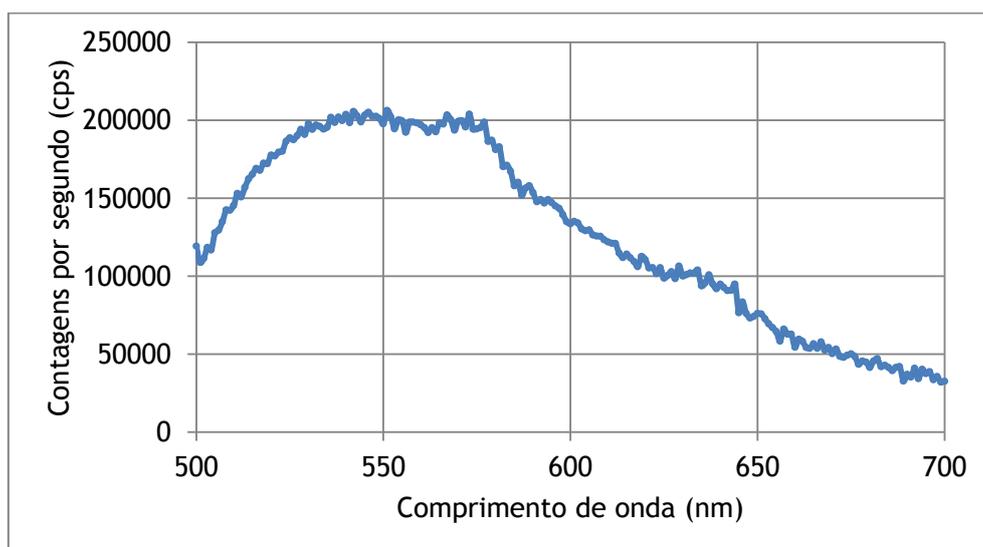


Gráfico 8.1 - Espectro de fluorescência do intralípido

⁴ Agradecimento ao Prof. Hugh Burrows por ter disponibilizado prontamente o espectrofotómetro.

Como é possível observar, o intralípido emite de facto fluorescência na zona dos 520 nm. A fluorescência diminui à medida que entramos na zona do vermelho e infra-vermelho. Assim, tornou-se obrigatório recorrer a outro composto para simular as propriedades ópticas de um pequeno animal, já que, nos comprimentos de onda com que trabalhamos, não é possível fazê-lo com intralípido.

8.3.2 Agarose

A agarose foi utilizada em estudos recentes (49), para simular as propriedades ópticas de pequenos animais. No trabalho aqui citado, a concentração de agarose utilizada não é descrita, sendo apenas apresentados o valor do coeficiente de dispersão (15 cm^{-1}) e do coeficiente de absorção de ($1,4 \text{ cm}^{-1}$), valores que estão de acordo com os apresentados na tabela 8.2. Nas figuras 8.8 e 8.9 estão os resultados dos testes efectuados com agarose com uma concentração de 5 %. Os valores dos coeficientes ópticos para esta concentração de agarose teriam que ser medidos, algo que não foi possível realizar em tempo útil. As imagens 8.8 e 8.9 apresentadas foram previamente processadas pelo *software* de correcção.

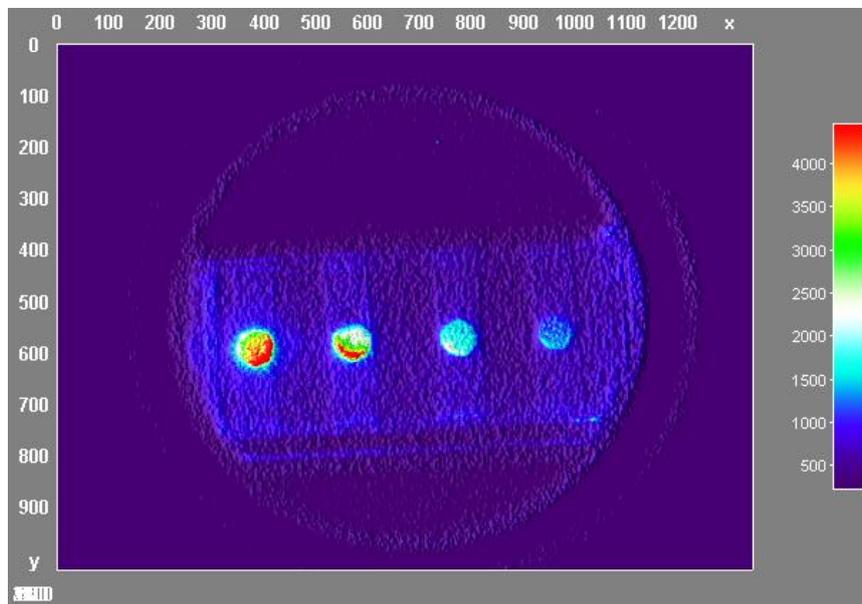


Figura 8.8 - Imagem dos poços de fluoresceína (concentrações de 1000, 500, 250 e 100 ng/ml) do fantoma em agarose. Ganho MCP=300. Tempo de aquisição=1000 ms. Primeira gaveta do fantoma. Já é possível observar-se alguma dispersão dos fótons

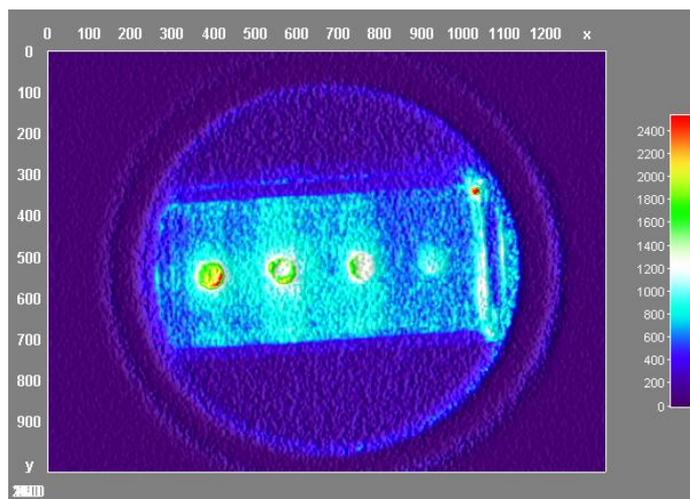


Figura 8.9 - Imagem dos poços de fluoresceína do fantoma em agarose. Ganho MCP=300. Tempo de aquisição=1000 ms. Segunda gaveta do fantoma. À medida que a profundidade dos poços aumenta, o efeito da dispersão é mais notório.

8.3.3 Testes com Tecidos Biológicos

Simulamos o tecido de um pequeno animal, utilizando um tecido biológico real: carne de peito de frango. O peito de frango é constituído essencialmente por músculo, e tem poucos vasos sanguíneos, servindo como um bom substituto do tecido biológico de um pequeno animal.

Para o primeiro teste, foi cortado um pedaço de frango com uma altura de aproximadamente 5 mm, e foi colocado sobre a peça que contém os poços de fluoresceína. O resultado do teste pode ser observado na imagem 8.10.

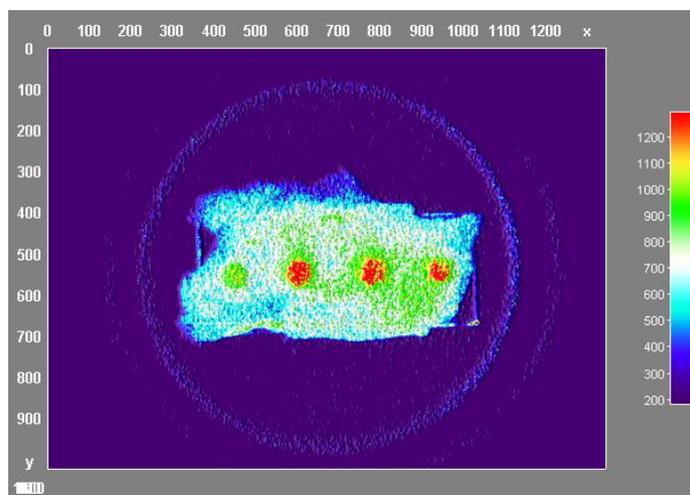


Figura 8.10 - Imagens adquiridas com o tecido biológico real (peito de frango). Os poços têm todos a mesma concentração de fluoresceína.

No segundo teste, utilizaram-se bolas de fluoresceína com concentrações desconhecidas (bolas de sílica Gel que foram embebidas numa solução de fluoresceína). As bolas de fluoresceína foram colocadas entre duas camadas de peito de frango. O resultado deste teste qualitativo pode ser observado na figura 8.11.

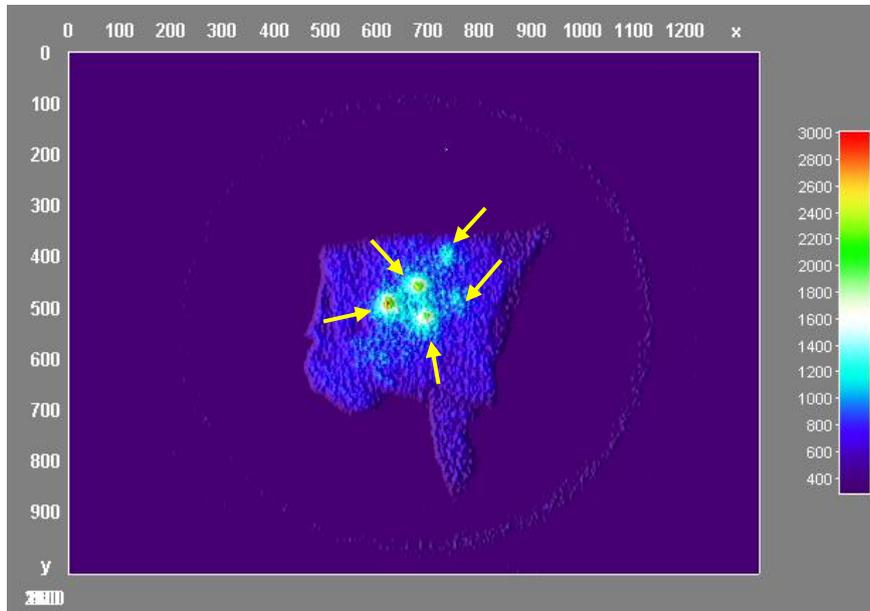


Figura 8.11 - Bife de peito de frango com bolas de fluoresceína dispersas aleatoriamente. Posições das bolas de fluoresceína assinaladas com setas amarelas

Em ambos os testes, o resultado obtido é extremamente satisfatório, pois é possível distinguir facilmente as fontes de fluorescência do restante tecido biológico. Enquanto que no primeiro teste é possível distinguir os quatro poços de fluoresceína, a duas profundidades distintas, no segundo teste apenas conseguimos observar, claramente 3 das 5 bolas de fluoresceína.

Observamos ainda que a dispersão e absorção dos fótons de fluorescência aumentam consideravelmente com a profundidade dos poços. Esse facto é observável através do número de contagens nos poços. Na primeira gaveta temos um máximo para o poço de 1000 ng/ml na ordem dos 4000, enquanto que a uma profundidade superior, esse poço apresenta contagens na ordem dos 2200, cerca de metade que na situação anterior.

9. Outlook do Projecto

O objectivo deste capítulo é fazer uma auto-reflexão de todo o processo de desenvolvimento do projecto, das dificuldades encontradas ao longo deste, e dos novos conhecimentos adquiridos.

A primeira tarefa que me foi proposta era encontrar uma solução que garantisse a melhor iluminação possível do sistema, isto é, uma iluminação o mais homogénea possível. Para tal, após pesquisa e estudo de várias possibilidades, adquiriram-se dois difusores, um para cada foco de iluminação. O passo seguinte seria a aquisição de filtros, quer de excitação, quer de emissão. Após o estudo das propriedades necessárias para cada um, fez-se a encomenda do material. Como é compreensível ficou-se um pouco dependente da chegada dos mesmos, pois o estudo do sistema de fluorescência não poderia ser iniciado enquanto não tivesse em mãos todo o material necessário. Pelo facto de a encomenda ter sido feita a uma empresa nos Estados Unidos, a *Omega Optical*, a encomenda chegou apenas 3 meses depois, nos inícios de Janeiro de 2010. Todas as burocracias inerentes à encomenda do material, resultaram num erro grave, tendo sido enviado apenas um filtro de emissão, quando tinham sido encomendados dois, um para cada foco de luz. O material completo chegou nos fins de Março, tendo sido finalmente possível, o início dos testes de iluminação do sistema. Durante o tempo de espera, fizeram-se alguns estudos acerca da possibilidade de se desenvolver um método/ algoritmo que permitisse a detecção da profundidade a que se encontravam as amostras do fluoróforo. Esta seria definitivamente uma mais-valia para o sistema. Contudo, verificou-se que tal seria impossível para o tipo de arquitectura que estaríamos a usar (iluminação de campo extenso), pois tal só seria possível com recurso a tomografia. A tomografia implica recurso a várias fontes ou vários detectores. Em Daria Comsa et al (50) (51) é utilizado um sistema de varrimento que simula várias fontes, sendo assim possível a medição da profundidade das amostras.

Durante este tempo de espera, iniciei os estudos para a correcção da não uniformidade das imagens, começando a desenvolver o *software* de correcção.

Com o início dos testes, deparei-me com alguns problemas relacionados com a detecção, como a existência do anel de fótons. Tal foi atenuado com a aplicação de um segundo filtro na câmara CCD.

Iniciei então o desenvolvimento do projecto do fantoma, com as várias possibilidades estudadas, escolha do projecto final, aquisição do material de construção e posterior montagem do mesmo. Esta foi uma fase desafiante, pois tinha pouca experiência neste tipo de construções. Simultaneamente iniciei a pesquisa de várias possibilidades de líquidos que pudessem mimetizar as propriedades ópticas dos tecidos dos pequenos animais. A opção mais utilizada em estudos do género, era o intralípido (44) (47), sendo por isso essa a escolha natural. Havia já sido utilizado em testes com este sistema de fluorescência, numa fase anterior a este projecto.

Após a construção do fantoma e da aquisição do intralípido, foi-me proposto que desenvolvesse uma experiência com o objectivo de calcular os coeficientes ópticos. Foi provavelmente a fase do projecto onde me foi exigido um maior grau de conhecimentos, pois foi-me proposto que utilizasse um motor de passo para a translação da peça no topo da caixa forrada a papel alumínio. Programei de raiz o controlador do motor de passo e desenvolvi grande parte da electrónica do mesmo, tendo apenas como base uma placa já existente no laboratório.

Tanto no cálculo do coeficiente de absorção como no de dispersão, por razões de tempo, não foi possível terminar a experiência. A dificuldade de obtenção de uma esfera integradora, no caso da experiência do cálculo do coeficiente de absorção, e o atraso, por parte das oficinas do Departamento de Física, na encomenda de uma peça de suporte do motor, não permitiram a conclusão da experiência. Contudo estando estes elementos na nossa posse, estão reunidas todas as condições para a execução dessa experiência.

O grande revés no projecto, foi a descoberta da impossibilidade do uso do intralípido para simular as propriedades ópticas do tecido de um pequeno animal. A experiência utilizada para o cálculo dos coeficientes ópticos foi projectada para ser usada no intralípido. Contudo pode ser facilmente adaptada para o estudo da agarose.

A fluorescência do intralípido na região dos 520 nm era uma situação totalmente imprevisível, pelo facto de ser este um líquido amplamente utilizado em sistemas do género, e de não se ter encontrado uma única referência ao fenómeno de fluorescência desta substância. Isto porque a grande maioria dos estudos publicados utilizarem comprimentos de onda na região do vermelho e do infra-vermelho.

De forma a provar o bom desempenho e a qualidade do sistema, fizeram-se testes com agarose e com carne de peito de frango, que sendo constituído em grande parte por músculo, simula bem o tecido encontrado nos pequenos animais.

Apesar de algumas dificuldades, foi um ano onde tive que desenvolver um trabalho autónomo e onde adquiri novos conhecimentos importantes, e apliquei na prática outros adquiridos em diversas cadeiras. Conhecimentos de electrónica, de óptica, de programação, de biologia entre outras áreas, foram necessários para o desenvolvimento deste projecto.

Não foi possível o teste com pequenos animais, pois estes testes estavam previstos para uma fase final do projecto, em que se tivesse a certeza do bom funcionamento do sistema, pois não iriam ser sacrificados animais caso estas condições não estivessem reunidas. Quando tal foi conseguido e provado, não foi possível, em tempo útil, arranjar animais, transfetar e injectar células tumorais e esperar que os tumores crescessem.

10. Conclusão e Trabalho Futuro

Apesar das dificuldades encontradas, podemos afirmar que os objectivos inicialmente propostos foram cumpridos com sucesso, já que se conseguiu desenvolver um sistema planar de imagiologia de fluorescência para pequenos animais baseado em iluminação LED.

Desta forma provamos que é possível desenvolver um sistema eficaz, com um custo relativamente baixo.

Mostrou-se que o *software* desenvolvido, diminui para metade o erro de não-linearidade associada à iluminação heterogénea do campo de visão da câmara.

Os fantasmas e os líquidos de teste foram de grande importância ao longo do desenvolvimento do sistema, pois permitiram mimetizar com bastante qualidade o tecido biológico de um pequeno animal.

Foi ainda possível adiantar algum trabalho relativamente ao cálculo dos coeficientes ópticos dos líquidos, que simulam o tecido biológico dos pequenos animais.

Num futuro próximo, seria de grande interesse concluir o estudo das propriedades ópticas da agarose, de forma a comprovar a sua utilidade como simulador do tecido biológico de pequenos animais. É ainda necessário concluir a avaliação e caracterização do sistema de imagiologia utilizando, como fonte do sinal de fluorescência, células tumorais transfetadas com GFP. Estes estudos deverão começar por ser feitos com células em cultura. Mais tarde, deverão ser feitos estudos em ratinhos onde tenham sido inoculadas células tumorais e desenvolvidos tumores que expressem a GFP. Outra das prioridades serão os testes do sistema com pequenos animais, principalmente ratos, pois são estes os mais utilizados em laboratório.

O desenvolvimento de um algoritmo mais eficaz, para a correcção das imagens, de forma a diminuir o erro de não-linearidade associado à iluminação heterogénea do campo de visão da câmara, será outra das missões futuras.

11. Referências Bibliográficas

1. Morgado, Miguel. *Proposta de Projecto - Sistema para Imagiologia de Fluorescência de Pequenos Animais*. Departamento de Física, IBILI. Coimbra : s.n., 2010.
2. Jason S. Lewis, d, S. Achilefub,d, J.R. Garbowc,d, R. Laforesta,d, M.J. Welchc,d,. *Small animal imaging: current technology and perspectives for oncological imaging*. 2002. pp. 2173-2188.
3. T. F. Budinger, 1 D. A. Benaron,2 and A. P. Koretsky3. *Imaging Transgenic Animals. Annual Revision Biomedical Engineering*. 1999, pp. 611-648.
4. Medcyclopedia. [Online] [Citação: 05 de 08 de 2010.] http://www.medcyclopaedia.com/library/topics/volume_i/p/pet_imaging.aspx.
5. University of Washington,. [Online] [Citação: 05 de 08 de 2010.] http://depts.washington.edu/nucmed/IRL/pet_intro/intro_src/section2.html.
6. Wikipedia. [Online] [Citação: 07 de 08 de 2010.] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:PET-schema.png>.
7. Spect.net. [Online] [Citação: 17 de Agosto de 2010.] <http://www.spect.net/>.
8. Ferreira, Nuno. *Apontamentos SPECT - Instrumentação em Imagiologia Médica*. Coimbra : s.n., 2009.
9. Stanford University,. [Online] [Citação: 17 de 08 de 2010.] http://mips.stanford.edu/aboutus/facilities/clark/sci3/images/ImtekSiemens_micro_SPECT-CT.jpg.
10. Arman Rahmim, Phd. *PET vs SPECT: In the Context of Going Developments*. 2006, Vol. 14.
11. Science Daily,. [Online] [Citação: 17 de 08 de 2010.] <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/06/100601101418.htm>.
12. Rochester Institute of Technology,. [Online] [Citação: 17 de 08 de 2010.] <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/inside.htm>.
13. Lori, Nicolas. *Apontamentos RMI - Aulas de Instrumentação em Imagiologia Médica*. Coimbra : s.n., 2008.
14. Tchepel, Vitaly Iourievitch. *Aponamentos CT - Aulas Instrumentação em Imagiologia Médica*. 2008.
15. Microphotonics. [Online] [Citação: 17 de 08 de 2010.] <http://www.microphotonics.com/skyscan/1076/1076.html>.

16. **Nature Journal**,. [Online] [Citação: 17 de 08 de 2010.]
http://www.nature.com/nature/journal/v463/n7283/fig_tab/463977a_T1.html (08-07-2010).
17. **Lakowicz, Joseph R.** *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Terceira Edição. s.l. : Springer.
18. **Department of Chemistry - Virginia Tech.** [Online] 18 de 08 de 2010.
<http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/quantum/graphics/jablon.gif>.
19. **IUPAC.** Franck-Condon Principle. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. 2nd Edition. 1997.
20. **Catherine Housecroft, Edwin Constable.** *Chemistry*. 4ª Edição. s.l. : Longman imprint, 2010. pp. 391, 392.
21. **The Florida State University.** [Online] [Citação: 18 de 08 de 2010.]
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/lightandcolor/index.html>.
22. **Griffin, Susan H. Cook and Diane E.** *Luciferase Imaging of a Neurotropic Viral Infection in Intact Animals*.. 2003, *Journal of Virology*, Vol. 77, pp. 5333-5338.
23. **Meng Yang et al.** *Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases*. 2000.
24. **In Vitro Gen**,. *In Vitro Gen*. [Online] [Citação: 18 de 08 de 2010.]
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Spectra.1300ph9.html>.
25. **Vasilis Ntziachristos et al**,. *Textbook of in vivo Imaging in Vertebrates*. s.l. : Wiley, 2007.
26. **Wolfhard Semmler, Markus Schwaiger.** *Molecular Imaging I*. s.l. : Springer, 2004.
27. **James Fujimoto, Daniel Farkas.** *Biomedical Optical Imaging*. s.l. : Oxford University Press, 2009.
28. **Global Spec**,. [Online] [Citação: 18 de 08 de 2010.]
http://www.globalspec.com/LearnMore/Optics_Optical_Components/Optical_Components/Optical_Diffusers.
29. **Thor Labs**,. [Online] [Citação: 18 de 08 de 2010.]
<http://www.thorlabs.com/catalogpages/v20/758.pdf>.
30. **Janesick, James R.** *Scientific Charge Coupled Devices*. s.l. : SPIE - The International Society for Optical Engineering, 2001.
31. **Morgado, Miguel.** *Aulas Optoelectrónica*. Coimbra : s.n., 2009.
32. **Barry Masteres, Peter So.** *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*. 2008.

33. Hamamatsu. [Online] [Citação: 22 de 08 de 2010.] <http://sales.hamamatsu.com/assets/pdf/hspdf/Wasabi.pdf>.
34. Image J,. [Online] <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/concepts.html>.
35. J.C. Mullikin, L.J. van Vliet, H. Netten, F.R. Boddeke, G. van der Feltz and I.T. Young. *Methods for CCD camera characterization*. H.C. Titus : A Waks, 1994, Image Acquisitions and Scientific Imaging Systems, Vol. 2173, pp. 73-84.
36. Universidade Minas Gerais. [Online] 22 de 08 de 2010. <http://www.mat.ufmg.br/gaal/matlab/matlab1.html>.
37. Iturralde, Mario P. *Dictionary and Handbook of Nuclear Medicine and Clinical Imaging*. 1990.
38. Lefteri, Christopher. *Plastics Handbook*. s.l. : Rotovision, 2010.
39. Dyna Laboratories Corp,. [Online] [Citação: 24 de 08 de 2010.] https://www.dynalabcorp.com/technical_info_acrylic.asp.
40. Altuglas International. *Plexiglas - Optical and Transmission Properties*. Philadelphia : s.n., 2000.
41. George A. Kastis, Member, IEEE, Lars R. Furenlid, Member, IEEE, Donald W. Wilson, et al. *Compact CT/SPECT Small-Animal Imaging System..* s.l. : IEEE, 2003.
42. Dinko E. González Trotter, PhD1, Ravindra M. Manjeshwar, PhD1, Mohan Doss, PhD2 et al. *Quantitation of Small-Animal 124I Activity Distributions Using a Clinical PET/CT Scanner*. New York : s.n., 2003, The Journal of Nuclear Medicine.
43. Anuradha Godavarty, Eva M. Sevick-Muraca, Margaret J. Eppstein. *Three-dimensional fluorescence lifetime tomography*. Vermont : s.n., Abril de 2005, Medical Physics, Vol. 32.
44. Stephen T. Flock, Steven L. Jacques et al. *Optical properties of intralipid: A phantom medium for light propagation studies*. 4, s.l. : Wiley, 2005, Lasers in Surgery and Medicine, Vol. 12, pp. 510-519.
45. Hughes, Austin. *Electric Motors and Drives*. Third edition. 2006.
46. Felipe Brites, Vinicius Santos. *Motor de Passo*. Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro : s.n., 2008.
47. Nikolai V. Slavine, Matthew A. Lewis, Edmond Richer and Peter P. Antichd. *Iterative reconstruction method for light emitting sources based*. 2005.
48. J F Beeky, P Blokland, P Posthumus, M Aalders, J W Pickering, H J C M Sterenborg and M J C van Gemert. *In vitro double-integrating-sphere optical properties of tissues between 630 and 1064 nm*. Laser Centre, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands : s.n., 1997.

49. Heiko Meyer, Anikitos Garofalakis, Giannis Zacharakis, Stylianos Psycharaki et al. *Noncontact optical imaging in mice with full angular coverage and automatic surface extraction*. 2007, *Applied Optics*, Vol. 46.

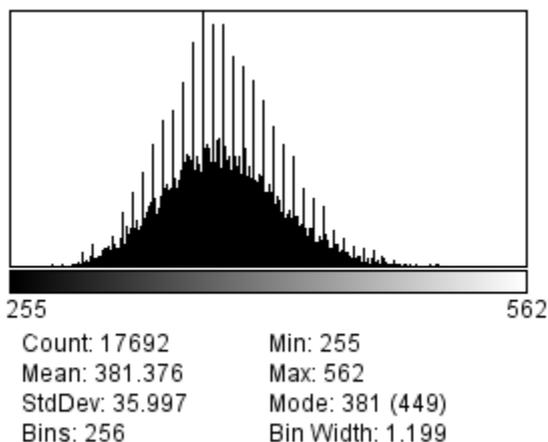
50. Daria C Comsa, Farrell T J and Patterson M S. Bioluminescence imaging of point sources implanted in small animals post mortem: evaluation of a method for estimating source strength and depth. *Physics in Medicine and Biology*. 2007, Vol. 52, pp. 5415-5428.

51. Daria C Comsa, Thomas J Farrell and Michael S Patterson. Quantitative fluorescence imaging of point-like sources in small animals. *Physics in Medicine and Biology*. 2008, Vol. 53, pp. 5797-5814.

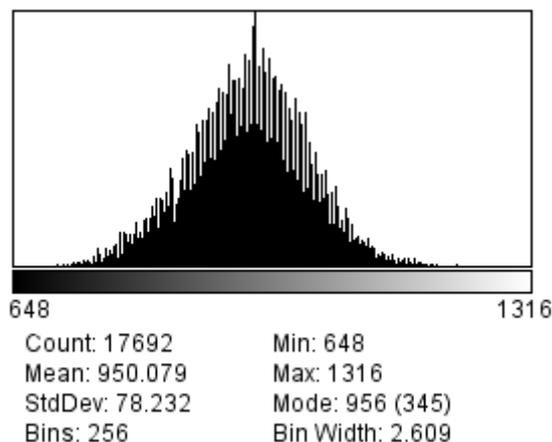
52. Wikimedia. [Online] [Citação: 18 de 08 de 2010.]
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Fluorescein.png>.

Anexo A - Testes de Linearidade

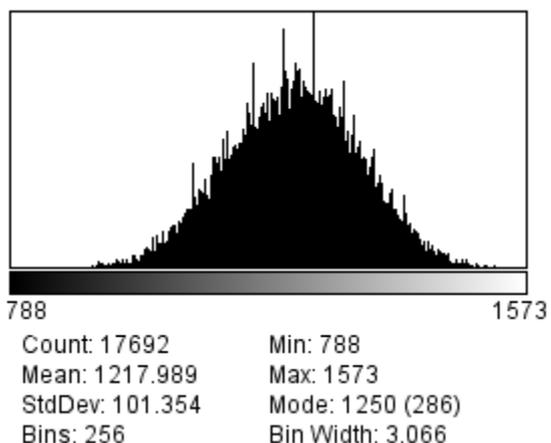
Poço 0 ng/ml



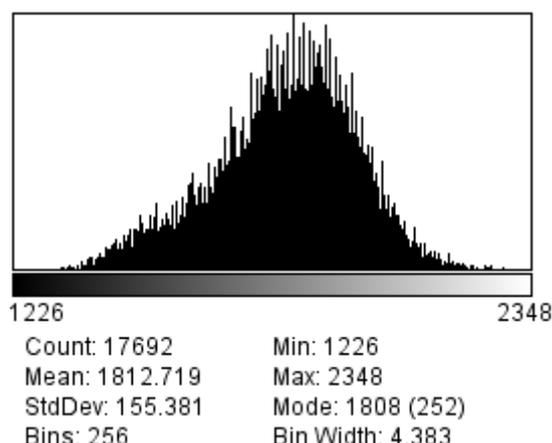
Poço 15 ng/ml



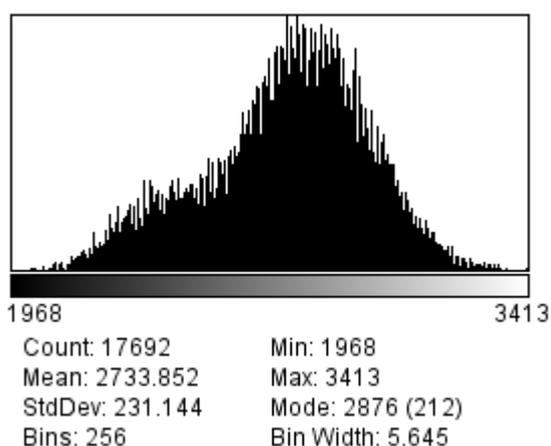
Poço 30 ng/ml



Poço 45 ng/ml



Poço 60 ng/ml



Poço 75 ng/ml

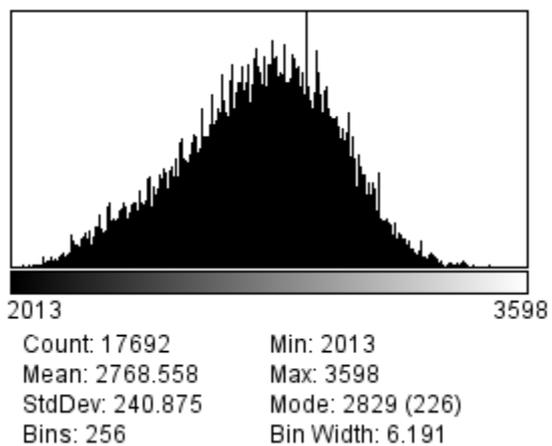
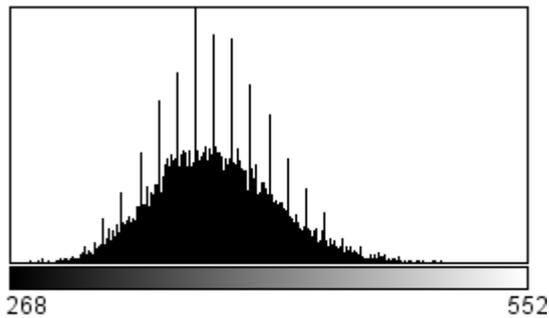


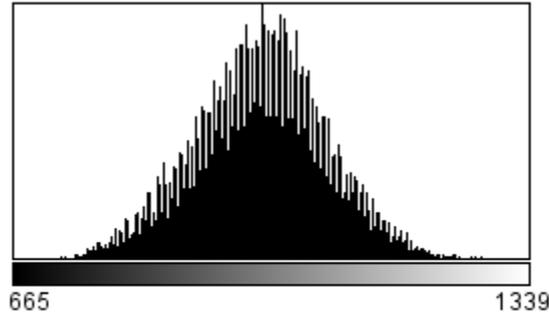
Figura Anexo A.1 - Situação 1 - Não corrigida

Poço 0 ng/ml



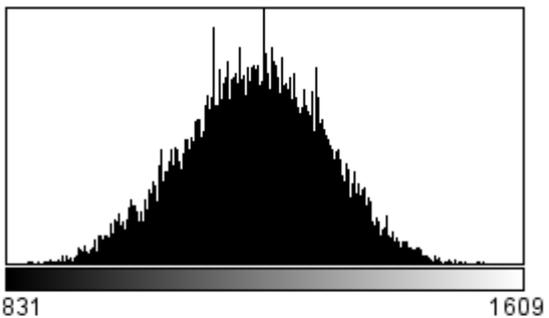
Count: 17692 Min: 268
 Mean: 380.839 Max: 552
 StdDev: 34.834 Mode: 369 (470)
 Bins: 256 Bin Width: 1.109

Poço 15 ng/ml



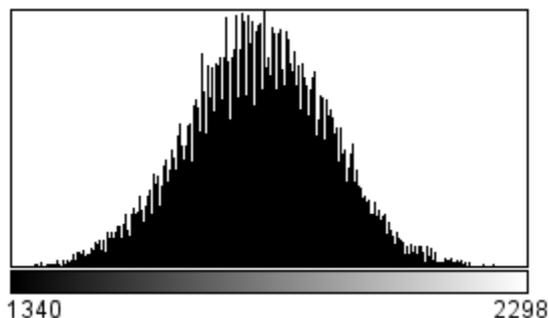
Count: 17692 Min: 665
 Mean: 988.135 Max: 1339
 StdDev: 87.021 Mode: 989 (283)
 Bins: 256 Bin Width: 2.633

Poço 30 ng/ml



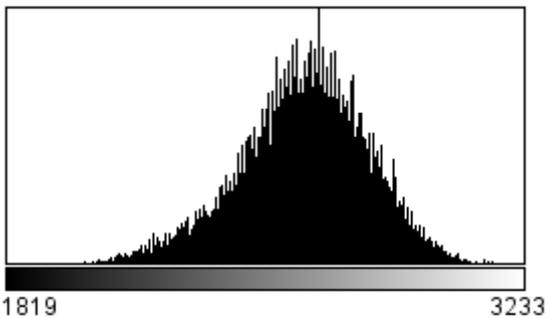
Count: 17692 Min: 831
 Mean: 1203.645 Max: 1609
 StdDev: 107.670 Mode: 1181 (251)
 Bins: 256 Bin Width: 3.039

Poço 45 ng/ml



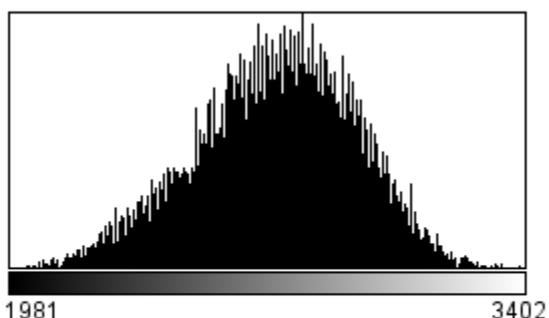
Count: 17692 Min: 1340
 Mean: 1797.549 Max: 2298
 StdDev: 132.740 Mode: 1769 (226)
 Bins: 256 Bin Width: 3.742

Poço 60 ng/ml



Count: 17692 Min: 1819
 Mean: 2628.976 Max: 3233
 StdDev: 177.889 Mode: 2610 (295)
 Bins: 256 Bin Width: 5.523

Poço 75 ng/ml



Count: 17692 Min: 1981
 Mean: 2712.665 Max: 3402
 StdDev: 222.614 Mode: 2723 (204)
 Bins: 256 Bin Width: 5.551

Figura Anexo A.2 - Situação 2 - Não corrigida

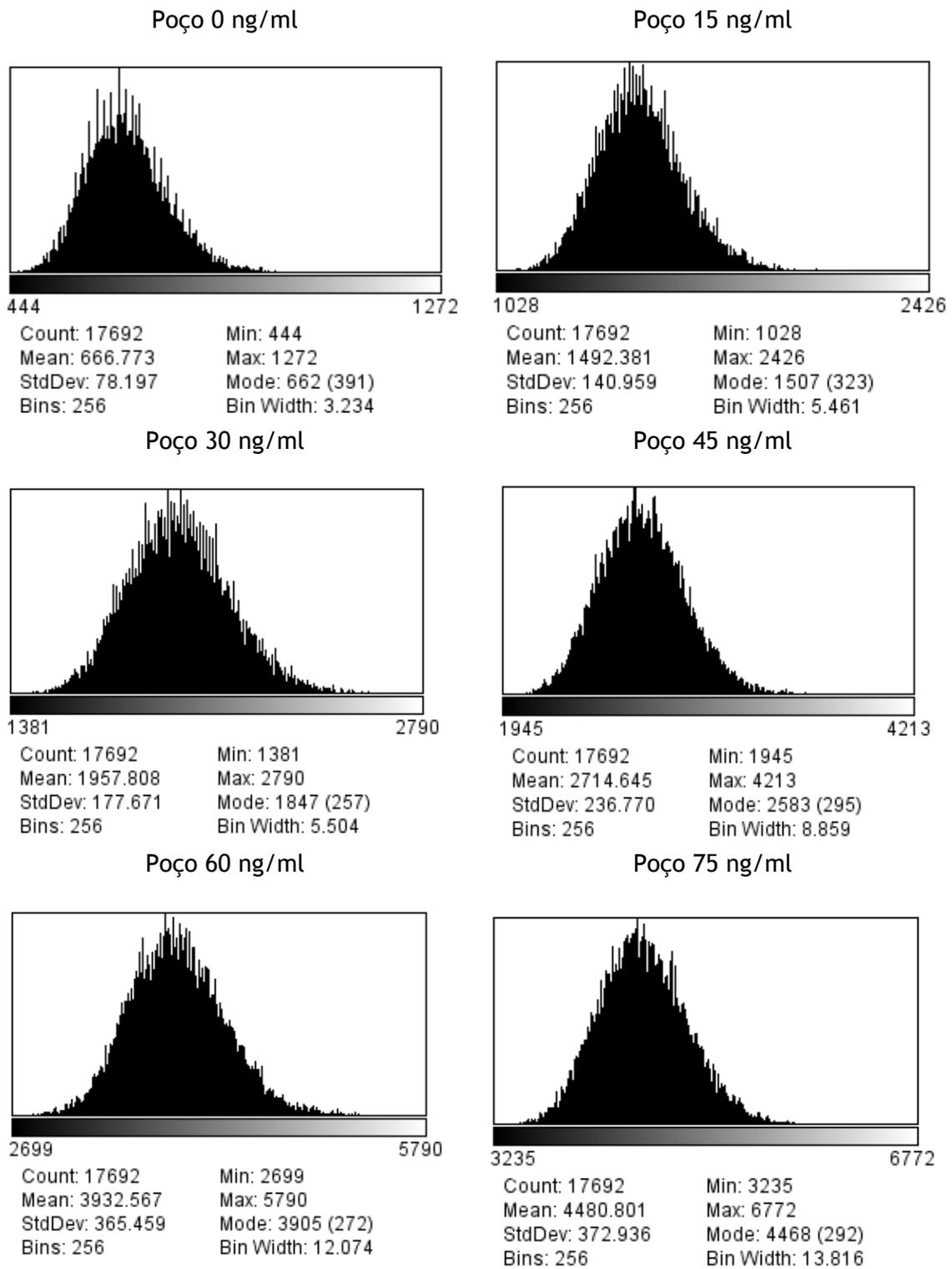


Figura Anexo A.3 - Situação 1 - Corrigida

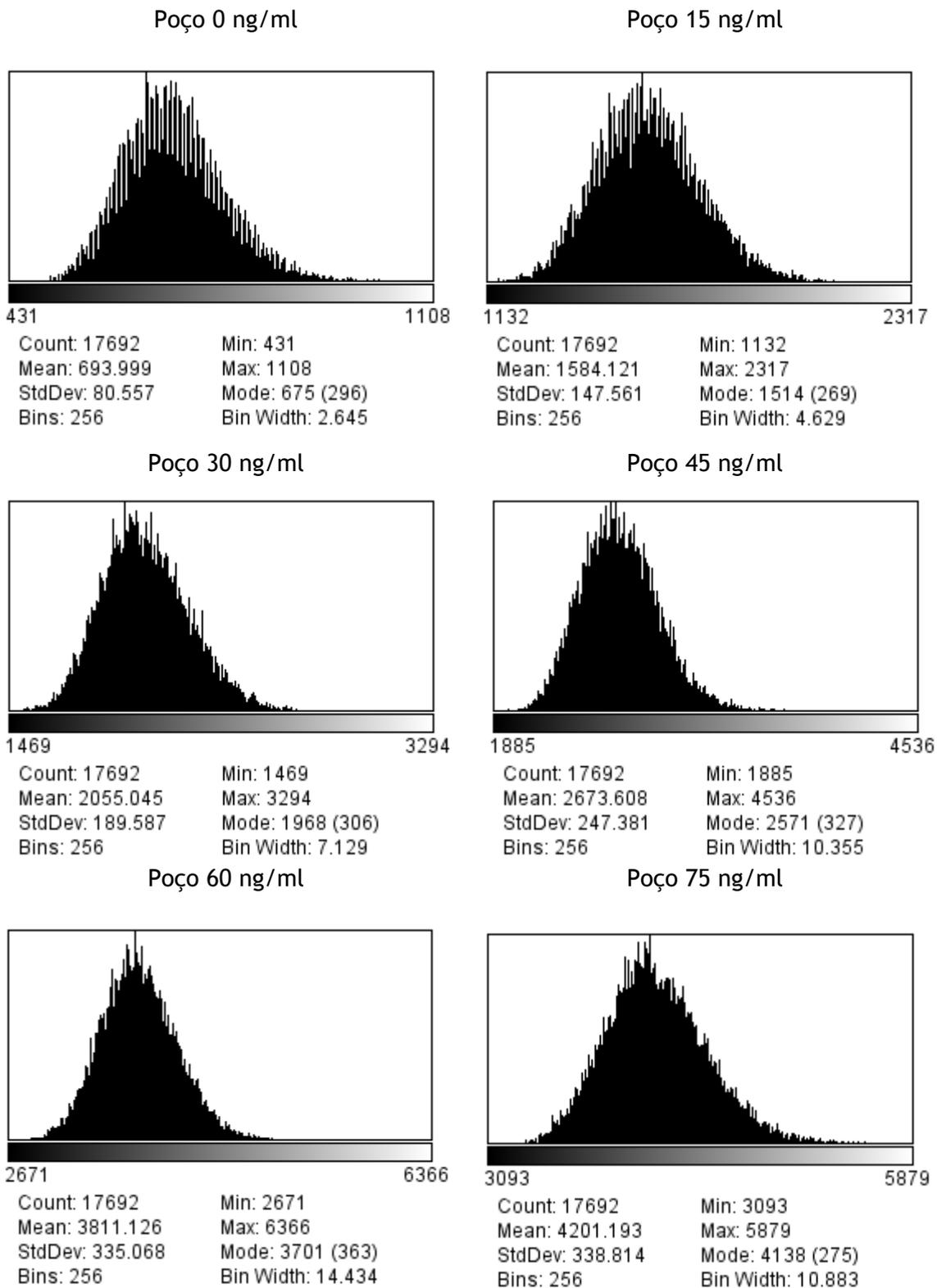


Figura Anexo A.4 - Situação 2 - Corrigida

Anexo B - Câmara CCD

HAMAMATSU
DATA SHEET

IEEE1394-Based Digital Camera ORCA-285 (C4742-95-12G04)



The ORCA-285 is a high resolution digital camera using a progressive scan interline CCD chip with no mechanical shutter. In addition to a high resolution of 1.37 million pixels, a wide dynamic range of 12 bit digital output and high sensitivity offers a wide application range down to low light level imaging.

Peltier cooling drastically reduces dark noise and minimizes thermal drift, which makes camera an ideal choice for demanding scientific and industrial application.

A high performance serial bus IEEE 1394 is used as a computer interface. Furthermore, a standard C-mount lens coupling makes it easy to connect to optics such as optical microscopes.



Hamamatsu is a member of 1394 Trade Association

FEATURES

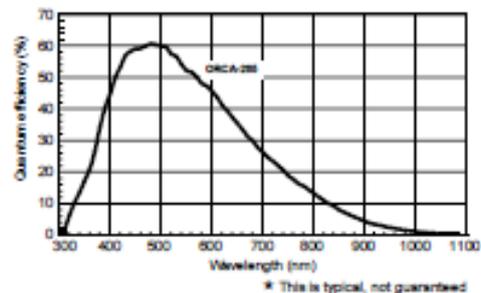
- High resolution of 1.37 million pixels
- Progressive scan interline CCD chip with no mechanical shutter
- Approx. 10 μ s electronic shutter to capture fast events
- Binning (2 \times 2, 4 \times 4, 8 \times 8) function to improve sensitivity and achieve a frame rate up to 41 Hz
- Low dark noise with peltier cooling for a dynamic range of more than 60dB
- Compatible with 1394-based digital camera specification
- Full remote control from PC via IEEE 1394 Bus

SPECIFICATIONS

Type number	C4742-95-12G04
Imaging device	Progressive scan Interline CCD with micro-lens
Effective no. of pixels	1344 (H) × 1024 (V)
Cell size	6.45 μm × 6.45 μm (square format)
Effective area	8.67 mm × 6.60 mm (2/3-inch format)
Pixel clock rate	14.75M Hz/pixel
Frame rate	8.8 frame/sec
2 × 2 binning	16 frame/sec
4 × 4 binning	27 frame/sec
8 × 8 binning	41 frame/sec
Readout noise (r.m.s.)	8 electrons
Full well capacity	18,000 electrons
Dynamic range*	2,250 : 1
Cooling method	Peltier cooling, air radiation system
Cooling temperature	+5 °C
Dark current	0.8 electron/pixel /sec
A/D converter	12 bit
Exposure time	10 μsec to 10 sec
Sub array	yes
Contrast enhancement	Analog Gain (10times max.) and Offset function
External trigger	yes
Lens mount	C-mount
Interface	IEEE1394-1995
External control	1394-Based Digital Camera Specification Ver.1.30
Line voltage	100V/117V/220V/240V AC, 50/60Hz
Power consumption	Approx. 70 VA
Ambient storage temperature	-10 °C to +50°C
Ambient operating temperature	0 °C to +40°C
Ambient storage/operating humidity	70% max. (no condensation)

- Image data format : Non-compressed data (Mono 16, Mono 8)
- Connector format : 6 pin IEEE1394 connector

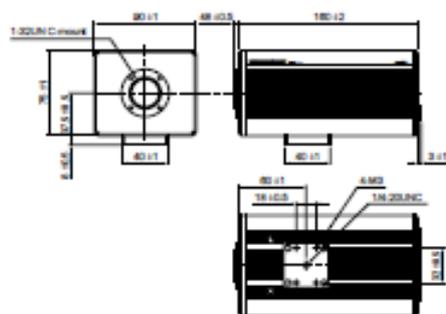
Spectral response characteristics



*Calculated from the ratio of the full well capacity and average readout noise

DIMENSIONAL OUTLINE (Unit : mm)

- Camera head (approx. 1.3kg)
- Control unit (approx. 6.2kg)



- ★ Product and software package names noted in this documentation are trademarks or registered trademarks of their respective manufacturers.
 - Subject to local technical requirements and regulations, availability of products included in this promotional material may vary. Please consult with our sales office
 - Information furnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or omissions.
- Specifications and external appearance are subject to change without notice.

© 2000 Hamamatsu Photonics K.K.

HAMAMATSU

Homepage Address <http://www.hamamatsu.com>

HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Systems Division

812 Joko-cho, Hamamatsu City, 431-3196, Japan, Telephone: (81)53-431-0124, Fax: (81)53-435-1574, E-mail: export@sys.hpk.co.jp

U.S.A. and Canada: Hamamatsu Photonics Systems, 380 Football Road, Bridgewater, N.J. 08807-0910, U.S.A., Telephone: (1)908-231-1116, Fax: (1)908-231-0852, E-mail: usa@hamamatsu.com

Germany: Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Achbergstr. 15, D-82211 Herrsching am Ammersee, Germany, Telephone: (49)8153-375-0, Fax: (49)8153-2956, E-mail: info@hamamatsu.de

France: Hamamatsu Photonics France S.A.R.L., 8, Rue du Saule Traip, Parc du Moulin de Massey, 91882 Massey Cedex, France, Telephone: (33)1 69 53 71 00, Fax: (33)1 69 53 71 15, E-mail: info@hamamatsu.fr

United Kingdom: Hamamatsu Photonics UK Limited, 21 Howard Court, 10 Twicken Road, Woking, Surrey, GU24 0JF, U.K., Telephone: (44)0 1707-294888, Fax: (44)0 1707-225777, E-mail: info@hamamatsu.co.uk

North Europe: Hamamatsu Photonics Norden AB, Södervägen 12, SE-171-41 Solna, Sweden, Telephone: (46)8-509-021-00, Fax: (46)8-509-021-01, E-mail: info@hamamatsu.se

Italy: Hamamatsu Photonics Italia S.R.L., Strada della Motta, 1/E 20020 Arese (Milano), Italy, Telephone: (39)02-935 81 733, Fax: (39)02-935 81 741, E-mail: info@hamamatsu.it

Cat. No. SICS1113E01

DEC/2002 HPK

Created in Japan (PDF)

Figura Anexo B.1 - Folha de especificações da câmara CCD

Anexo C - Intensificador de Imagem do Tipo *Gated*

TECHNICAL INFORMATION

T030402E-1

C9016-03MOD3N30K

OBJECTIVE SPECIFICATION SHEET

C9016-03MOD3N30K

Built-in Image Intensifier

GENERAL

Parameters		Ratings	Units
Spectral Response		185 to 900	nm
Wavelength of Maximum Response		430	nm
Input Window Material		Synthetic Silica	-
Photocathode	Material	Multialkali	-
	Minimum Effective Diameter	18	mm
MCP (Microchannel Plate)		Single Stage	-
Phosphor Screen	Material	P-43	-
	Minimum Effective Diameter	18	mm
Output Window Material		Fiber Optic Plate	-

CHARACTERISTICS

Parameters		Min.	Typ.	Max.	Units
Photocathode Sensitivity	Luminous Sensitivity	-	230	-	uA/lm
	Quantum Efficiency at 430 nm	-	53	-	mA/W
Light Gain	Luminous	-	1.1×10^4	-	(lm/m ²)/lx
EBI		-	1×10^{-11}	-	lm/cm ²
Limiting Resolution		-	64	-	Lp/mm

OPTICS

Parameters		Description / Value	Units
Input	Lens Mount	C-Mount	-
	Flange Back	17.526	mm
Output	Relay Lens Adapter	Option: A9017	-
	Applicable Relay Lens	Option: A2098(2:1)	-

Operation Mode

Parameters	Description / Value
Normal Mode	Continuous
Gate Mode	Normally OFF, ON when gate signal input

Gate Characteristics

Parameters		Description / Value
Gate Signal Input	Level	C-MOS, Positive Logic
	Impedance	50 Ohm
	Pulse Width	3 ns Min.
	Repetition Frequency	30 kHz Max.
Gate Output	Gate Time	3 ns to DC (According to gate signal input pulse width)
	Delay Time	36 ns +/- 2ns
	Jitter	200ps Max
Gate Time Monitor	Output Level	2.5 V (at 50 Ohm load), Positive Logic
	Pulse Width	Gate Time Width
	Output Impedance	50 Ohm

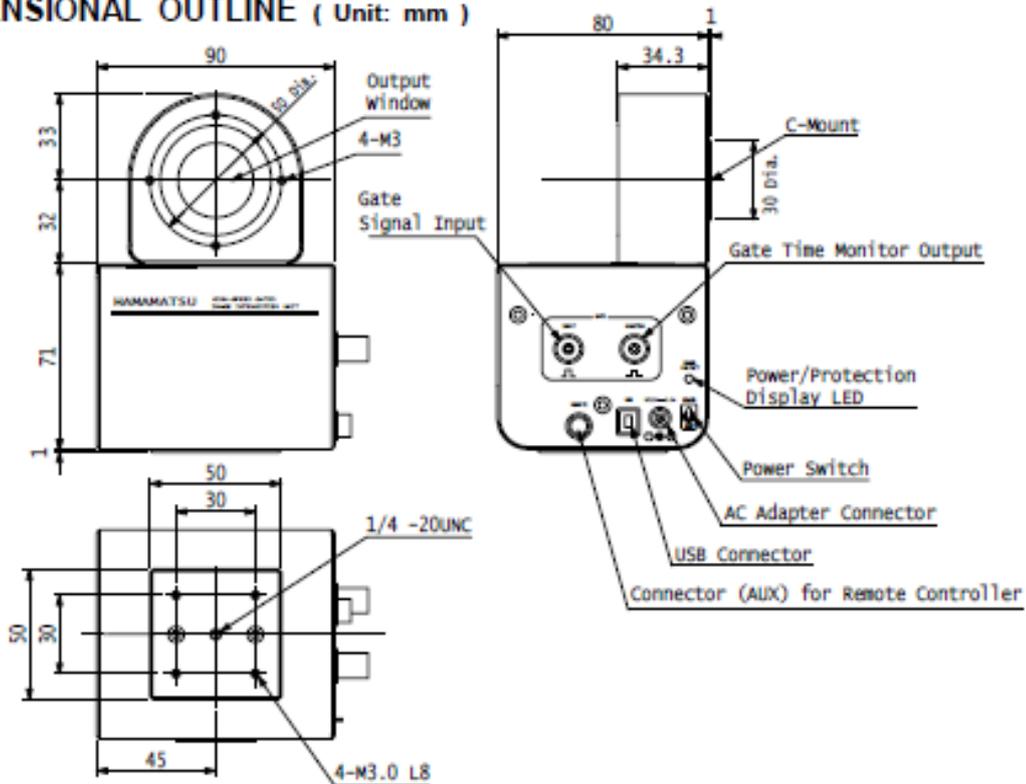
TECHNICAL INFORMATION

T030402E-2
C9016-03MOD3N30K

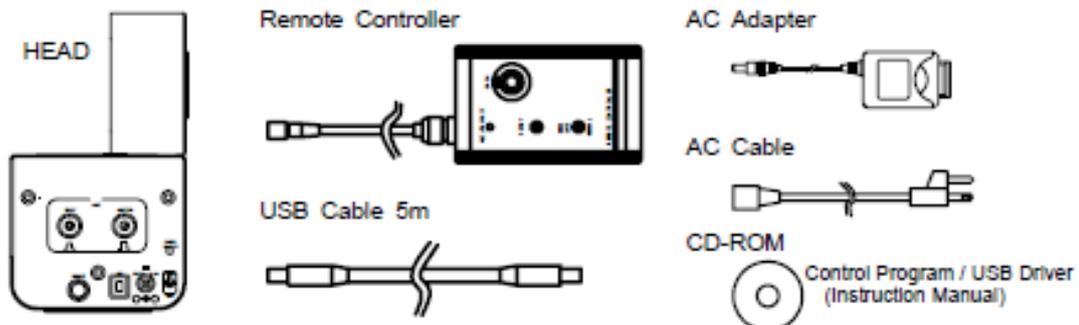
POWER SUPPLY and ENVIROMENTAL

Parameters	Description / Value	Units
Power Supply	AC 100 to 240 (by using AC Adapter)	V (50/60Hz)
Power Consumption	12 Max.	VA
Image Intensifier Control	USB (ver. 1.1) Interface or Remote Controller Gain / Protection	-
Operating Temperature	0 to +40	°C
Storage Temperature	-20 to +50	°C
Operating and Storage Humidity	Below 70 (No condensation)	%
Weight	900 (HEAD only)	g

DIMENSIONAL OUTLINE (Unit: mm)



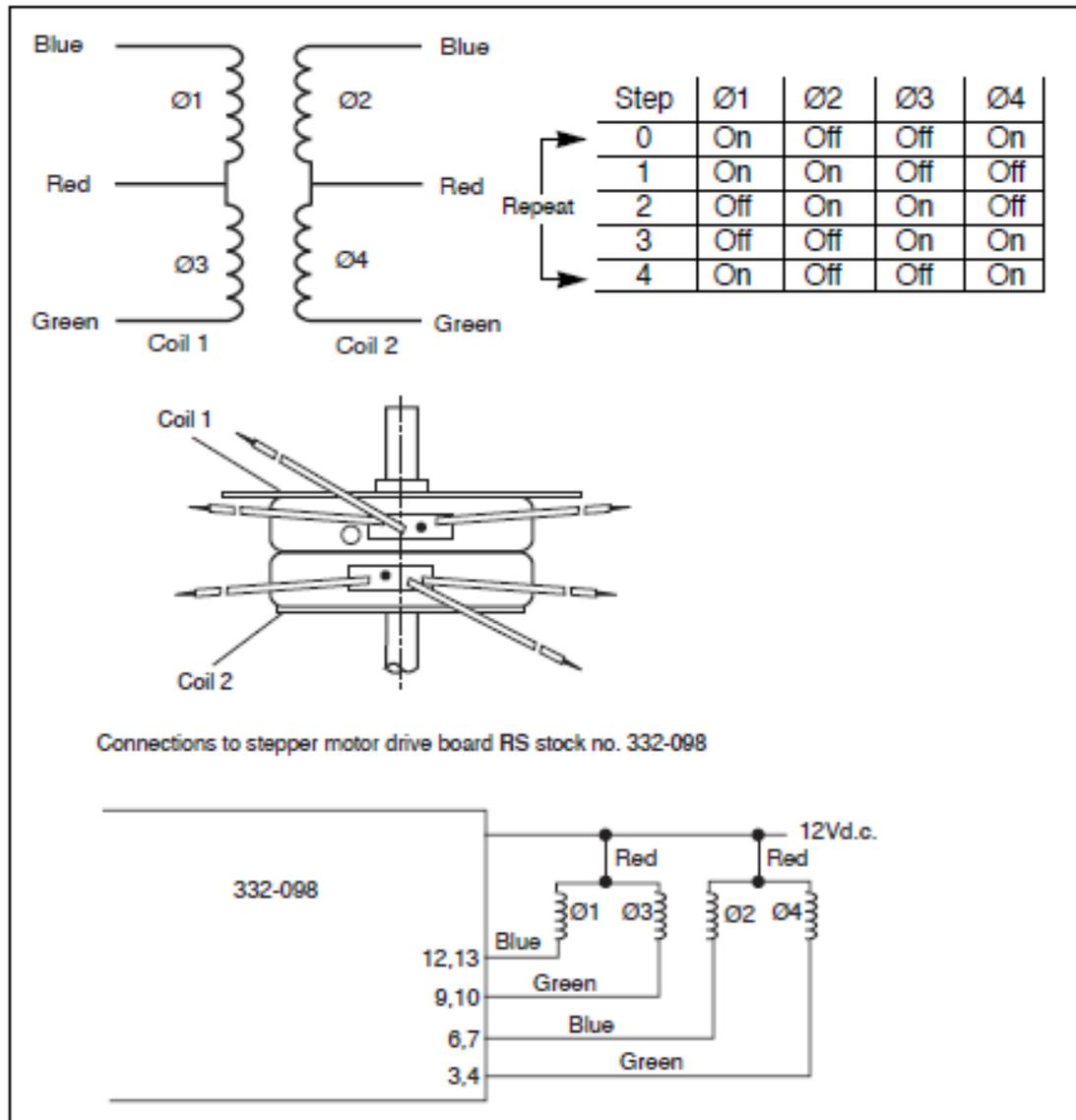
COMPONENTS



This information is furnished for your information only. No warranty, expressed or implied, is created by furnishing this information.

HAMAMATSU

Figura Anexo C.1 - Folha de especificações do intensificador de imagem



Each actuator is supplied with a 225mm lead screw which if necessary may be reduced in length by carefully cutting from the rear end. Always ensure the lead screw remains straight.

To achieve linear stepping movement the lead screw must be prevented from rotation by external load arrangement affixed at the metric thread end of it.

The user must ensure that throughout the travel range the lead screw is not subjected to any side bending forces.

The information provided in RS technical literature is believed to be accurate and reliable; however, RS Components assumes no responsibility for inaccuracies or omissions, or for the use of this information, and all use of such information shall be entirely at the user's own risk.

No responsibility is assumed by RS Components for any infringements of patents or other rights of third parties which may result from its use.

Specifications shown in RS Components technical literature are subject to change without notice.

RS Components, PO Box 99, Corby, Northants, NN17 9RS Telephone: 01536 201234

 An Electrocomponents Company

© RS Components 1997

Figura Anexo D.1 - Folha de especificações do motor de passo

Anexo E - Difusor

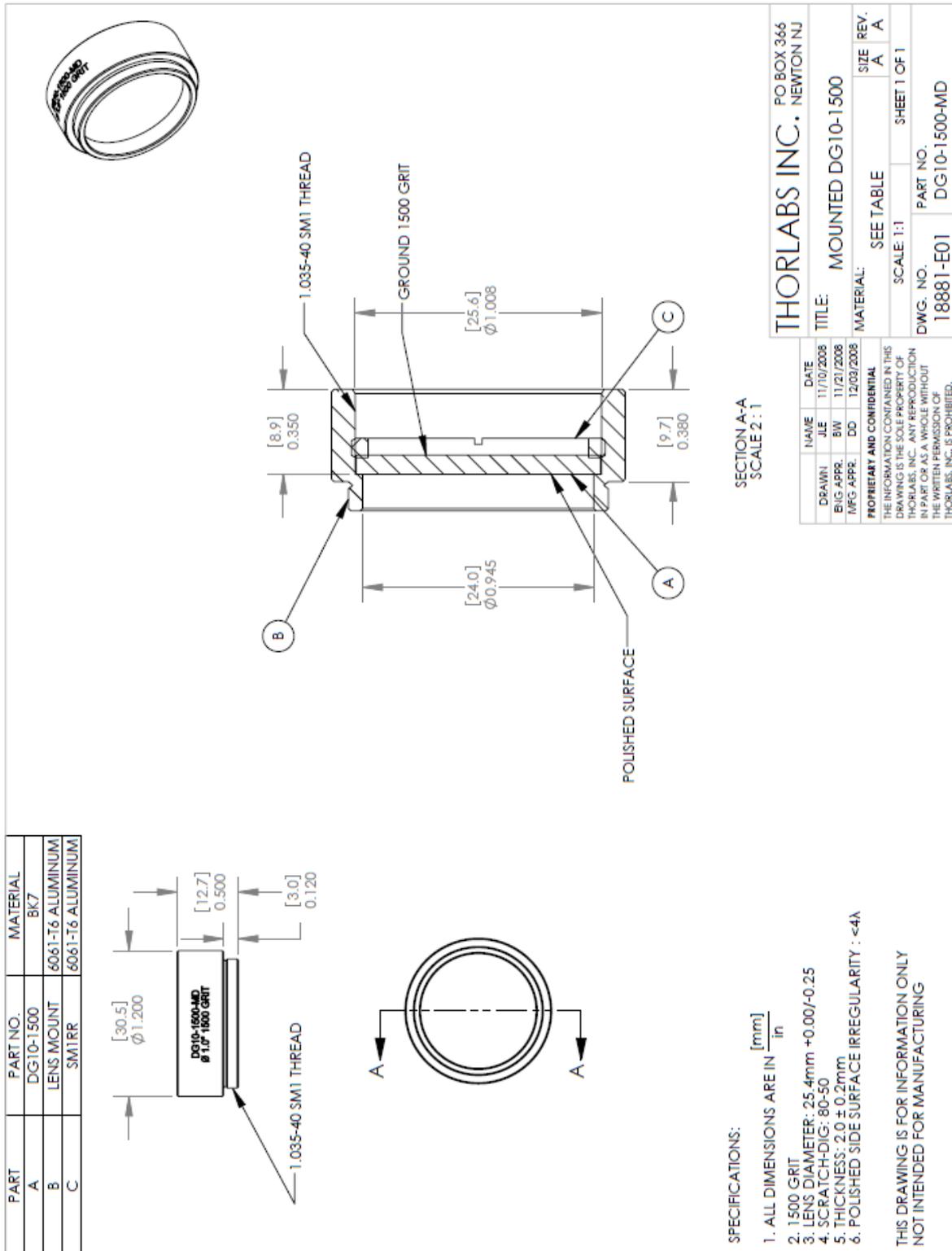


Figura Anexo E.1 - Folha de especificações do difusor