UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

MARDOQUEU MARTINS DA COSTA

**Desenvolvimento de um sistema por
imagem de fluorescência óptica para uso
médico-odontológico**

São Carlos
2010

MARDOQUEU MARTINS DA COSTA

**Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência óptica para uso
médico-odontológico**

Dissertação apresentada a Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Engenharia Elétrica

Área de Concentração: Processamento de
Sinais e Instrumentação

Orientadora: Profa. Dra. Liliane Ventura

São Carlos
2010

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Licenciado **MARDOQUEU MARTINS DA COSTA**.

Dissertação defendida e julgada em 12/02/2010 perante a Comissão Julgadora:

Prof^a. Associada **LILIANE VENTURA SCHIABEL (Orientadora)** Aprovado
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Prof^a. Dr^a. **CRISTINA KURACHI** Aprovado
(Instituto de Física de São Carlos/USP)

Prof^a. Dr^a. **LIGIA DE OLIVEIRA RUGGIERO** Aprovado
(Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"/UNESP/campus de Bauru)

Prof. Titular **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho principalmente aos meus pais e meus irmãos que sempre me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho. Sem vocês não conseguiria chegar até aqui. Muito Obrigado a vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luis Gabriel da Costa e Ana Maria Martins da Costa, pelo apoio incondicional, desde a graduação até o presente momento, em meu mestrado. Sei que sem vocês não estaria aqui, e não seria a pessoa que sou hoje. Obrigado meus pais, por herdar de vocês a paciência, e a persistência que um trabalho destes exige. Obrigado meus pais por tudo o que já fizeram por mim e o que ainda irão fazer. Obrigado pelo amor que me deram. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos Micael e Miguel também pelo apoio que me deram. Obrigado por vocês serem meus irmãos e estarem presentes em minha vida. Amo muito vocês.

A minha namorada, Adriana também pelo apoio e paciência durante toda a graduação e no mestrado. Amo muito você minha querida.

Ao professor Vanderlei Bagnato, pelo apoio e confiança em meu trabalho. Por perceber meu amadurecimento e perseverança durante esses 5 anos de trabalho em conjunto.

A Cristina Kurachi por me orientar e pelos “puxões de orelha”, que às vezes preciso, desde quando iniciei meus trabalhos no laboratório de biofotônica

A minha orientadora Liliane, pela gentileza que me fez, ao aceitar ser minha orientadora e pela paciência que teve durante esta fase de minha vida.

A equipe da Dra. Ana Gabriela Salvio pelo apoio na realização dos experimentos no hospital Amaral Carvalho. Obrigado Dra. Gabriela, Beatriz, Valentina.

Aos grandes companheiros do laboratório de biofotônica que me ajudaram diretamente e indiretamente em meu trabalho. Tenho que agradecer muito a vocês, Natalia (“Vou ti contar”), Carla (“Mobileti acelerada”), Everton (botinho), Dirceu (Boizão), Emery (Merezinho - Grande companheiro), Rosane (Rô), Juliana (Ju), Gustavo (Gaúcho), Gustavo (Grilinho), Sebastião (Tatu), Jeison (Magrelo), Lilian (Lili), Alessandra (Alê), Maristela (Mari), Fernando (Florez), Paula (Paulinha), Ruy, Daniel Malta, Raquel, Jussaira e Dennis.

Ao pessoal do LIEPO que sempre me deram grande ajuda quando se tratava de eletrônica. Obrigado João, Denis, Leandro, Zé e Daniel.

Ao pessoal do LAT que sempre forneceram matérias de eletrônica e me auxiliaram. Obrigado Orlando, Ezequiel, Igor, Alezandre, Leila, Valter e Henrique.

Ao pessoal da oficina mecânica, que me ajudaram no desenvolvimento de peças. Obrigado Evaldo, Leandro e Gilberto.

Ao pessoal da secretaria do grupo de óptica por estarem sempre dispostos a ajudar. Obrigado Isabel, Bene e Juliano.

Ao pessoal da secretaria da pós-graduação da EESC por estarem sempre dispostos a ajudar. Obrigado Jussara e Marisa.

Ao CNPq pelo suporte financeiro na forma de bolsa, sem esta não seria possível desenvolver meu trabalho.

A FAPESP pelo suporte financeiro de projetos financiados no grupo de óptica, onde realizei grande parte deste trabalho.

A MM Optics pelo suporte no desenvolvimento da parte mecânica deste projeto.

FELICIDADE REALISTA

A princípio bastaria ter saúde, dinheiro e amor, o que já é um pacote louvável, mas nossos desejos são ainda mais complexos. Não basta que a gente esteja sem febre: queremos, além de saúde, ser magérrimos, sarados, irresistíveis. Dinheiro? Não basta termos para pagar o aluguel, a comida e o cinema: queremos a piscina olímpica e uma temporada num SPA cinco estrelas.

E quanto ao amor? Ah, o amor... Não basta termos alguém com quem podemos conversar, dividir uma pizza e fazer sexo de vez em quando. Isso é pensar pequeno: queremos AMOR, todinho maiúsculo. Queremos estar visceralmente apaixonados, queremos ser surpreendidos por declarações e presentes inesperados, queremos jantar a luz de velas de segunda a domingo, queremos sexo selvagem e diário, queremos ser felizes assim e não de outro jeito. É o que da ver tanta televisão. Simplesmente esquecemos de tentar ser felizes de uma forma mais realista. Ter um parceiro constante pode ou não ser sinal de felicidade. Você pode ser feliz solteiro, feliz com uns romances ocasionais, feliz com um parceiro, feliz sem nenhum. Não existe amor minúsculo, principalmente quando se trata de amor-próprio.

Dinheiro é uma benção. Quem tem, precisa aproveitá-lo, gastá-lo, usufruí-lo. Não perder tempo juntando, juntando, juntando. Apenas o suficiente para se sentir seguro, mas não aprisionado. E se a gente tem pouco, e com este pouco que vai tentar segurar a onda, buscando coisas que saiam de graça, como um pouco de humor, um pouco de fé e um pouco de criatividade. Ser feliz de uma forma realista e fazer o possível e aceitar o improvável. Fazer exercícios sem almejar passarelas, trabalhar sem almejar o estrelado, amar sem almejar o eterno. Olhe para o relógio: hora de acordar. É importante pensar-se ao extremo, buscar lá dentro o que nos mobiliza, instiga e conduz, mas sem exigir-se desumanamente. A vida não é um jogo onde só quem testa seus limites é que leva o prêmio. Não sejamos vítimas ingênuas desta tal competitividade. Se a meta esta alta demais, reduza-a. Se você não está de acordo com as regras, demita-se. Invente seu próprio jogo. Faça o que for necessário para ser feliz. Mas não se esqueça que a felicidade é um sentimento simples, você pode encontrá-la e deixá-la ir embora por não perceber sua simplicidade. Ela transmite paz e não sentimentos fortes, que nos atormenta e provoca inquietado no nosso coração. Isso pode ser alegria, paixão, entusiasmo, mas não felicidade.

Mário Quintana

RESUMO

COSTA, M.M. (2010) **Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência óptica para uso médico-odontológico**. 96f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

A técnica de fluorescência óptica tem sido aplicada em diversas áreas médicas, como no acompanhamento da degradação de drogas e na detecção de câncer, por apresentar alta sensibilidade, simplicidade e rapidez na obtenção de dados. A avaliação não-invasiva e não-destrutiva é um grande atrativo que esta técnica oferece para o diagnóstico clínico. Assim, o objetivo deste projeto consistiu no desenvolvimento de um sistema de fluorescência óptica por imagem de campo amplo e avaliação do sistema no monitoramento da fotodegradação da Protoporfirina XI, utilizada na Terapia Fotodinâmica (TFD), e na visualização da presença de microrganismos presentes na microbiota bucal. O sistema desenvolvido é constituído de um sistema óptico, mecânico, eletrônico e de detecção. O sistema óptico é composto por LEDs de alta intensidade, com emissão centrada em 405nm e 450nm e 3 filtros ópticos: 1. passa-banda: utilizado na excitação; 2. dicróico; e 3. passa-alta: utilizados para excitação e emissão da fluorescência. O sistema mecânico foi desenvolvido em alumínio, possuindo as funções de dissipação de calor do sistema de iluminação e estrutural. O sistema eletrônico possui a função de controle e fornecimento de energia ao sistema de iluminação. O sistema de detecção é composto por uma câmera CCD e fotográfica, acoplada ao sistema de fluorescência desenvolvido. Um dos principais fatores para obtenção de bons sinais de fluorescência é a potência óptica obtida no sistema de iluminação, que neste caso foi de 200 mW. Outro fator é o comprimento de onda da iluminação; neste sistema foi obtida uma banda de iluminação muito eficaz entre 390 nm e 460 nm. O sistema de filtros proporcionou um sinal de fluorescência bastante satisfatório, bem como um bom contraste na visualização das imagens de fluorescência. Com este sistema foi possível acompanhar a fotodegradação da Protoporfirina IX, em função do tempo de iluminação durante a TFD. Proporcionou-se, assim, uma nova ferramenta para o avanço na avaliação da dosimetria da TFD, podendo otimizar e personalizar a TFD para cada paciente, já que o sistema desenvolvido permite a visualização da presença do agente fotossensível na terapia. Outra contribuição relevante do trabalho alcançada foi a visualização da presença de microrganismos da microbiota bucal, já que estes são os grandes responsáveis pelas doenças bucais como é o caso da cárie dental. Desta forma, conclui-se que foi possível desenvolver um sistema para auxílio da dosimetria na TFD e na visualização de microrganismos presentes na microbiota bucal. O sistema desenvolvido se mostrou compacto, agregando iluminação e visualização, tornando-o num protótipo com interface para uso clínico. O protótipo foi testado em pacientes para a visualização da microbiota bucal, tratamento de pré-câncer de pele e de vulva.

Palavras-chave: Imagem de fluorescência, Fotodegradação, Protoporfirina IX, Câncer de pele, Biofilme bucal

ABSTRACT

COSTA, M.M. (2010) **Development of an Optical Fluorescence Imaging system for medical use.** 96f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Optical fluorescence has been applied to several medical areas, as to monitor drug degradation and cancer detection, due to its high sensitivity, simplicity and fast response. Non-invasive and non-destructive assessment of tissues using this technique is very attractive for clinical diagnosis. Hence, the aim of was the development of an optical fluorescence wide-field imaging system, and the evaluation of its performance on monitoring protoporphyrin IX (PpIX) during Photodynamic Therapy (PDT), and one visualization of microorganisms present in oral microbiota. The developed device is composed by optical, mechanical, electronic, and detection systems. Optical system is composed by high-intensity light-emitting diodes (LED), with emission centered at 405 nm and 450 nm, and 3 optical filters: a bandpass filter for excitation; and set of dichroic and long wave pass filter, for fluorescence excitation and emission. The mechanical system was built in aluminum for structural and illumination systems heat dissipation. The electronic system provides the control of the illumination system. The detection system is composed by a CCD and a conventional digital camera, coupled to the developed device. One of the main factors for good fluorescence signals is the achieved optical power – in our case, it was of 200 mW. Another factor is excitation wavelength; for this system, a very efficient illumination band was achieved between 390-460 nm. The optical filters allowed a very satisfying fluorescence signal, with good contrast for fluorescence images visualization. The developed system enabled the monitoring of PpIX photobleaching as a function of illumination time during PDT. Therefore, a new tool to improve PDT dosimetry is offered by the use this system, allowing a more customized dosimetry each patient, since the device allows visualization of the photosensitive agent during the therapy. Visualization of oral microorganisms was also achieved, which was another relevant contribution of the developed instrumentation because they are the main cause of oral diseases such as caries. Thus the development of a system to both improve PDT dosimetry and oral microorganisms visualization was achieved as a compact device, joining illumination and visualization. These characteristics shows a good interface for clinical use. The prototype was tested in patients for oral microbiota visualization, and skin/vulva pre-cancer lesions treatment.

Keywords: Fluorescence imaging, Photobleaching, Protoporphyrin IX, Skin cancer, Oral biofilm

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sistema de imagens multiespectrais de fluorescência e refletância	26
Figura 2 - Sistema VELscope	27
Figura 3 - Sistema QLF	28
Figura 4 - Diagrama simplificado de Jablonski mecanismo básico de fluorescência	29
Figura 5 - Esquema hipotético de níveis de energia mostrando os processos de absorção e de fluorescência e os correspondentes espectros	30
Figura 6 - Espectros de absorção (A) e de emissão (B) de algumas biomoléculas	32
Figura 7 - Espectro da lâmpada de vapor de mercúrio	34
Figura 8 - Espectro da lâmpada de xenônio	35
Figura 9 - Espectros das lâmpadas de mercúrio e de metal-halóide	36
Figura 10 - Espectros de emissão de LEDs comerciais	37
Figura 11 - Esquema do arranjo típico de filtros utilizados para detecção de fluorescência	38
Figura 12 - Espectro de transmissão dos filtros ópticos utilizados em fluorescência	38
Figura 13 - Espectro do LED ultravioleta EDEV-3LA1	43
Figura 14 - Dimensões do LED EDEV-3LA1	43
Figura 15 - Espectro do LED azul LD W5AP-3V8A-35	45
Figura 16 - Dimensões do LED azul LD W5AP-3V8A-35	45
Figura 17 - Disposição dos filtros ópticos do sistema	47
Figura 18 - Filtro passa-banda largura de banda de 65nm centrada em 420nm	47
Figura 19 - Espectro de transmissão do filtro passa-banda (420nm)	48
Figura 20 - Filtro dicróico – reflete a iluminação de 390nm 460nm e transmite a banda de emissão de fluorescência da amostra .	49

Figura 21 - Espectro de transmissão do filtro dicróico	49
Figura 22 - Filtro anti-reflexo	50
Figura 23 - Espectro de transmissão do filtro anti-reflexo	51
Figura 24 - Filtro passa-alto	51
Figura 25 - Espectro de transmissão do filtro passa-alto	52
Figura 26 - Espectro de transmissão dos filtros utilizados	53
Figura 27 - Esquema de lente retirado do catálogo da Polimer Optics	53
Figura 28 - Esquema e desenhos do refletor	54
Figura 29 - Lente e refletor utilizados no sistema de iluminação	54
Figura 30 - Arranjo de lentes e refletor	55
Figura 31 - Montagem da óptica em bancada	56
Figura 32 - Projeto mecânico do sistema	57
Figura 33 - Projeto do sistema final (mecânica e ótica)	58
Figura 34 - Sistema de dissipação de calor	59
Figura 35 - Eletrônica desenvolvida para o sistema de fluorescência	60
Figura 36 - Caixa de controle do sistema de iluminação	61
Figura 37 - Câmera CCD para aquisição de imagens	62
Figura 38 - Câmera fotográfica SONY H50	62
Figura 39 - Acoplamento da câmera com o sistema	63
Figura 40 - Sistema principal	64
Figura 41 - Sistema de fluorescência com aquisição de imagens	65
Figura 42 - LEDs utilizados para compor o espectro da lâmpada	66
Figura 43 - Espectro de transmissão do filtro utilizado no sistema de iluminação	66
Figura 44 - Espectro obtido com a composição de dois LEDs. A – LEDs com intensidades diferentes; B – LEDs com mesma intensidade	67
Figura 45 - Região de interesse para sistemas de fluorescência	67

Figura 46 - Sistema de iluminação: (a) Vista frontal (b) Vista lateral; (c e d) Vista superior; Diversas vistas da iluminação	68
Figura 47 - Medidor de potência óptica	69
Figura 48 - Imagem de fluorescência do Photogem (vermelho) e Riboflavina (verde).....	70
Figura 49 - Imagem de fluorescência de bactérias	71
Figura 50 - Aparelho de tratamento de Queratose Actínica – Kerato PDT	73
Figura 51 - Imagens de fotodegradação da PpIX em função do tempo – Sem processamento	76
Figura 52 - Imagens de fotodegradação da PpIX em função do tempo – Com processamento	77
Figura 53 - Gráfico de fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação	78
Figura 54 - Imagens de fluorescência – Antes do início do tratamento	79
Figura 55 - Imagens de fluorescência – No início do tratamento – 0 minutos	79
Figura 56 - Imagens de fluorescência – No final do tratamento – 40 minutos	80
Figura 57 - Gráfico comparativo – Com e sem linha de base	81
Figura 58 - Sistema de tratamento do HPV	84
Figura 59 - Fotodegradação da PpIX – sem processamento	86
Figura 60 - Fotodegradação da PpIX – Imagens processadas	87
Figura 61 - Gráfico de fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação	88
Figura 62 - Dentes com colonização de bactérias	90
Figura 63 - Língua com colonização de bactérias	90
Figura 64 - Imagem de diferenciação de materiais através de fluorescência – A- imagem com iluminação branca e B – imagem de fluorescência	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características do LED EDEV-3LA1	44
Tabela 2 – Principais características do LED azul LD W5AP-3V8A-35	46
Tabela 3 – Valores de potência óptica do sistema de iluminação	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 A FLUORESCÊNCIA DE TECIDOS BIOLÓGICOS	28
1.2 IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA	31
1.2.1 Iluminação utilizada em fluorescência	33
1.2.1.1 Lâmpadas.....	34
1.2.1.2 LEDs.....	36
1.2.2 Filtros utilizados em imagens de fluorescência	37
1.3 APLICAÇÕES DE IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA.....	40
2 OBJETIVO	42
3 MATERIAL E MÉTODO.....	42
3.1 DESCRIÇÃO DO SISTEMA.....	42
3.1.1 Óptica	42
3.1.1.1 Sistema de Iluminação por LEDs	42
3.1.1.2 Filtros.....	46
3.1.1.3 Lentes.....	53
3.1.1.4 Montagem da óptica em bancada	56
3.1.2 Mecânica	57
3.1.2.1 Parte estrutural.....	57
3.1.2.2 Dissipação.....	58
3.1.3 Eletrônica	59
3.1.3 Aquisição das imagens.....	61
3.2 SISTEMA COMO UM TODO.....	63
3.2.1 Sistema principal.....	63
3.2.2 Sistema principal com aquisição de imagens	64

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA.....	65
3.3.1 Iluminação	65
3.3.2 Potência óptica	68
3.3.3 Teste do sistema de imagem	70
4 RESULTADOS	72
4.1 FOTODEGRADAÇÃO DA PROTOPORFIRINA IX-QUERATOSE ACTÍNICA....	72
4.1.1 Material e método	72
4.1.2 Resultados e discussão	75
4.1.3 Conclusão	82
4.2 FOTODEGRADAÇÃO DA PROTOPORFIRINA IX – HPV.....	82
4.2.1 Material e método	82
4.2.2 Resultados e discussão	85
4.2.3 Conclusão	89
4.3 VISUALIZAÇÃO DE COLONIAS MICROBIANAS ORAIS	89
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

O câncer é geralmente definido como um crescimento irregular e desordenado das células que têm o seu material genético modificado e que podem sofrer mutações desencadeadas por processos externos como substâncias químicas, tabagismo e radiação (1).

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) o câncer é um dos principais fatores que levam a população mundial a óbito e que provocou a morte de 7,4 milhões de mortes em 2004 e que estes números continuarão crescendo chegando a 12 milhões de pessoas em 2012. Dentre os tipos de câncer de maior frequência entre homens e mulheres são possíveis de destacar o de pulmão (1,3 milhões de mortes / ano), estômago (803 000 óbitos), colo e reto (639 000 óbitos), fígado (610 000 óbitos) e mama (519 000 óbitos). Entre os homens os tipos de câncer de maior frequência são os de pulmão, estômago, fígado, cólon e reto, esôfago e próstata e entre as mulheres são o de mama, pulmão, estômago, cólon e reto e cervical (2,3).

Para o Brasil, segundo estimativas levantadas pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer) em 2010, o câncer terá uma incidência de quase meio milhão de pessoas onde entre os homens, o de maior frequência será o de próstata, seguido pelo pulmão, estômago e cólon e reto. Entre as mulheres, o de maior frequência será o de mama, seguido pelo colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (4).

O Brasil é um país populoso e com grande dimensão, localizado próximo da linha do equador onde a incidência solar é bastante alta. Como resultado a população apresenta um alto índice de câncer de pele, o principal tipo na população brasileira e que acometerá cerca de 113.850 novos casos no ano de 2010, segundo

o INCA. Se levarmos em consideração a população mundial este numero ultrapassou a casa de mais de 2 milhões de casos em 2008 segundo a OMS.

Diante deste grande número de casos de câncer, algumas medidas devem ser tomadas para redução destes números como ações preventivas e educacionais, divulgação dos males causados pelo consumo de tabaco, álcool e pela exposição excessiva ao sol. É necessário também investimentos na área de pesquisa do câncer para uma detecção mais precoce e o tratamento mais efetivo.

Para o câncer o padrão ouro para o diagnóstico dessas lesões é o resultado histopatológico. Uma amostra tecidual da lesão é removida (biópsia) e o material é processado para fixação e coloração para análise em microscopia de luz. As características celulares e teciduais são avaliadas e o diagnóstico é dado comparando-se as diferenças com o padrão normal. O procedimento atual de diagnóstico depende da experiência e habilidade do avaliador no reconhecimento das alterações decorrentes do processo de carcinogênese, tanto do clínico ou cirurgião na detecção das lesões, como do patologista ao avaliar as lâminas histológicas.

As técnicas ópticas para a detecção de neoplasias vêm sendo apresentadas como técnicas auxiliares para o diagnóstico extremamente atrativas, por apresentarem o potencial de discriminação tecidual através de uma análise segura, não-invasiva e com resposta rápida, além de apresentar uma menor influência do avaliador no resultado final do diagnóstico. A composição bioquímica e a estrutura influenciam as interações da luz com o tecido biológico, assim um tecido sadio e uma lesão neoplásica apresentarão características ópticas distintas. Alterações celulares e teciduais decorrentes do desenvolvimento maligno modificam os

fenômenos ópticos e o monitoramento da fluorescência, reflectância, absorbância, pode constituir uma importante ferramenta de detecção.

Recentemente, técnicas que utilizam fluorescência têm sido propostas como promissores métodos de avaliação de diversos tecidos, com base nas propriedades ópticas e na sensibilidade dessas técnicas em captar a fluorescência emitida por fluoróforos endógenos presentes nos tecidos. A avaliação não-invasiva e não-destrutiva é um grande atrativo que a fluorescência oferece para o diagnóstico clínico.

A espectroscopia de fluorescência é um exemplo de técnica óptica, que tem diversas aplicações como, por exemplo, no auxílio de diagnóstico de lesões neoplásicas em tecidos (5,6), na detecção de tecido dental cariado (7), dentre várias outras aplicações. Em todas essas aplicações a técnica vem mostrando sensibilidade suficiente para diferenciar as variações teciduais.

A fluorescência por imagem de campo amplo é outra técnica que apresenta o potencial de aumentar o poder de discriminação de tecidos, podendo constituir uma importante ferramenta de detecção de lesões como câncer bucal (8,9). Ao contrário da espectroscopia que fornece uma análise pontual, as técnicas por imagem de campo amplo podem contribuir para a detecção de lesões ocultas e para o delineamento das margens de lesões (10).

Diversos grupos de pesquisa estão investindo na busca de novas técnicas e no desenvolvimento de equipamentos para o diagnóstico mais fácil e precoce do câncer, dentre essas técnicas a fluorescência tem um grande potencial de aplicação para detecção óptica como auxiliar no diagnóstico do câncer [2-14].

Nesta busca por novos equipamentos que utilizam fenômenos ópticos para o diagnóstico de câncer podemos destacar alguns trabalhos como de D. Roblyer e

colaboradores que desenvolveram um sistema de imagens multiespectrais, baseado em fluorescência e refletância para a detecção e delineamento de neoplasias orais (11-13). Neste sistema apresentado na Figura 1 é possível obter imagens de autofluorescência com vários tipos de excitações e que mostrou bastante efetividade na detecção de lesões neoplásicas.

Figura 1 - Sistema de imagens multiespectrais de fluorescência e refletância (14)

Outro sistema, que já possui uma vertente comercial e que foi desenvolvido pelo *British Columbia Cancer Agency* e apresentado por P.M. Lane e colaboradores que também é baseado em fluorescência para a detecção de câncer na cavidade oral (15-18). O sistema é chamado de VELScope (*Visually Enhanced Lesion scope*) que é um dispositivo para exame visual da mucosa oral. O sistema possui uma fonte de iluminação baseado em uma lâmpada de metal halóide que emite uma banda de iluminação entre o ultravioleta e azul que excita o tecido da mucosa oral e então o clínico é capaz de visualizar as diferentes fluorescências, através de filtros, e que ajuda a diferenciar o tecido normal e anormal. Até o momento este é o único dispositivo aprovado pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), que é um órgão regulador e certificador similar a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O sistema VELscope auxilia no diagnóstico de lesões da mucosa bucal que podem

não ser aparentes ou visíveis com iluminação branca convencional e que auxilia os cirurgiões a determinar a margem adequada para a excisão cirúrgica do tumor. As imagens das lesões utilizando o sistema VELscope geralmente aparecem como uma área irregular e escura que contrasta com a área saudável cujo o padrão normal de fluorescência é na região do verde.

Na Figura 2 é mostrado o sistema VELscope e as imagens que são possíveis de se visualizar com este sistema.

Figura 2 - Sistema VELscope (19)

Outro sistema baseado em fluorescência, agora utilizando para outra aplicação foi desenvolvido por G. K. Stookey e colaboradores e a empresa Inspektor Research Systems, o sistema é chamado de QLF (*Quantitative Light-Induced Fluorescence*). Este sistema também possui uma fonte de iluminação baseado em uma lâmpada que emite uma banda de iluminação entre o ultravioleta e azul que excita, neste caso, o dente, onde o objetivo deste sistema é através de fluorescência detectar a desmineralização do dente, podendo assim detectar cáries recentes através de uma diminuição do sinal de fluorescência. Com este sistema também é possível visualizar biofilme microbiano baseado em sua fluorescência (20-25).

Na Figura 3 é mostrado o sistema QLF e as imagens que são possível de se visualizar com este sistema.

Figura 3 - Sistema QLF (26)

Neste trabalho iremos explorar técnicas ópticas com o uso da fluorescência para diagnóstico e com o objetivo de se desenvolver um sistema que possa coletar este sinal de fluorescência, assim será necessário compreender o que é o fenômeno físico de fluorescência e os componentes necessários para a coleta deste fenômeno, onde os principais itens para este desenvolvimento serão descritos, em maior detalhe, abaixo.

1.1 A FLUORESCÊNCIA DE TECIDOS BIOLÓGICOS

Todas as técnicas ópticas empregadas para discriminação de tecidos biológicos são baseadas na avaliação de pelo menos um fenômeno da interação luz com tecido, um desses casos é a fluorescência. Para se falar de fluorescência é necessário entender o que acontece quando incidimos luz, neste caso luz visível, sobre tecidos biológicos.

A luz visível, ou seja, a radiação eletromagnética, que corresponde à região espectral entre 400 e 700nm, possui uma determinada energia. Uma unidade desta radiação eletromagnética é denominada fóton. Quando a energia do fóton é suficientemente grande para excitar os elétrons das moléculas dos tecidos biológicos, para um estado de energia maior que o estado fundamental (absorção de fótons), o elétron excitado pode perder energia, por emissão espontânea, emitindo fótons de menor energia até voltar ao estado fundamental (Figura 4). Um exemplo comum é o caso em que o átomo é excitado por luz ultravioleta e emite fótons de luz visível. Este processo é chamado de fluorescência (27,28).

Figura 4 - Diagrama simplificado de Jablonski - mecanismo básico de fluorescência (28)

De modo simplificado, a luz com um determinado comprimento de onda (excitação) é absorvida pelo tecido, e re-emitida em um segundo maior comprimento de onda (emissão) de menor energia (Figura 5). No processo de fluorescência, a energia absorvida é sempre maior do que a emitida, uma vez que existem outras formas não-radiativas de perda de energia, tais como vibração e calor.

Figura 5 - Esquema hipotético de níveis de energia mostrando os processos de absorção e de fluorescência e os correspondentes espectros (28)

A principal característica da fluorescência emitida é que ela só depende da característica eletrônica da molécula que a emitiu, uma vez que depende das bandas de energia. Assim, a fluorescência pode ser reconhecida como uma assinatura própria da molécula, podendo ser empregada como uma ferramenta de identificação de moléculas. Uma vez que cada composto tem uma fluorescência bem característica (que depende da luz utilizada para promover a excitação), é possível diferenciá-lo dentre outros compostos.

No caso de tecidos biológicos, a fluorescência, ou seja, a luz re-emitida e detectada na superfície do tecido é resultante da contribuição de diversos fluoróforos (grupos químicos que podem converter a luz absorvida em fluorescência), além dos espalhadores (estruturas que alteram a direção do fóton incidente, mas conservam sua energia) e absorvedores locais (grupos químicos que absorvem luz e não produzem fluorescência). O que se observa é uma banda de emissão bastante

larga. A fluorescência coletada contém a contribuição de todos os fluoróforos excitados pelo comprimento de onda escolhido, mas apenas parte dos fótons que puderam ser coletados na superfície do tecido, e que não foram absorvidos por outros cromóforos.

1.2 IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA

Para o estudo da fluorescência de tecidos biológicos, primeiramente é preciso conhecer as regiões de absorção destas amostras, que neste trabalho estão localizadas na região do ultravioleta e azul, ou seja, entre 390nm a 460nm, assim proporcionando um sinal de fluorescência acima de 480nm.

Na Figura 6 é possível observar o espectro de absorção de algumas biomoléculas encontradas na região de interesse de 390nm a 460nm. Algumas dessas biomoléculas são Flavinas, Lipo-Pigmentos e Porfirinas (6).

Figura 6 - Espectros de absorção (A) e de emissão (B) de algumas biomoléculas (6)

Diante dos espectros de absorção é escolhida qual será a fonte de iluminação responsável pela excitação dessas biomoléculas. Para se obter a máximo sinal de fluorescência dessas amostras, as fontes de iluminação devem ser escolhidas de maneira que o pico máximo de absorção da amostra seja excitado pelo respectivo comprimento de onda de máxima absorção.

Para a obtenção de imagens de fluorescência existem diversos equipamentos que podem coletar a fluorescência de amostras microscópicas, que é o caso dos microscópios de fluorescência e confocal, que são utilizados principalmente na visualização da fluorescência de células com auxílio de marcadores fluorescentes. As imagens macroscópicas são obtidas com sistemas de fluorescência de campo amplo, que são utilizados para visualização de lesão de câncer de pele, câncer bucal (9,10,29-31), etc.

Sistemas para visualização de fluorescência, seja macroscópico ou microscópico, são basicamente constituídos por dois sistemas, o sistema de excitação do material, ou seja, um sistema de iluminação; e um sistema de detecção associado a filtros, que irá revelar o sinal de fluorescência da amostra. A seguir serão descritos os principais sistemas de iluminação e de filtros para a visualização de fluorescência.

1.2.1 Iluminação utilizada em fluorescência

Os sistemas de fluorescência utilizam diversas fontes de iluminação para excitação das amostras. Estes sistemas geralmente utilizam LASER, Lâmpadas e LEDs como fonte de excitação. Como nesse estudo estamos interessados em imagem de campo amplo, optamos pelo uso dos emissores LED para a obtenção de uma área uniforme de iluminação, adequada para as aplicações propostas. Além disso, a possibilidade de composição de cores com os diversos LEDs disponíveis no mercado e o custo comparado aos lasers, tornam os emissores LEDs bastante atrativos para a montagem do nosso sistema.

Para obtermos a banda de iluminação escolhida é necessária a utilização de lâmpadas ou LEDs, assim serão descritos abaixo as principais lâmpadas e LEDs utilizados como fonte de iluminação de sistemas de fluorescência.

1.2.1.1 Lâmpadas

1 - Lâmpadas a Vapor de Mercúrio – As lâmpadas de vapor de mercúrio são bastante utilizadas em microscopia de fluorescência e ainda são consideradas umas das melhores iluminações para esta aplicação, especialmente quando o pico de absorção dos fluoróforos coincide com as linhas de emissão de maior intensidade emitidas pela lâmpada de mercúrio.

Na Figura 7 é possível observar o espectro de emissão das lâmpadas a vapor de mercúrio, bem como os seus picos característicos (32).

Figura 7 - Espectro da lâmpada de vapor de mercúrio(32)

2 - Lâmpada de Xenônio – A lâmpada de xenônio possui um largo e contínuo espectro de emissão na região do visível de 400 a 700nm (Figura 8). Esta possui restritas aplicações, que requerem simultâneas excitações de múltiplos fluoróforos aplicadas à microscopia de fluorescência (32).

Figura 8 - Espectro da lâmpada de xenônio(32)

3 - Lâmpada de metal-halóide – Lâmpadas de metal-halóide estão surgindo rapidamente como substituição das lâmpadas de mercúrio e xenônio nas aplicações que envolvem microscopia de fluorescência. Estas exibem um alto desempenho, quando comparadas às lâmpadas de mercúrio e xenônio.

Na Figura 9 é feita uma comparação entre o espectro de emissão da lâmpada a vapor de mercúrio, linha cinza, e o espectro de emissão da lâmpada de metal-halóide, linha verde. Nesta figura é possível observar que ambos os espectros possuem linhas de emissão bem definidas. Porém, o espectro de emissão da lâmpada de metal-halóide possui maior intensidade, sendo uma das vantagens desta comparada à lâmpada a vapor de mercúrio. Outra vantagem é o tempo de vida útil dessas lâmpadas: o da vapor de mercúrio é de aproximadamente 200 horas e o da lâmpada de metal-halóide é de 2000 horas.

Figura 9 - Espectros das lâmpadas de mercúrio e de metal-halóide (33)

1.2.1.2 LEDs

Diodo Emissor de Luz

A mais promissora tecnologia para iluminação de sistemas de fluorescência de imagens de campo amplo é o *Light-Emitting Diode* (LED), ou seja, Diodo Emissor de Luz. Este versátil dispositivo semicondutor possibilita todas as características de iluminação de lâmpadas utilizadas em sistemas de fluorescência, com a vantagem de serem mais eficientes relativamente ao consumo de energia, tamanho muito reduzido - quando comparado com lâmpadas - e possuem uma vida útil muito longa, superior a 100.000 horas de uso (34).

Figura 10 - Espectros de emissão de LEDs comerciais (35).

1.2.2 Filtros utilizados em imagens de fluorescência

Os instrumentos de imagens de fluorescência devem apresentar filtros ópticos (18,32). Um típico sistema possui 3 filtros básicos: 1. passa-banda: utilizado na excitação; 2. dicróico; e 3. passa-alta: utilizado na emissão da fluorescência.

Na Figura 11 é demonstrado o esquema básico do arranjo de filtros utilizado para detecção de fluorescência.

Figura 11 - Esquema do arranjo típico de filtros utilizados para detecção de fluorescência

A escolha dos filtros que irá compor a montagem básica do sistema de detecção de fluorescência é baseada no espectro de absorção da amostra e no seu espectro de emissão.

Na Figura 12 é demonstrada, de uma maneira simplificada, como são sugeridos os espectros de transmissão dos filtros utilizados, levando em consideração os espectros de absorção e emissão da amostra a ser analisada (36).

Figura 12 - Espectro de transmissão dos filtros ópticos utilizados em fluorescência

O filtro sugerido utilizado na excitação é definido pelo pico máximo de absorção da amostra, como mostrado na Figura 12. Geralmente é utilizado um filtro passa-banda na excitação, a fim de transmitir apenas os comprimentos de onda de maior absorção dos fluoróforos da amostra, e refletir ou absorver os demais comprimentos de onda, que estão fora do pico máximo de absorção, assim minimizando a excitação de outras fontes de fluorescência que não são de interesse.

O filtro utilizado na emissão ou detecção da fluorescência segue os mesmos critérios de seleção do filtro de excitação (Figura 12). Tipicamente é utilizado um filtro passa-alto ou passa-banda, que transmite somente os comprimentos de onda de emissão, emitidos pelos fluoróforos e bloqueia toda a luz indesejável desta banda, especialmente a banda de excitação. Um dos fatores da utilização destes filtros é o espalhamento da luz nos comprimentos de onda empregados na excitação que é mais intenso do que a fluorescência, assim deve ser removido antes da detecção.

Os filtros dicróicos, ou *beamsplitters*, são posicionados a 45° em relação à iluminação e são escolhidos para refletir os comprimentos de onda da excitação e transmitir os comprimentos de onda de emissão da amostra. Para que se tenha uma máxima eficiência com relação à quantidade de luz que chegará a amostra e a máxima eficiência de fluorescência que será detectada, o espectro de transmissão do filtro dicróico deverá estar entre o espectro de transmissão do filtro de emissão e excitação.

1.3 APLICAÇÕES DE IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA

Sistemas capazes de fazer a detecção de fluorescência são utilizados para as mais diversas aplicações. Neste trabalho serão exploradas duas aplicações, a fim de se validar a eficácia clínica do sistema de imagem de fluorescência desenvolvido. A primeira aplicação é a detecção de fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica e a segunda é a visualização de biofilme microbiano na boca.

A primeira aplicação é relacionada à terapia fotodinâmica (TFD) que emprega a combinação de luz visível com um agente fotossensível, gerando espécies citotóxicas as células (37). Esta técnica tem sido utilizada em diversos tipos de tratamentos como na infecção genital por Papilomavírus humano (HPV), infecções locais bacterianas e câncer de pele (38,39). No entanto é necessário melhorar a instrumentação e o protocolo clínico para aprimorar o desenvolvimento desta técnica.

Um dos agentes utilizados na TFD é o ácido 5-aminolevulínico (5 - ALA), que é precursor na biossíntese da Protoporfirina XI que é o agente fotossensível (40). A eficácia da TFD é dependente da concentração e da profundidade da Protoporfirina XI no tecido. Assim surge a necessidade da verificação da presença e do acompanhamento da formação da Protoporfirina XI no tecido, assim como de sua fotodegradação durante a TFD, que é uma importante informação para a dosimetria.

A segunda aplicação é relacionada à visualização de biofilme em superfície dental, está diretamente relacionado a problemas de saúde como cárie e doença periodontal.

Pesquisas na área odontológica têm constatado que os biofilmes orais são comunidades microbianas com uma grande diversidade de bactérias (41).

Recentemente, estudos vêm demonstrando uma relação entre a saúde bucal precária e doenças sistêmicas devido a alguns componentes da microbiota bucal (41,42). Estes componentes podem ser tanto patógenos periodontais, quanto bactérias oportunistas, que também colonizam o biofilme. O biofilme pode ser evidenciado quando da utilização de parâmetros adequados de iluminação e visualização, facilitando a identificação e o monitoramento do controle microbiano pelo profissional clínico.

Diante destes dois problemas foi proposto, neste trabalho, o desenvolvimento de um sistema portátil, que facilite tanto a visualização da fluorescência da protoporfirina IX durante o tratamento por TFD, quanto à visualização da fluorescência da microbiota bucal. No entanto, é importante ressaltar que, o equipamento desenvolvido pode ser empregado em outras aplicações como na detecção de câncer de pele e câncer de boca onde estas aplicações serão exploradas em trabalhos futuros.

O acompanhamento da formação e da degradação da Protoporfirina XI promoverá a otimização do tempo de início e fim da iluminação necessário na TFD promovendo um tratamento mais eficaz. A melhor visualização da microbiota bucal poderá reduzir o número de problemas de saúde relacionados com os microrganismos presentes na microbiota bucal.

2 OBJETIVO

O principal objetivo deste projeto é o desenvolvimento de um sistema de fluorescência óptica por imagem de campo amplo.

Os objetivos secundários envolvem a avaliação do sistema no monitoramento da degradação da Protoporfirina XI utilizada na TFD e a visualização da presença de microrganismos presentes na microbiota bucal.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DESCRIÇÃO DO SISTEMA

O projeto consistiu de quatro partes principais, descritas em detalhes a seguir: Óptica, Mecânica, Eletrônica e Aquisição de imagens.

3.1.1 Óptica

3.1.1.1 Sistema de Iluminação por LEDs

Para o desenvolvimento do sistema de iluminação, e que este atendesse a banda de absorção de interesse, que é de 390nm a 460nm, foram utilizados dois tipos de LEDs de alta intensidade. A escolha dos LEDs para serem utilizados como fonte de iluminação foi feita pelas vantagens que os LEDs possuem, em relação às lâmpadas: alta intensidade óptica, dispositivos muito compactos e vida útil longa.

O primeiro LED utilizado é fabricado pela EDISON, empresa Taiwanesa com distribuidores no Brasil. Na Figura 13 é mostrado o espectro do LED ultravioleta modelo EDEV-3LA1, este espectro foi obtido utilizando um espectrômetro USB 2000 (Ocean Optics, USA).

Figura 13 - Espectro do LED ultravioleta EDEV-3LA1

Na Figura 14 é possível observar as dimensões do LED ultravioleta utilizado.

Figura 14 - Dimensões do LED EDEV-3LA1 (43)

As principais características do LED ultravioleta estão demonstradas na Tabela 1 (44).

Para o desenvolvimento deste sistema as principais características levadas em consideração na escolha deste LED foram o comprimento de onda centrado em 405nm e potência radiométrica de 350 mW.

Tabela 1 - Principais características do LED EDEV-3LA1

Parâmetros	Valores	Unidades
Corrente	700	mA
Tensão	4,3	V
Temperatura de operação	-30 ~ +110	°C
Temperatura de junção	125	°C
Potência Radiométrica	350	mW
Comprimento de onda (pico)	405	nm
Ângulo de emissão	140	graus

O segundo LED utilizado é fabricado pela OSRAM, empresa America com distribuidores no Brasil. Na Figura 42 é mostrado o espectro do LED azul modelo LD W5AP-3V8A-35, este espectro foi obtido utilizando um espectrômetro USB 2000 (Ocean Optics, USA).

Figura 15 - Espectro do LED azul LD W5AP-3V8A-35

Na Figura 43 é possível observar as dimensões do LED azul utilizado.

Figura 16 - Dimensões do LED azul LD W5AP-3V8A-35 (45)

As principais características do LED azul estão demonstradas na Tabela 2 (45). Para o desenvolvimento deste sistema as principais características levadas em

consideração na escolha deste LED foram o comprimento de onda centrado em 450nm e potência radiométrica de 1250 mW.

Tabela 2 - Principais características do LED azul LD W5AP-3V8A-35

Parâmetros	Valores	Unidades
Corrente	1,4	A
Tensão	3,5	V
Temperatura de operação	-40 ~ +150	°C
Temperatura de junção	160	°C
Potência Radiométrica	1250	mW
Comprimento de onda (pico)	450	nm
Ângulo de emissão	140	graus

3.1.1.2 Filtros

Para o desenvolvimento deste sistema foi necessária a utilização de quatro filtros ópticos, relacionados a seguir, com o objetivo de se obter a melhor visualização das imagens de fluorescência de interesse. O arranjo dos filtros está ilustrado na Figura 17.

Figura 17 - Disposição dos filtros ópticos do sistema

1 - Filtro Passa-banda (*Single-band Bandpass Filter*)

O primeiro filtro utilizado foi o filtro passa-banda (Figura 18), que possui as dimensões de 25mm de diâmetro e 3mm de espessura. Este filtro foi personalizado e produzido pela empresa Proteon (Empresa nacional) para atender a esta determinada aplicação.

Figura 18 - Filtro passa-banda - largura de banda de 65nm centrada em 420nm.

Este filtro possui uma largura de banda de 65nm centrada em 420nm onde é transmitindo apenas a banda de interesse da iluminação de 390nm a 460nm. Na Figura 19 é mostrado o espectro de transmissão do filtro passa-banda. Este espectro e dos demais filtros foram obtidos através de um espectrofotômetro modelo CARY 50 UV-VIS (Varian, USA).

Figura 19 - Espectro de transmissão do filtro passa-banda (420nm).

A utilização do filtro passa-banda se fez necessário devido ao fato do LED 450 possuir uma banda relativamente larga, acima de 460nm. Assim, se este filtro não fosse utilizado o sinal de fluorescência da amostra seria mascarado pela iluminação do LED 450, o que prejudicaria na qualidade das imagens obtidas.

2 - Filtro Dicroico (*45° Dichroic Beamsplitters*)

O segundo filtro utilizado foi o filtro dicroico (Figura 20) que possui as dimensões de 25mm de altura, 35mm de largura e 1mm de espessura. Este filtro foi

personalizado e produzido pela empresa Semrock (USA), para atender a esta determinada aplicação.

Figura 20 - Filtro dicróico – reflete a iluminação de 390nm - 460nm e transmite a banda de emissão de fluorescência da amostra

O espectro de transmissão do filtro dicróico é mostrado na Figura 21. Este filtro é utilizado para refletir a iluminação de 390nm a 460nm e transmitir a banda de emissão de fluorescência da amostra.

Figura 21 - Espectro de transmissão do filtro dicróico

O filtro dicróico foi projetado de maneira a transmitir as bandas de 480-560nm e 625nm – 800nm e refletir as bandas de 350nm – 460nm e 560nm-625nm.

O principal objetivo de o filtro dicróico possuir estas determinadas características de transmissão se deve ao fato da fluorescência de interesse estar localizada nas bandas de 480-560nm, ou seja, fluorescência no verde; e na banda de 625nm – 800nm, fluorescência no vermelho. Em relação à reflexão do filtro, o interesse na banda de 350nm-460nm é a reflexão da luz, que irá excitar a amostra; e a reflexão da banda de 560nm-625nm se faz necessária, pois esta banda representa a banda de fluorescência localizada no amarelo, que não é de interesse. Evitando essa banda é possível ter um maior contraste nas amostras, e obter melhores imagens de fluorescência.

3 - Filtro Anti-reflexo

O terceiro filtro utilizado foi o filtro anti-reflexo (Figura 22), que possui dimensões de 25mm de diâmetro e 1mm de espessura. Este filtro produzido pela empresa Proteon, para atender a esta determinada aplicação.

Figura 22 - Filtro anti-reflexo

Na Figura 23 é possível observar o espectro de transmissão do filtro anti-reflexo, que possui a característica de transmitir 95% da fluorescência que será coletada pelo sistema.

Este filtro foi utilizado pra proteger os demais filtros da entrada de partículas no sistema de filtros, pois este estará o mais próximo da amostra analisada.

Figura 23 - Espectro de transmissão do filtro anti-reflexo

4 - Filtro Passa-alto (*Long Wave Pass Filters*)

O quarto filtro utilizado foi o passa-alto (Figura 24), que possui dimensões de 25 mm de diâmetro e espessura de 2 mm. Este filtro, modelo GG 475 foi produzido pela empresa Proteon para atender a esta determinada aplicação.

Figura 24 - Filtro passa-alto

Na Figura 25 é possível observar o espectro de transmissão do filtro passa-alto, que possui a característica de absorver a banda de 350nm-475nm e transmitir a banda de 475nm-800nm, ou seja tem a função de absorver os comprimento de onda do sistema de iluminação e transmitir apenas a banda de emissão de fluorescência da amostra.

Figura 25 - Espectro de transmissão do filtro passa-alto

Com estes quatro tipos de filtros foi possível obter imagens de fluorescência com boa eficiência, obtendo-se imagens com boa qualidade e de bom contraste.

Na Figura 26 é possível observar o espectro de transmissão dos filtros passa-banda, passa-alto e dicróico, cujo conjunto demonstra as características de transmissão e reflexão, proporcionando um bom sinal de fluorescência.

Figura 26 - Espectro de transmissão dos filtros utilizados

3.1.1.3 Lentes

O sistema de iluminação é composto por “uma lente” e um refletor. A “lente” utilizada (*Polimer Optics, England*) é um conjunto de 7 lentes agrupadas. Na Figura 27 é mostrado um esquema de como estão dispostas estas lentes formando uma lente única, que possui a função de focalização dos LEDs azuis.

Figura 27 - Esquema de lente retirado do catálogo da *Polimer Optics*

O refletor utilizado foi gentilmente doado pela empresa brasileira DirectLight Indústria e Comércio de Produtos Eletroluminescentes Ltda, com sede em São Carlos. Na Figura 28 é mostrado o desenho esquemático e suas dimensões, e este possui a função de focalização do LED ultravioleta.

Figura 28 - Esquema e desenhos do refletor

Na Figura 29 são mostrados a lente e o refletor utilizados no sistema de iluminação.

Figura 29 - Lente e refletor utilizados no sistema de iluminação

Para que fosse possível obter uma intensidade de iluminação alta foi necessário fazer uma combinação de lentes e refletor. Na Figura 30 é mostrada esta combinação, que consiste na retirada da lente central do conjunto de lentes da Polimer Optics. No centro das lentes inseriu-se um refletor, pois as lentes da Polimer Optics são de acrílico e este material absorve uma grande parte da intensidade do LED ultravioleta.

Uma alternativa para este problema seria a confecção das lentes com outros materiais que não absorvam na região do ultravioleta, como o quartzo.

Figura 30 - Arranjo de lentes e refletor

Para o sistema de iluminação foi necessária a utilização de seis LEDs azuis, ao redor de um LED ultravioleta. Esta quantidade de LEDs proporciona um calor excessivo, pois o LED ultravioleta possui potência elétrica de 3W e o azul, 5 W, totalizando no sistema 33 W de potência elétrica, em seu máximo de potência óptica.

3.1.1.4 Montagem da óptica em bancada

O desenvolvimento do sistema de imagens de fluorescência passou por uma etapa fundamental, que foram os testes em bancada ou testes em mesa óptica.

Na Figura 31 é possível visualizar uma das montagens feitas na mesa óptica, bem como os componentes ópticos utilizados, tais como filtros e lentes.

Na mesa óptica foram realizados diversos testes: potência óptica do sistema de iluminação; escolha dos filtros a serem utilizados; arranjo espacial dos filtros; e testes de otimização e dimensionamento, a fim de se compactar o sistema.

Projetou-se, então, a parte estrutural do sistema (parte mecânica do projeto).

Figura 31 - Montagem da óptica em bancada

3.1.2 Mecânica

3.1.2.1 Parte estrutural

O projeto mecânico do sistema desenvolvido foi inteiramente projetado no *software* SolidWorks (Dassault Systemes S.A., França), que oferece um sistema de simulação e projeção 3D, facilitando o desenvolvimento e visualização da execução do projeto.

Depois da simulação, o projeto mecânico foi executado na oficina mecânica do Instituto de Física da USP de São Carlos.

O desenho 3D do projeto mecânico é apresentado na Figura 32.

Figura 32 - Projeto mecânico do sistema.

Na Figura 33 apresenta o sistema de imagens de fluorescência, partes mecânicas e óticas.

Figura 33 - Projeto do sistema final (mecânica e ótica)

3.1.2.2 Dissipação

O sistema de iluminação possui uma potência elétrica alta, gerando um calor excessivo e que precisa ser dissipado. Houve a necessidade, então, de se construir um dissipador de calor, mostrado na Figura 34.

O sistema de dissipação é composto pelo dissipador, feito em alumínio, e um *cooler*, que auxilia na troca calor gerado pelo sistema de LEDs.

Figura 34 - Sistema de dissipação de calor

3.1.3 Eletrônica

O objetivo do sistema de eletrônica é o controle e ajuste da intensidade individual de cada conjunto de LEDs, ou seja, fornecer tensão e corrente ao conjunto de 6 LEDs azuis e um LED ultravioleta separadamente. Isso possibilitará ao usuário ajustar a intensidade luminosa de cada conjunto de LEDs, a cada determinada aplicação.

No sistema de iluminação os 6 LEDs azuis foram ligados em série, necessitando para sua alimentação tensão de 21V e 1,4A de corrente. O LED ultravioleta requer 4,3V e 0,7A.

Para fornecer estes níveis de tensão e corrente foram utilizadas duas fontes comerciais (MGS Eletrônica LTDA, Brasil), uma das fontes de 18V e outra de 5V, ambas com corrente de 3A.

As duas fontes foram ligadas em série, proporcionando 23V e 3A, suficientes para o sistema de iluminação. Assim, foi possível desenvolver a fonte que faz a regulação da corrente, que será fornecida a cada conjunto de LEDs, possibilitando o controle da intensidade luminosa.

Na Figura 35 é mostrada a eletrônica desenvolvida para o sistema de fluorescência, onde são destacadas as fontes de alimentação de tensão e corrente.

Figura 35 - Eletrônica desenvolvida para o sistema de fluorescência

Um invólucro final para o protótipo foi confeccionado, para interface com o usuário – o clínico.

Na Figura 36 é mostrada a caixa onde se encontra a eletrônica do sistema. É possível observar o controle de intensidade do conjunto de LEDs azuis e LED ultravioleta.

Figura 36 - Caixa de controle do sistema de iluminação

3.1.3 Aquisição das imagens

O sistema de visualização de fluorescência foi idealizado e desenvolvido, preliminarmente, para operar sem a necessidade de câmera, pois a visualização é feita através do próprio olho humano. Com a necessidade de registro das imagens digitalizadas para posterior análise e processamento, foi necessária a utilização de uma câmera CCD e uma câmera fotográfica acoplada ao sistema desenvolvido.

A câmera utilizada é uma câmera USB CCD modelo DBK 31AU03.AS (*The Imaging Source*, Alemanha), como mostrado na Figura 37. Esta câmera possui algumas características como, resolução de 1024x768 pixel, controle do tempo de exposição de 1ms até 30s e de ganho.

Figura 37 - Câmera CCD para aquisição de imagens

A câmera fotográfica utilizada foi uma câmera semi-profissional Sony Cyber-shot modelo DSC-H50 (Sony Corporation, Japão) como mostrado na Figura 37. Esta câmera possui algumas características como, resolução de 3456 x 2592 pixel (9,1 Megapixels) e objetiva Carl Zeiss 31-465mm com zoom óptico de 15x.

Figura 38 - Câmera fotográfica SONY H50

Na Figura 39 é mostrado um desenho esquemático do acoplamento da câmera CCD com o sistema desenvolvido.

Figura 39 - Acoplamento da câmera com o sistema

3.2 SISTEMA COMO UM TODO

3.2.1 Sistema principal

Na Figura 40 é possível visualizar o sistema principal montado com todos os componentes descritos acima. O sistema principal possui a característica de ser compacto facilitando seu manuseio.

Figura 40 - Sistema principal

3.2.2 Sistema principal com aquisição de imagens

Na Figura 41 é apresentado o sistema de fluorescência em conjunto com a aquisição de imagens.

Figura 41 - Sistema de fluorescência com aquisição de imagens

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA

3.3.1 Iluminação

Com a utilização destes dois tipos de LEDs (Figura 42) - com comprimento de onda centrado em 405nm (LED ultravioleta) e 450nm (LED azul) - e o filtro passa-banda - cujo o espectro de transmissão é mostrado na Figura 43 -, pode-se obter o espectro da iluminação de interesse do sistema que foi desenvolvido, como mostrado na Figura 44.

Figura 42 - LEDs utilizados para compor o espectro da lâmpada

Figura 43 - Espectro de transmissão do filtro utilizado no sistema de iluminação

Figura 44 - Espectro obtido com a composição de dois LEDs. A – LEDs com intensidades diferentes; B – LEDs com mesma intensidade

Uma das grandes vantagens da utilização de LEDs para se compor espectros de interesse é a possibilidade de se alterar a intensidade de cada LED de maneira independente, assim tem-se um resultado com o mesmo espectro de uma lâmpada como mostrado na Figura 45 (quadrado em vermelho) podendo ainda alterá-lo de maneira que melhor atenda uma determinada aplicação.

Figura 45 - Região de interesse para sistemas de fluorescência

Na Figura 46 são mostrados o sistema de iluminação bem como as características de iluminação obtidas com a combinação dos LEDs, filtro, lentes e refletor.

Figura 46 - Sistema de iluminação: (a) Vista frontal (b) Vista lateral; (c e d) Vista superior; Diversas vistas da iluminação

Na Figura 46 é possível observar uma característica fundamental que um sistema de iluminação utilizado em fluorescência deve possuir que é a uniformidade. Esta característica contribui significativamente na qualidade das imagens de fluorescência.

3.3.2 Potência óptica

Uma das caracterizações necessárias, a este sistema, é a potência radiométrica ou potência óptica (em mW), fornecida pelos LEDs.

Para esta caracterização foi utilizado o medidor de potência modelo *FieldMaster* (*Coherent*, USA) e o sensor térmico modelo LM-10 HTD (*Coherent*, USA).

O sensor possui as seguintes características, 16mm de diâmetro, 1mW de resolução até 10W de potência máxima de operação e pode-se medir a faixa de comprimentos de onda de 250 a 10600nm.

Figura 47 - Medidor de potência óptica

Na Tabela 3 é possível observar os valores obtidos do sistema. Estes valores são extremamente satisfatórios, pois proporcionam boas imagens de fluorescência.

Tabela 3 - Valores de potência óptica do sistema de iluminação

Conjunto	Valores	Unidades
LED ultravioleta	50	mW
LED azul	200	mW
Total	250	mW

3.3.3 Teste do sistema de imagem

Com o objetivo deste projeto é visualização da PpIX, uma porfirina endógena, e visualização de colônias microbianas, foram realizadas duas caracterizações de imagens para validar, através de testes *in vitro* se o sistema seria capaz de atender os objetivos propostos.

O primeiro teste é mostrado na Figura 48, onde se observa a imagem de fluorescência obtida com o sistema. Esta imagem possui dois compostos misturados, o primeiro é uma porfirina utilizada em TFD - o *Photogem* -, que pode ser visualizado pela sua fluorescência na região do vermelho, muito similar a fluorescência da PpIX. O segundo composto é a vitamina B2 ou Riboflavina, utilizada nos procedimentos de crosslinking em córneas humanas para a estagnação do ceratocone. A fluorescência da riboflavina é visualizada ao centro, cuja fluorescência está situada na região do verde, a qual é bem similar a fluorescência da pele.

Figura 48 - Imagem de fluorescência do Photogem (vermelho) e Riboflavina (verde)

O segundo teste pode ser visualizado na Figura 49. Esta imagem foi obtida a partir do crescimento de culturas bacterianas em placa de ágar. Na figura é possível observar algumas bactérias provenientes da região bucal e que foram cultivadas. Elas possuem fluorescência na região do verde e outras bactérias possuem fluorescência na região do vermelho.

Na Figura 49 observa-se uma bactéria que possui fluorescência na região do vermelho, indicando que estas bactérias produzem Protoporfirina IX.

Figura 49 - Imagem de fluorescência de bactérias

Com este dois experimentos *in vitro* foi possível validar o sistema desenvolvido já que as imagens obtidas se mostraram de excelente qualidade e que possibilitavam diferenciar e evidenciar a fluorescência tanto da PpIX quanto de bactérias produtoras de PpIX.

4 RESULTADOS

As várias aplicações do sistema desenvolvido neste trabalho serão detalhadamente apresentadas nesta seção.

4.1 FOTODEGRADAÇÃO DA PROTOPORFIRINA IX-QUERATOSE ACTÍNICA

O experimento de fotodegradação da PpIX é uma parceria entre o Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP e a equipe da Dra. Ana Gabriela Sálvio, médica do Hospital Amaral Carvalho em Jaú – SP, hospital referência no tratamento de câncer.

Este experimento faz parte do projeto de mestrado de Valentina Soffner Jorge Bonilha, aluna do Programa de Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento, do Curso de Biotecnologia Médica – Hemocentro de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, cujo projeto é intitulado de “Tratamento de Queratose Actínica Disseminada Através da Terapia Fotodinâmica”

4.1.1 Material e método

Para o acompanhamento da fotodegradação da PpIX foram incluídos 9 pacientes com Queratose Actínica intensa, localizadas em braços, antebraços e mãos, atendidos no Departamento de Pele do Hospital Amaral Carvalho. Os pacientes/acompanhantes foram orientados nas formas verbal e escrita, onde assinaram um termo de consentimento Livre e Esclarecido.

As medicações utilizadas, aplicadas pela Dra. Ana Gabriela, foram o Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) (FSUESCC “NIOPIIK” B SADAVAYAd. 1K4, Moscou, Rússia) na concentração de 15% em emulsão de água QSP, Nipagen 0,5, Propilerglicerol 5%, Nipasol 0,05%, Polowax N,S 18%, manipulado pela farmácia autorizada pela Instituição.

O aparelho (protótipo) que foi utilizado para a irradiação foi desenvolvido pelo Grupo de Óptica, Laboratório de Biofotônica e Laboratório de Apoio Técnico (LAT) do Instituto de Física de São Carlos. Ele é denominado Kerato PDT e está apresentado na figura 50. Este sistema é constituído por LEDs, com comprimento de onda centrado em 630 nm, que estão dispostos em placas de alumínio que cobrem toda região do braço, antebraço e mãos. O sistema possui controle de regulagem de intensidade dos LEDs máxima de $60\text{mW}/\text{cm}^2$, que foi a utilizada neste experimento.

Figura 50 - Aparelho de tratamento de Queratose Actínica – Kerato PDT

Para o acompanhamento da fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação, foi utilizado o sistema desenvolvido de imagens de fluorescência e uma

câmera fotográfica -SONY H50- acoplada ao sistema, para registro das imagens. Todas as imagens foram obtidas com uma lente macro, de 74mm, e utilizou-se o aumento óptico da câmera de 6x. Como consequência deste aumento, o campo de visão foi de apenas 2,0 cm.

O procedimento de TFD em pacientes com Queratose Actínica iniciava-se com a documentação do paciente e demarcação das lesões com uma caneta hidrográfica. Após a demarcação, eram feitas fotografias das lesões utilizando luz branca, sem o auxílio do sistema. Subseqüentemente, eram feitas fotografias de fluorescência com o sistema desenvolvido.

Para realizar o procedimento, foi realizada curetagem em ambos os membros superiores. Em seguida, foi feita uma limpeza com água destilada e foram administrados 3,0 gramas em cada membro superior, por via tópica de ALA. Em seguida, os membros foram cobertos por filme plástico de PVC, envolvidos por papel alumínio, e finalmente cobertos com atadura de crepe.

Após o tempo de permanência de 2 horas com ALA, foi feita a limpeza dos membros, retirando todo medicamento tópico da pele, e o paciente encaminhado para o aparelho Kerato PDT para inicialização da iluminação da TFD.

O tempo de irradiação utilizado foi de 40 minutos, resultando em uma fluência de $144\text{J}/\text{cm}^2$.

O paciente recebeu uma medicação oral para analgesia, conforme prescrição feita pela médica responsável, 10 minutos antes do início do TFD. Ao término do procedimento, o paciente e/ou acompanhante receberam orientações verbais e por escrito sobre o uso de fotoprotetor, emolientes e medicações analgésicas.

Antes de se iniciar a irradiação, eram feitas imagens com iluminação branca e com o sistema de fluorescência, aqui considerada como tempo 0 minutos.

A fim de se acompanhar a fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação, foram feitas imagens com o sistema de fluorescência, em tempos de 0 minutos, ou seja, antes da irradiação e após o início da irradiação em tempos de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos. Todas as imagens de fluorescência foram obtidas em uma sala escura, para que a iluminação ambiente não interferisse nas imagens de fluorescência capturadas. A cada aquisição de imagem, a irradiação do sistema Kerato PDT foi interrompida.

Para a quantificação da fotodegradação da PpIX foram selecionadas 30 lesões, onde cada lesão possui um conjunto de 12 imagens de fluorescência que correspondem aos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos de irradiação.

As imagens de fluorescência selecionadas passaram por um algoritmo de quantificação da PpIX escrito em Matlab[®] 7.5 (The MathWorks, USA). O algoritmo consiste basicamente na quantificação de intensidade da matriz de cores R da imagem RGB.

4.1.2 Resultados e discussão

A sequência de imagens da fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação é mostrada na Figura 51, onde a sequência de imagens é representada de A a L como os tempos de coleta das imagens de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos durante a irradiação, consecutivamente.

A sequência de imagens da Figura 51 representa as imagens de fluorescência sem processamento, onde a região do verde é devido, principalmente, à autofluorescência da pele. A fluorescência na região do vermelho é devido à PpIX.

Na Figura 51 é observado que a fluorescência na região do vermelho, ou seja, fluorescência da PpIX vai diminuindo em função do tempo de irradiação, evidenciando os processos de fotodegradação da PpIX.

Figura 51 - Imagens de fotodegradação da PpIX em função do tempo – Sem processamento

Na Figura 52 é mostrada a sequência de imagens utilizando o algoritmo de processamento escrito em Matlab, evidenciando a fluorescência da PpIX.

Figura 52 - Imagens de fotodegradação da PpIX em função do tempo – Com processamento

Por processamento das imagens, foi quantificado a intensidade de fluorescência da PpIX. Para cada conjunto de 12 imagens, foi calculada a intensidade de uma região selecionada. Em seguida, foram normalizadas pelo máximo de intensidade de fluorescência, que corresponde ao tempo 0.

Na Figura 53 é apresentado o gráfico de fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação das 30 lesões selecionadas. Observa-se um decaimento exponencial em função do tempo de irradiação.

No protocolo empregado, para as lesões de Queratose Actínica, o tempo de 15 minutos de irradiação indica estar associado com a degradação de quase a totalidade da PpIX formada no tecido.

Figura 53 - Gráfico de fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação

No gráfico da Figura 53, observa-se que a fotodegradação se estabiliza com intensidade ao redor de 0,5, o que pode levar a uma interpretação equivocada de que não ocorreu toda a fotodegradação da PpIX. Este equívoco pode ser resolvido utilizando a autofluorescência da pele como linha de base.

Na sequência de imagens, antes da aplicação da pomada com ALA, da Figura 54, tem-se em A uma imagem com iluminação branca, onde uma lesão de

Queratose Actínica se localiza ao centro; em B, tem-se a imagem de autofluorescência da lesão; e, em C, tem-se uma imagem apenas com a componente do vermelho da imagem B. Na imagem C é evidenciado que a autofluorescência da pele também apresenta uma pequena porção de fluorescência na região do vermelho.

Figura 54 - Imagens de fluorescência – Antes do início do tratamento

Na sequência de imagens, após 2 horas da aplicação da pomada com ALA, da Figura 55, tem-se em A uma imagem com iluminação branca; em B, a imagem de fluorescência da lesão marcada em vermelho pela fluorescência da PpIX; e, em C, uma imagem apenas com a componente do vermelho da imagem B. Na imagem C fica evidente que há uma grande fluorescência da PpIX na região do vermelho.

Figura 55 - Imagens de fluorescência – No início do tratamento – 0 minutos

Na sequência de imagens, após 40 minutos de irradiação, da Figura 55, temos em A uma imagem com iluminação branca; em B, a imagem de fluorescência da lesão marcada por uma pequena fluorescência na região do vermelho pela fluorescência da PpIX; e, em C, uma imagem apenas com a componente do vermelho da imagem B. Na imagem B e C fica evidente que ocorreu a fotodegradação da PpIX em função da irradiação e que ainda existe uma pequena fluorescência na região do vermelho.

Figura 56 - Imagens de fluorescência – No final do tratamento – 40 minutos

Tendo como base que a quantificação da PpIX é dada pela fluorescência na região do vermelho e evidenciando que existe uma pequena fluorescência na região do vermelho das imagens antes da aplicação da pomada a base de ALA, (Figura 54, imagens B e C, onde esta fluorescência não é de interesse nesta quantificação) é, então, necessário subtrair esta fluorescência das imagens de fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação, para que não seja entendido erroneamente que toda a PpIX foi degradada.

No gráfico da Figura 57 tem-se o monitoramento da fotodegradação da PpIX, que corresponde aos pontos quadrados de A. Observa-se que não existe mais uma diminuição de intensidade a partir de 10 minutos, onde a intensidade se estabiliza ao redor de 0,4. Fazendo a quantificação da fluorescência na região do vermelho da

imagem antes da aplicação da pomada a base de ALA e, subtraindo das imagens de todos os tempos de irradiação, tem-se, então, um novo gráfico de fotodegradação dado na Figura 57, como círculos.

Evidencia-se desta forma que provavelmente ocorreu a degradação de toda a PpIX superficial produzida pelo tecido.

Figura 57 - Gráfico comparativo – Com e sem linha de base

O estudo da fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação é de extrema importância para a dosimetria na TFD, pois como são apresentados nos gráficos de fotodegradação, a partir de 10 minutos de irradiação provavelmente toda a PpIX foi degradada. Sendo assim, não seria mais necessário mais 30 minutos de irradiação já que o procedimento de TFD só é efetivo no momento em que os 3 elementos básicos da terapia estão presentes, ou seja, o agente fotosensibilizador, que neste caso é a presença de PpIX,; a fonte de irradiação; e o oxigênio molecular.

No momento que um destes itens deixa de existir, a terapia não tem mais efeito.

Diante destes dados, é possível planejar uma terapia com maior efetividade, já que os dados apontam que não seria necessário o tempo de irradiação de 40 minutos, empregando a irradiância do equipamento, e sim a terapia poderia ter sido realizada com apenas 10 minutos de irradiação, trazendo grandes vantagens para o paciente.

4.1.3 Conclusão

Com este experimento foi possível evidenciar que a partir de 10 minutos de irradiação toda a PpIX foi degradada, empregando o protocolo, mostrando que o sistema de imagens de fluorescência desenvolvido pode ser utilizado como uma ferramenta de extrema importância para o estudo da dosimetria do tratamento da Queratose Actínica por TFD.

4.2 FOTODEGRADAÇÃO DA PROTOPORFIRINA IX – HPV

Este trabalho faz parte do projeto financiado pelo CNPq Processo nº 551201-2007, que pretende desenvolver e implementar a TFD no tratamento ambulatorial de lesões em vulva, vagina e ânus causadas por Papilomavírus humano (HPV). Trata-se de estudo do tipo caso-controle, que se iniciou em junho de 2008.

4.2.1 Material e método

O projeto foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), em sua 265ª Reunião Ordinária, realizada em 28 de abril de 2008 e enquadrado na categoria APROVADO, de acordo com o Processo HCRP no 2079/2008. Também foi aprovado pelo Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão do Centro Universitário de Araraquara, em reunião realizada dia 11 de setembro de 2008, Ofício 33/2008-CIEPesquisa/UNIARA.

A seleção das pacientes está sendo consecutiva e não aleatória. Estão sendo selecionadas pacientes encaminhadas ao Ambulatório do Setor de Moléstias Infecto-Contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (SEMIGO) devido ao diagnóstico de infecção pelo HPV (clínica e/ou subclínica) portadoras ou não da infecção pelo HIV e também do Posto de Saúde do Jardim Paulstano associado à Faculdade de Medicina da UNIARA, em Araraquara.

O objetivo do projeto é o desenvolvimento e a implantação da TFD no tratamento ambulatorial do condiloma acuminado. Foi selecionado um grupo de 10 pacientes que apresentavam lesões clínicas HPV induzidas (condilomas), confirmadas previamente por biópsia e exame anátomo-patológico das lesões. Todas as pacientes são assistidas pelo Ambulatório do Setor de Moléstias Infecto-Contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia e pelo Ambulatório de Genitoscopia da UBS Jardim Paulstano da cidade de Araraquara-SP e submetidas ao protocolo de seguimento onde são realizadas sorologias para as DST (ELISA HBsAg, ELISA Anti HCV, VDRL e ELISA Anti HIV), coleta da colpocitologia tripla, colposcopia e vulvoscopia.

Para a aplicação da TFD, foi desenvolvido um sistema de iluminação utilizando LEDs emitindo em 630nm, acoplados à dispositivos anatômicos

especialmente projetados para cada caso (patente INPI registro no 000022076297595). Esses dispositivos foram desenvolvidos no Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT, IFSC/USP) onde passaram por testes de conformidades dos equipamentos eletromédicos. Este dispositivo desenvolvido para tratamento do HPV pode ser visualizado na Figura 58.

Figura 58 - Sistema de tratamento do HPV

As pacientes foram submetidas previamente à aplicação de pomada à base de ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) sobre as lesões, permanecendo de 4 a 6 horas sob o efeito desta medicação e, após este período foram submetidas às unidades de iluminação, utilizando-se os LED, por aproximadamente 20 minutos. A intensidade utilizada foi de aproximadamente 150 mW/cm^2 .

Para o acompanhamento da fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação, foi utilizado o sistema desenvolvido de imagens de fluorescência e uma câmera fotográfica SONY H50, acoplada ao sistema para registro das imagens. Todas as imagens foram tiradas com uma lente macro 74 milímetros e utilizou-se o aumento óptico da câmera de 6x, como anteriormente.

A fim de se acompanhar a fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação foram feitas imagens com o sistema de fluorescência em tempos de 0

minutos, ou seja, antes da irradiação e após o início da irradiação em tempos de 2, 4, 6, 8 minutos. Todas as imagens de fluorescência foram obtidas em uma sala escura, para que a iluminação ambiente não mascarasse as imagens de fluorescência capturadas. A cada aquisição de imagem a irradiação do sistema de tratamento do HPV era interrompida.

Para a quantificação da fotodegradação da PpIX foi selecionada 1 lesão, onde esta possui um conjunto de 5 imagens de fluorescência, que correspondem aos tempos de 0, 2, 4, 6 e 8 minutos de irradiação.

As imagens de fluorescência selecionadas passaram por um algoritmo de quantificação da PpIX, escrito em Matlab[®] 7.5 (The MathWorks, USA). O algoritmo consiste basicamente na quantificação de intensidade da matriz de cores R da imagem RGB.

4.2.2 Resultados e discussão

A sequência de imagens da fotodegradação da Protoporfirina IX (PpIX), em função do tempo de irradiação é mostrada na Figura 59, onde a sequência de imagens é representada de A a F: A representa uma imagem utilizando iluminação branca, e de B a F os tempos de coleta das imagens de 0, 2, 4, 6, 8 minutos durante a irradiação, respectivamente.

A sequência de imagens da Figura 59, de B a F, representa as imagens de fluorescência sem processamento, onde a fluorescência na região do verde é relativa à autofluorescência da pele e a fluorescência na região do vermelho é relativa à PpIX.

Na Figura 59 é observado que a fluorescência na região do vermelho, ou seja, fluorescência da PpIX vai diminuindo em função do tempo de irradiação, evidenciando os processos de fotodegradação da PpIX.

Figura 59 - Fotodegradação da PpIX – sem processamento

Na Figura 60 é mostrada a sequência de imagens utilizando o algoritmo de processamento escrito em Matlab, onde é mostrada somente a fluorescência da PpIX.

Figura 60 - Fotodegradação da PpIX – Imagens processadas

Com a utilização do processamento das imagens foi quantificado a intensidade de fluorescência da PpIX. Para o conjunto de 5 imagens, onde foi calculada a intensidade de toda a imagem, após o cálculo da intensidade, estas foram normalizadas pelo máximo de intensidade de fluorescência, que corresponde ao tempo 0.

Na Figura 61 é mostrado o gráfico de fotodegradação da PpIX em função do tempo de irradiação da lesão selecionada, onde a fotodegradação decai exponencialmente com o tempo de irradiação, que está ao redor de 8 minutos de irradiação, evidenciando que após 8 minutos de irradiação toda a PpIX foi degradada.

Figura 61 - Gráfico de fotodegradação da PpIX em função do tempo

4.2.3 Conclusão

Os dados obtidos com o experimento de fotodegradação da PpIX no tratamento do HPV por TFD são similares aos dados obtidos no trabalho de fotodegradação da PpIX para tratamento da Queratose Actínica por TFD, evidenciando que o sistema de imagens de fluorescência desenvolvido também pode ser utilizado nos trabalhos da dosimetria da TFD para o tratamento do HPV.

4.3 VISUALIZAÇÃO DE COLONIAS MICROBIANAS ORAIS

Este experimento faz parte do projeto de mestrado de Vitor Hugo Panhoca , aluno do Programa de Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento, do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, cujo projeto é intitulado de “Efeitos da Terapia Fotodinâmica no controle bacteriano na superfície dentária comparando uso de pastilha e spray contendo fotossensibilizador”.

O sistema desenvolvido visa o auxílio do profissional da odontologia na identificação do biofilme oral, aqui foram explorados apenas alguns dados obtidos já que o projeto ainda está em andamento, assim serão apresentados alguns resultados e futuras aplicações deste sistema.

A Figura 62 mostra a colonização por bactérias nos dentes, através da imagem de fluorescência na região do vermelho, indicado pelas setas. Esta imagem foi realizada após 36 horas da última escovação do voluntário. Esta colonização se deve a não higienização, promovendo o processo de proliferação de bactérias.

Figura 62 - Dentes com colonização de bactérias

Na Figura 63 observa-se pela imagem de fluorescência na região do vermelho, a colonização por bactérias na região da língua, devido à não higienização. Esta imagem foi obtida após 36 horas da última escovação.

Figura 63 - Língua com colonização de bactérias

Outra aplicação que poderá ser explorada com o sistema é a identificação e visualização de outros materiais presentes na região bucal, tais materiais podem ser resinas oriundas de restaurações, prótese dentaria e outros matérias.

Essa diferenciação é possível através da fluorescência de cada composto, um exemplo desta diferenciação é apresentado na Figura 64, onde na Figura 64 - A temos uma imagem utilizando iluminação branca e na Figura 64 – B temos uma imagem de fluorescência. Na imagem de fluorescência é possível identificar uma fluorescência bem acentuada na região do verde dada pelos dentes naturais que estão na borda da imagem e a ausência de fluorescência nos 3 dentes ao centro, que são próteses.

Figura 64 - Imagem de diferenciação de materiais através de fluorescência – A- imagem com iluminação branca e B – imagem de fluorescência

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O desenvolvimento do sistema de imagem de fluorescência mostrou-se ser um protótipo auxiliar para tratamentos realizados por terapia fotodinâmica.

Foi ainda possível desenvolver um sistema compacto, agregando iluminação e visualização, tornando-o num protótipo com interface para uso clínico.

Um dos principais fatores para obtenção de bons sinais de fluorescência é a potência óptica do sistema de iluminação, que neste caso foi de 250mW. Outro fator é o comprimento de onda da iluminação obtido, com uma banda de iluminação

eficaz de 390nm a 460nm e que possui boa uniformidade para excitação das amostras. O sistema de filtros ofereceu um excelente sinal de fluorescência, bem como um bom contraste.

Com este sistema foi possível acompanhar a fotodegradação da PpIX em função do tempo de iluminação durante a TFD tanto para a TFD aplicada para Queratose Actínica, quanto para TFD aplicado no tratamento do HPV. Assim, proporcionando uma nova ferramenta extremamente importante para o avanço da dosimetria da TFD, podendo otimizar e personalizar a TFD para cada paciente, já que o sistema desenvolvido permite a visualização da presença do agente fotossensível na Terapia.

Outro ponto de extrema importância também alcançado foi a visualização da presença de microrganismos da microbiota oral, já que estes são os grandes responsáveis pelas doenças bucais como é o caso da cárie dental.

Desta forma, conclui-se que um novo protótipo, para o auxílio efetivo da visualização do biofilme bucal e indispensável para dosimetria em técnicas de terapia fotodinâmica foi desenvolvido neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. BERTOLINI, W.L.H.M. (2009). **A influência do D-limoneno como promotor de absorção de ácido 5-aminolevulínico para Terapia Fotodinâmica do câncer de pele:** avaliação in vitro e in vivo da permeação e retenção cutâneas. 73f.Tese(Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
2. BOYLE, P.; LEVIN, B. (2008). **World cancer report**. Lyon: IARC.
3. STEWART, B.W.; P. KLEIHUES (2003). **World Cancer Report**. Lyon: IARC.
4. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER(2009). **Estimativa 2010:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA.
5. BADIZADEGAN, K. et al. (2004). Spectroscopic diagnosis and imaging of invisible pre-cancer. **Faraday Discuss**, v.126, p. 265-79;
6. WAGNIERES, G.A.; STAR, W.M.; WILSON, B.C. (1998). In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. **Photochemistry Photobiology**, v.68, n.5, p. 603-32.
7. MELLER, C. et al., (2006). A new in vivo method for measuring cáries activity using quantitative light-induced fluorescence. **Caries Research**, v.40, n.2, p. 90-6.
8. ROBLYER, D. et al., (2008). Multispectral optical imaging device for in vivo detection of oral neoplasia. **Journal Biomedical Optics**, v.13, n.2, p. 024019.
9. PIERCE, M.C.; JAVIER, D.J.; RICHARDS-KORTUM, R. (2008). Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of cancer. **International Journal of Cancer**, v.123, n.9, p. 1979-90.
10. POH, C.F. et al. (2006). Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v.12, n.22, p. 6716-22.
11. ROBLYER, D. et al. (2009). Objective detection and delineation of oral neoplasia using autofluorescence imaging. **Cancer Prevention Research**, v.2, n.5, p. 423-31.
12. ROBLYER, D. et al. (2008). Multispectral optical imaging device for in vivo detection of oral neoplasia. **Journal of Biomedical Optics**, v.13, n.2, p 1-11.
13. ROBLYER, D. et al. (2007). Objective screening for cervical cancer in developing nations: lessons from Nigeria. **Gynecologic Oncology**, v.107, n.1, p. S94-S97.

14. ROBLYER, D.M. (2009). **Multispectral Optical Imaging for the Detection and Delineation of Oral Neoplasia**. 137f.Tese(Doutorado) - The University of Texas, Rice University, Houston, 2009.
15. ZHANG, L. et al. (2007). Direct fluorescence visualization (FV) as an adjunct tool in identifying high-risk oral lesions. **Oral Oncology**, v.2, n.1, p. 121-122.
16. POH, C.F. et al. (2006). Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v.12, n.22, p. 6716-6722.
17. POH, C.F. et al. (2007). Direct fluorescence visualization of clinically occult high-risk oral premalignant disease using a simple hand-held device. **Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v.29, n.1, p. 71-76.
18. LANE, P.M. et al. (2006). Simple device for the direct visualization of oral-cavity tissue fluorescence. **Journal of Biomedical Optics**, v.11, n.2, p.1-7
19. VELscope. (2009). **VELscope System**. Disponível em: <http://www.velscope.com/velscope.php>. Acesso em: 13 Dec. 2009.
20. AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M. (2001). Diagnosis of dental caries using quantitative light-induced fluorescence. **Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine**, v.2, n.32, p. 110-117
21. HEINRICH-WELTZIEN, R. et al. (2003). Quantitative light-induced fluorescence (QLF) - a potential method for the dental practitioner. **Quintessence International**, v.34, n.3, p. 181-188.
22. HOGAN, M.M. et al. (2003). Detection of early artificial caries with QLF and DIAGNOdent. **Journal of Dental Research**, v.82, p. B63-B63.
23. PRETTY, I.A.; EDGAR, W.M.; HIGHAM, S.M. (2003). The erosive potential of commercially available mouthrinses on enamel as measured by quantitative light-induced fluorescence (QLF). **Journal of Dentistry**, v.31, n.5, p. 313-319.
24. PRETTY, I.A. et al. (2003). Detection of in vitro demineralization adjacent to restorations using quantitative light induced fluorescence (QLF). **Dental Materials**, v.19, n.5, p. 368-374.
25. STOOKEY, G.K., (2004). Optical methods--quantitative light fluorescence. **Journal Dental Research**, v.83, p.C84-8. Spec No C.
26. INSPEKTORDENTALCARE. (2009). **QLF (Quantitative Light-Induced Fluorescence)**. Disponível em: <http://www.inspektordentalcare.com/en/index.asp>. Acesso em: 14 Dec. 2009.
27. WOLF, D.E. (2007). Fundamentals of fluorescence and fluorescence microscopy. **Methods Cell Biology**, v.81, p. 63-91.

28. LAKOWICZ, J.R. (2006). **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer
29. SIMON, L.L.; RUBINSTEIN, D. (2006). Imaging of oral cancer. **Otolaryngology Clinical North American**, v.39, n.2, p. 307-17, vi.
30. PANJEHPOUR, M. et al. (2002). In vivo fluorescence spectroscopy for diagnosis of skin cancer. **Biomedical Diagnostic, Guidance, and Surgical-Assist Systems Iv**, v.4615, p. 20-31
31. BRANCALEON, L. et al. (2001). In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. **Photochemistry and Photobiology**, v.73, n.2, p. 178-183.
32. MURPHY, D.B. (2001). **Fundamentals of light microscopy and electronic imaging**. Wiley-Liss.
33. EXFO (2009). **X-Cite® 120Q vs. HBO 100 spectral comparison**. Disponível em: <http://www.exfo-xcite.com/downloads/Graphs/relative-output-120q-vs-hbo100.pdf>. Acesso em: 20 July 2009.
34. OPTO, E. (2008). **EdiPower series**. Disponível em: <http://www.edison-opto.com.tw/material/pdf/EdiPower%20series%20 Eng v3.pdf>. Acesso em: 20 July 2008.
35. EDISON (2007). **Optical characteristics**. Disponível em: <http://www.edison-opto.com.tw/optical.asp>. Acesso em: 15 July 2007.
36. REICHMAN, J. (1998). **Handbook of optical filters for fluorescence microscopy**. USA: Chroma Technology.
37. DOUGHERTY, T.J. et al. (1998). Photodynamic therapy. **Journal National Cancer Institute**, v.90, n.12, p. 889-905.
38. GOLD, M.H. (2009). Fractionated aminolevulinic acid-photodynamic therapy (PDT) provides additional evidence for the use of PDT for non-melanoma skin cancer. **Journal Europe Academy Dermatology Venereology**, v 23., n 5., p 571-572.
39. GOLD, M.H. (2007). Photodynamic therapy in dermatology: the next five years. **Dermatology Clinical**, v.25, n.1, p. 119-20.
40. FOTINOS, N. et al. (2006). 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: characteristics, application and perspectives. **Photochemistry Photobiology**, v.82, n.4, p. 994-1015.
41. WILSON, M. (2004). Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochemical Photobiology Science**, v.3, n.5, p. 412-8.

42. NASCIMENTO, D.F.F.; SILVA, A.M.; MARCHINI, L. (2006). O papel das bactérias orais em doenças sistêmicas. **Revista ABO nacional**, v.14, n.2, p. 117-122.
43. EDISON (2006). **Ultraviolet edixeon**. Disponível em: ftp://59.124.8.220/ftp/Datasheet/Edixeon/Edixeon%20S%20series%20Eng_v3.pdf. Acesso em: 10 Jan.2006.
44. Corporation, E.O. (2006). **Ultraviolet edixeon**. Disponível em: ftp://59.124.8.220/ftp/Datasheet/Edixeon/Edixeon%20S%20series%20Eng_v3.pdf. Acesso em: 10 Jan. 2006.
45. OSRAM (2008). **Diamond DRAGON** - the brightest star of the DRAGON family. Disponível em: <http://catalog.osram-os.com/catalogue/catalogue.do?favOid=000000030003df6601740023&act=showBookmark>. Acesso em: 29 Feb. 2008.
46. EDISON (2009). **Optical characteristics**. Disponível em: <http://www.edison-opto.com.tw/optical.asp>. Acesso em: 15 July 2009.