UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

VICTOR ANTONIO CACCIACARRO LINCOLN

**Avaliação da radiação UV na córnea humana em
procedimentos oftalmológicos**

São Carlos - SP
2012

VICTOR ANTONIO CACCIACARRO LINCOLN

**Avaliação da radiação UV na córnea humana em
procedimentos oftalmológicos¹**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Programa de
Engenharia Elétrica.

Área de Concentração: Processamento de
Sinais e Instrumentação

Orientadora: Profa. Dra. Liliane Ventura

São Carlos – SP
2012

¹ Trata-se da versão corrigida da tese. A versão original se encontra disponível na EESC/USP que
aloja o Programa de Pós-Graduação de Engenharia Elétrica.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

L739a Lincoln, Victor Antonio Cacciacarro
Avaliação da radiação UV na córnea humana em
procedimentos oftalmológicos. / Victor Antonio
Cacciacarro Lincoln; orientador Liliane Ventura. São
Carlos, 2012.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica e Área de Concentração em
Processamento de Sinais e Instrumentação -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2012.

1. Córnea. 2. Ultravioleta. 3. Transmitância. 4.
Absorbância. 5. UV. 6. Crosslinking. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **VICTOR ANTONIO CACCIACARRO LINCOLN**.

Título da tese: "Avaliação da radiação UV na córnea humana em procedimentos oftalmológicos".

Data da defesa: 10/08/2012

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Associada **Liliane Ventura Schiabel (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Prof. Dr. **Leonardo Vidal Batista**
(Universidade Federal da Paraíba/UFPB)

APROVADO

Prof. Dr. **Luís Antonio Gorla Marcomini**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADO

Prof^a. Dr^a. **Cristina Kurachi**
(Instituto de Física de São Carlos/USP)

APROVADO

Prof. Associado **Adilson Gonzaga**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Presidente da
Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Dedico este trabalho a minha amada esposa Leila, por todo amor, dedicação, apoio incondicional e paciência absoluta durante esta longa jornada.

Agradecimentos

A Profa. Dra. Liliane Ventura Schiabel pelo excepcional apoio e incentivo em todos os meus projetos, pela grande amizade e confiança depositada, e pela idealização e orientação durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Sidney Julio de Faria e Sousa pela grande inspiração e genialidade em todos os conselhos e discussões que contribuíram para a concretização deste trabalho e para o meu crescimento intelectual e científico.

A minha esposa Leila pelo suporte psicológico e emocional, sem os quais não seriam possível a conclusão deste trabalho.

A toda minha família pelo suporte e incentivo, especialmente ao meu pais Fábio e Téco, pelo apoio, dedicação e inspiração, e aos meus irmãos Fábio e Renato pelo companheirismo e momentos de reflexão.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Elétrica, principalmente a Jussará, Marisa e Rui Berto.

Aos funcionários do Banco de Olhos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela pronta assistência na manipulação dos matérias biológicos e pelo incrível trabalho de captação de córneas.

A todas as famílias que perderam seus entes queridos e mesmo na hora mais difícil se mostram altruístas e optaram pela doação.

A todos alunos e amigos que passaram pelo LIO, especialmente ao Nelson, Márcio e Daniel.

Aos meus grandes amigos e conselheiros que sempre ajudaram nos momentos mais difíceis, especialmente ao Marco Aurélio e Davison.

A Universidade de São Paulo (USP) por me possibilitar não só uma excelência técnica mas também pelo crescimento ético e moral.

A Fundação de Amparo a Pesquisa Científica do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (2010/06299-0).

Em fim, a todos que de alguma forma foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigado!

“A alegria de ver e entender é o mais perfeito dom da natureza.”

(Albert Einstein)

RESUMO

LINCOLN, V. A. C. **Avaliação da radiação UV na córnea humana em procedimentos oftalmológicos.** 2012. 192 f. Tese (Doutorado Direto) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A radiação ultravioleta pode tanto ser um benefício, como um malefício para o olho humano. Os benefícios são quando é utilizada em procedimentos oftalmológicos para a correção da visão, como nas cirurgias foto-refrativas – UVC – 193nm; ou para, entre outros tratamentos, impedir a progressão de patologias, como é o caso do *crosslinking* do colágeno corneano, para ceratocones em estágios iniciais – que utiliza UVA – 370nm. Os malefícios são os já amplamente conhecidos pela comunidade científica e populacional, sobre a incidência excessiva de radiação UV nos olhos, causando danos severos ao olho humano. Entretanto, a córnea tem uma proteção natural contra os raios UVA e UVB. Neste trabalho, estudou-se os dois procedimentos oftalmológicos citados a fim de investigar possíveis danos ao olho humano, como a perda da proteção natural da córnea pós cirurgia foto-refrativa, que retira lamelas da córnea; e a quantidade de radiação que adentra o olho humano, durante o *crosslinking* do colágeno corneano, que utiliza Riboflavina como sintetizador e bloqueador da radiação UVA. Um sistema portátil foi desenvolvido para avaliação da proteção UV e seus danos para o primeiro caso. O protótipo consiste de um sistema de duplo feixe e analisa a transmitância do tecido corneano na faixa de 300-400nm, e apresenta um fator de correlação $r^2 > 0,98$. As medidas com remoção de tecido indicaram a importância das camadas da córnea, e a remoção do estroma apresentou uma perda significativa da proteção natural UV, com aumento de 8,2–10,1 pontos percentuais. Já para o *crosslinking*, que utiliza a combinação riboflavina e UVA, com irradiância de $3\text{mW}/\text{cm}^2$ por 30 minutos foi feito o monitoramento da transmitância UVA durante o tratamento. Foi realizado o protocolo do procedimento atual, ou seja, uma gota de Riboflavina 0,1%, 400mOsm, foi instilada na córnea desepitelizada, a cada 5 minutos (total de 12 gotas). A irradiação UV ($365\pm 5\text{nm}$, $3\text{mW}/\text{cm}^2$) foi realizada após 30min de instalação por uma adicional de mais 30min. A transmitância média da córnea desepitelizada sem Riboflavina foi de 61,6%; após a 1ª instilação de Riboflavina a transmitância foi de 44,9%; após a 6ª gota 22,4%; após a 7ª gota (início da irradiação), 19,5%; após a 8ª gota, 17,3%; após a 9ª, 15,8%; após a 10ª, 14,5%; após a 11ª, 13,5%; e após a 12ª instilação, 12,6%. A transmitância média em termos de energia durante os 30min de irradiação apresentou uma variação de 0,590 até $0,380\text{mW}/\text{cm}^2$, valores além do limite atualmente aceito para endotélio de córneas de coelhos, que apresenta um nível de segurança citotóxico de $0,36\text{mW}/\text{cm}^2$.

Palavras-Chave: córnea, ultravioleta, transmitância, absorbância, UV, *crosslinking*

ABSTRACT

LINCOLN, V. A. C. **Evaluation of UV radiation on human cornea in ophthalmic procedures.** 2012. 192 f. Tese (Doutorado Direto) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Ultraviolet radiation can either be a benefit as an harm to the human eye. The benefits are when used in ophthalmic procedures for vision correction, as in the photorefractive surgery - UVC - 193nm; or to, among other treatments, preventing the progression of diseases, such as the corneal collagen crosslinking, for keratoconus in the early stages - that uses UVA - 370nm. The harm effects are already widely known by the scientific community and general population, about excessive incidence of UV radiation in the eye, that can cause severe damage to the human eye. However, the cornea has a natural UVA and UVB protection. In this work, we studied the two ophthalmic procedures cited in order to investigate possible damage to the human eye, as the loss of cornea UV natural protection after photorefractive surgery, which removes corneal lamella; and the amount of radiation that penetrates the human eye during the corneal collagen crosslinking, that uses Riboflavin as a synthesizer and UVA radiation blocking. A portable system was developed to evaluate the UV protection and the UV damage for the first case. The prototype consists of a double beam system that analyzes the corneal tissue transmittance in the 300-400nm range, and presents a correlation factor $r^2 > 0.98$. Measurements with tissue removal showed the importance of each corneal layer, specially the stroma removal that shows a significant loss of natural UV protection, with an increase of 8.2 to 10.1 percentage points. As for the crosslinking, using riboflavin and UVA irradiance combination, with $3\text{mw}/\text{cm}^2$ for 30 minutes, was performed a monitoring of UVA transmittance during treatment. Current procedure protocol was performed, i.e., one drop of riboflavin 0.1%, 400mOsm, was applied on the naked cornea, every 5 minutes (total of 12 drops). The UV irradiation ($365\pm 5\text{nm}$, $3\text{mW}/\text{cm}^2$) was performed after 30min of instillation for an additional 30min. The average transmittance of the desepithelized cornea without Riboflavin is 61.6%; after the 1st drop of Riboflavin, transmittance is 44.9%; after 6th drop 22.4%; after 7th drop (irradiation starts), 19.5%; after 8th drop; 17.3%; after 9th drop, 15.8%; after 10h drop, 14.5%; after 11th drop, 13.6%; after 12th drop, 12.6%. The average transmittance in terms of energy during the 30min irradiation procedure fluctuated from 0.590 to $0.380\text{mW}/\text{cm}^2$, beyond the currently accepted rabbit corneal endothelium safety limit for cytotoxic level of $0.360\text{mW}/\text{cm}^2$.

Key-words: cornea, ultraviolet, transmittance, absorbance, UV, *crosslinking*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: O olho humano e suas estruturas. Imagem adaptada do site http://www.blundelloptometry.com/anatomy.htm , acessado em 27/05/2009.	33
Figura 2: (a) Esquema das cinco camadas da córnea. Figura adaptada do site: http://www.lasik.md/learnaboutlasik/proceduresintroduction.php , acessado em 12/06/2009. (b) Fotomicrografia; 1) Epitélio, 2) Membrana de Bowman, 3) Estroma, 4) Membrana de Descemet, 5) Endotélio. Adaptado do site: http://www.missionforvisionusa.org/anatomy/2005/10/cornea-histology.html , acessado em 12/06/2009.	34
Figura 3: Córnea do Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, utilizada nas medidas.	36
Figura 4: Espectro de emissão do Sol. Imagem retirada e adaptada do site: http://www.webartigos.com/articles/25877/1/raios-ultravioleta/pagina1.html , acessado em 05/12/2009.	37
Figura 5: Espectro eletromagnético e a região do ultravioleta. Imagem retirada do site: http://satelite.cptec.inpe.br/uv/R-UV.html , acessado em 28/05/09.....	37
Figura 6: Distribuição de energia pelo comprimento de onda. Imagem adaptada do site: http://www.webartigos.com/articles/25877/1/raios-ultravioleta/pagina1.html , acessado em 05/12/2009.	38
Figura 7: Absorção UV no meio ocular. Adaptado de Farrell e McCally (1987).	39
Figura 8: Esquema do PRK. Imagem adaptada do site: http://www.eyesurgeryusa.com/john-teahan/corrective-eye-surgery-procedures-albuquerque.htm , acessado em 05/12/2009.	43
Figura 9: Curvas de concentração de Riboflavina – Transmitância ultravioleta por espessura. Adaptado de SPÖRL et al. (2000).	44
Figura 10: Diagrama do procedimento do <i>Crosslinking</i>	45
Figura 11: Espectrofotômetro <i>Ocean Optics HR4000CG-UV-NIR</i> . Imagem retirada do site: http://www.oceanoptics.com/Products/ready-to-ship.asp , acessado em 05/03/2010.	46
Figura 12: Espectrofotômetro <i>UV-Visível-IR – Cary 5000 (VARIAN)</i> . Imagem retirada do site: http://www.ati.surrey.ac.uk/facilities/optical_suite , acessado em 05/03/2010.	47
Figura 13: Globo ocular antes da retirada da córnea. Foto feita no Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto em 2009.	51

Figura 14: Córnea preservada em <i>Optisol-GS</i>	52
Figura 15: Sistema de duplo feixe desenvolvido: (a) Esquematização dos feixes de referência e de medida; (b) Foto do sistema emitindo luz UV e sendo recebida pelos dois sensores, indicados pelas flechas.....	53
Figura 16: Fontes UV Analisadas: (a) LED: VCC / VAOL-3GUV0Y4; (b) Incandescente: Osram / HQV125W E27; (c) Fluorescente: Philips / TL4W05.....	57
Figura 17: a) Fonte fluorescente UV TL4W05 - Philips b) Espectro de emissão da lâmpada obtido no espectrofotômetro.	58
Figura 18: a) Sensor UV EPD-365-0-1.4 / EPIGAP; b) Espectro de sensibilidade disponibilizado pelo fornecedor.	59
Figura 19: Esquemático da fonte de alimentação do sistema. Valores de referência; C1=C2=100 μ F; C3=C4=C5=220nF.	60
Figura 20: Desenho do amplificador de transimpedância do tipo Tee.	61
Figura 21: Pinagem do Potenciômetro Digital MCP41010.....	62
Figura 22: LCD 16x2 (<i>SD-C1602F</i> / <i>Santech</i>) – transmitância com o sistema calibrado.	63
Figura 23: LCD 20x4 (<i>TC2004B-02</i> / <i>TINSHARP</i>) apresentando a transmitância de uma amostra.....	63
Figura 24: <i>MSPF2274 – Target Board</i>	64
Figura 25: Microcontrolador <i>18F4550</i> – Encapsulamento <i>DIP</i>	65
Figura 26: <i>Layout</i> final da <i>PCB</i>	67
Figura 27: <i>PCB</i> de fenolite dupla face.	68
Figura 28: <i>PCB</i> – face da solda e face dos componentes.	68
Figura 29: Sistema UV versão 1.	69
Figura 30: Sistema UV versão 2.	70
Figura 31: Sistema UV versão 3.A.....	71
Figura 32: Sistema UV versão 3.B.....	72
Figura 33: Fluxograma do <i>Software</i> embarcado com <i>display</i> de LCD.....	74
Figura 34: Fluxograma do <i>software</i> com conexão <i>USB</i>	75
Figura 35: Tela do <i>software</i> no PC desenvolvido em Delphi 7.	77

Figura 36: Suportes iniciais. a) Primeira versão; b) Segunda versão.....	78
Figura 37: Suporte final com semi-esfera para os feixes de referência e de teste.	79
Figura 38: Estrutura de metal deslizante.....	79
Figura 39: Montagem dos polarizadores (P1 e P2) de luz UV para estudo da resposta do sensor à onda eletromagnética E1 em função da posição angular θ entre os polarizadores. Retirado e adaptado do site: http://www.physics.brocku.ca/Courses/1P22-Crandles/lightoptics.php , acessado em 05/03/10.	81
Figura 40: Amostras de Acrílico analisadas.	82
Figura 41: Medida UV das amostras de acrílico.....	82
Figura 42: Espectrofotômetro <i>Cary 17</i>	83
Figura 43: Tela com o gráfico de transmitância de calibração.	83
Figura 44: Medida Inicial da córnea <i>in vitro</i>	84
Figura 45: Medida de transmitância de UV (300nm – 400nm) no espectrofotômetro da <i>HR4000CG-UV-NIR</i> : (a) Espectrofotômetro; (b) detalhes do suporte para a fibra ótica de recepção ficar na posição vertical e centralizada.	85
Figura 46: a) Paquímetro PacScan300p. b) Sonda posicionada na córnea.....	86
Figura 47: Diagrama do protocolo.....	87
Figura 48: Medida inicial da transmitância.	87
Figura 49: Remoção do Epitélio.	88
Figura 50: Remoção do Endotélio.....	88
Figura 51: a) Corte lamelar – Microcerátomo. b) Lamela cortada.	89
Figura 52: Paquimetria, suporte e medida.	90
Figura 53: Protocolo do estudo simulado da cirurgia foto-refrativa.	90
Figura 54: Transmitância Inicial.....	91
Figura 55: Remoção Epitelial antes da segunda medida da transmitância UV.	91
Figura 56: Corte lamelar com o microcerátomo simulando a cirurgia foto-refrativa. .	92
Figura 57: Medida da transmitância com o espectrofotômetro <i>Ocean Optics</i>	92

Figura 58: Sistema de medida de espessura com micrômetro mecânico.....	94
Figura 59: Tela visualizada no computador pelo usuário. Seqüência com seis imagens até o contato da ponta do micrômetro com a córnea.	94
Figura 60: Disposição das 8 córneas utilizadas nas medidas de paquimetria.	95
Figura 61: Captação da fluorescência – suporte e posicionamento da fibra óptica. .	97
Figura 62: (a) Desepitelização da córnea; (b) captura do espectro de fluorescência do olho.	97
Figura 63: Captura do espectro de fluorescência da Riboflavina. a) Detalhe do <i>probe</i> de captura da fluorescência; b) Emissão do UV e fluorescência da Riboflavina.	98
Figura 64: Captura do espectro de fluorescência do olho + riboflavina. a) Instalação da riboflavina durante o tratamento; b) Captura do espectro de fluorescência.	98
Figura 65: Captura do espectro de fluorescência da córnea + riboflavina + <i>crosslinking</i> . a) Vista frontal; (b) Vista Lateral.....	99
Figura 66: Espectrofotômetro <i>Cary 5000 – VARIAN</i> , utilizado nas medidas de absorbância espectral das córneas <i>in vitro</i>	100
Figura 67: Espectro de transmitância do <i>Optisol-GS</i>	102
Figura 68: Suporte semi-esferico.....	102
Figura 69: Diagrama do procedimento do <i>crosslinking</i>	103
Figura 70: Suporte semi-esférico com a córnea posicionado no Espectrofotômetro <i>Cary 5000 – VARIAN</i> . Vista superior.	104
Figura 71: Raspagem epitelial da córnea antes do procedimento.	105
Figura 72: Instalação de riboflavina na córnea.	105
Figura 73: Irradiação UV durante o procedimento do <i>Crosslinking</i>	106
Figura 74: Paquimetria da córnea desepitelizada.....	106
Figura 75: Frasco com as informações específicas contendo a córnea utilizada. ..	107
Figura 76: Primeiro suporte – fibra à 50mm a partir do endotélio. a) Vista lateral; b) Vista superior.....	109
Figura 77: Segundo suporte confeccionado: fibra à 100mm a partir do endotélio. a) Durante o ajuste da mira; b) Durante a irradiação do UV.	110
Figura 78: Terceiro suporte confeccionado: fibra à 17,8mm a partir do endotélio. a) Detalhe superior; b) Detalhe lateral.	110

Figura 79: Quarto suporte confeccionado: fibra à 0,3mm a partir do endotélio. a) Vista total do sistema; b) Detalhe do suporte.	111
Figura 80: Sistema de medidas da transmitância do UVA em procedimento de crosslinking corneando em córneas doadas.	112
Figura 81: Linha de base do ar para transmitância obtida no espectrofotômetro USB2000 – Ocean Optics.	112
Figura 82: Comparação do espectro de transmitância da córnea com o da linha de base.	113
Figura 83: Detalhe do aparato de sustentação e de medida da córnea durante os estudos.	114
Figura 84: a) Espectro de transmissão da Fibra; b) Espectro de Linha de Base – UV 3mW/cm ²	115
Figura 85: Última versão do Protótipo UV – 3A.	118
Figura 86: Gráfico da Lei de Malus – Valores Experimental (azul) x Teórico (vermelha).	119
Figura 87: Diagrama de correlação das amostras de acrílico – Protótipo 3A x Cary 17.	120
Figura 88: Diagrama da diferença das amostras de acrílico – Protótipo 3A x Cary 17.	121
Figura 89: Diagrama de Correlação das 40 córneas (Inicial) – Protótipo 3B x Ocean Optics.	123
Figura 90: Diagrama da diferença das córneas no estado inicial – Protótipo 3B x Ocean Optics.	123
Figura 91: Gráfico de diminuição da proteção UV com remoção de tecido.	126
Figura 92: Diagrama de Correlação com remoção do tecido - Protótipo 3B x Ocean Optics.	127
Figura 93: Diagrama da diferença com remoção de tecido – Protótipo 3B x Ocean Optics.	128
Figura 94: Gráfico de aumento da transmitância UV – Remoção do Epitélio e Estroma.	130
Figura 95: Diagrama de Correlação da córnea com remoção do Epitélio e do Estroma. Protótipo 3B x Ocean Optics.	131

Figura 96: Diagrama da diferença das córneas com Remoção do Epitélio e Estroma – Protótipo 3B x <i>Ocean Optics</i>	131
Figura 97: Gráfico de medidas de espessura por ultrassom realizada por 3 usuários distintos.....	132
Figura 98: Gráfico de medidas de espessura com micrômetro.....	133
Figura 99: Gráfico de reflexão da mira do equipamento do <i>crosslinking</i> – pico em 635nm.....	134
Figura 100: Espectro de fluorescência do olho humano, com excitação em 365nm. Picos de fluorescência em 452nm e 486nm.	135
Figura 101: Espectro de fluorescência da Riboflavina. Pico de emissão em 535nm.	135
Figura 102: Espectro de fluorescência Olho+Riboflavina no período de 5 a 30 minutos.	136
Figura 103: Espectro de fluorescência Olho+Riboflavina+Xlink no período de 5 a 30 minutos.	136
Figura 104: Espectro de fluorescência Olho, Riboflavina a 5 e 30 minutos, e Xlink.	137
Figura 105: Córnea retirada do olho enucleado após o <i>crosslinking</i>	138
Figura 106: Picos de absorção da Riboflavina em solução tampão-fosfato 0,05M. Adaptado de AHMAD; FASIHULLAH; VAID, 2006.	139
Figura 107: Estágio Inicial – córnea desepitelizada Espectro de absorbância 280-800nm.....	139
Figura 108: Pós-riboflavina – Espectro de absorbância 280-800nm	140
Figura 109: Pós-procedimento de <i>crosslinking</i> – Espectro de absorbância 280-800nm.....	140
Figura 110: Pós-lavagem com soro fisiológico 0,9% – Espectro de absorbância da córnea pós- <i>crosslinking</i> no intervalo 280-800nm.....	141
Figura 111: Comparação entre os espectros de absorbância em cada estágio.	142
Figura 112: Destaque da faixa de interesse (280-600nm) dos espectros de absorbância.	142
Figura 113: Espectro de Transmitância UVA da córnea durante o procedimento clínico de <i>crosslinking</i> do colágeno corneano.....	143

Figura 114: Espectro de Transmitância UV da córnea em cada estágio do <i>crosslinking</i>	146
Figura 115: Córnea humana in vitro pós procedimento de <i>crosslinking</i> de colágeno	147
Figura 116: Gráfico de transmitância média UV ao longo dos 60 minutos de desidratação corneana.	149
Figura 117: Detalhe da córnea desidratada apresentando enrugamento após os 60 minutos.....	150

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos da radiação solar sobre o olho humano (VERGAZ, 2001).	40
Tabela 2: Limite de Exposição da radiação UV (PITTS, 1977).	41
Tabela 3: Comparação entre as fontes de radiações UV analisadas.	57
Tabela 4: Comparação entre as fontes de UV fluorescentes.	58
Tabela 5: Dias post-mortem dos olhos utilizadas na medida de fluorescência.	96
Tabela 6: Córneas utilizadas na medida de absorbância.	101
Tabela 7: Espessura e dias post-mortem das córneas utilizadas.	108
Tabela 8: Comparação entre as versões do sistema UV desenvolvido.	117
Tabela 9: Repetibilidade da Transmitância UV das amostras acrílicas medidas no Protótipo 3A.	120
Tabela 10: Transmitância UV de córneas <i>in vitro</i> no estágio inicial.	122
Tabela 11: Transmitância UV das córneas <i>in vitro</i> em cada etapa de remoção de tecido.	125
Tabela 12: Transmitância UV das córneas em cada estágio – Remoção Epitélio e Estroma.	129
Tabela 13: Valores de transmitância das 10 córneas no suporte final durante o <i>crosslinking</i> . R indica instilação de Riboflavina e o número seguinte o tempo de estágio do tratamento em minutos; X indica a irradiação UVA adicionada de instilação de Riboflavina e o número seguinte o tempo de estágio do tratamento em minutos.	144
Tabela 14: Valores de transmitância média, desvio padrão e limite de confiança superior e inferior. R indica instilação de Riboflavina e o número seguinte o tempo de estágio do tratamento em minutos; X indica a irradiação UVA adicionada de instilação de Riboflavina e o número seguinte o tempo de estágio do tratamento em minutos.	145
Tabela 15: Valores de transmitância UV média por período de tempo, " D" indica porcentagem de transmissão de UVA durante a desidratação e o número seguinte o tempo decorrido para a medida em minutos.	148
Tabela 16: Paquimetria Ultrassom Sonomed.	187
Tabela 17: Paquimetria pelo micrômetro digital.	187

Tabela 18: Desvio Padrão das paquimetrias. 188

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

$I_p = I_s \cdot e^{(-d\mu)}$ (1).....	44
$T = \frac{I}{I_0}$ (2).....	47
$A = -\ln(T) = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)$ (3).....	47
$A_{Out} = G_{Am} \cdot A_{In}$ (4).....	54
$R_{Out} = G_{Ref} \cdot R_{In}$ (5).....	54
$T_{UV} = \frac{G_{Am} \cdot A_{In}}{G_{Ref} \cdot R_{in}} = \frac{A_{Out}}{R_{Out}} = 1$ (6).....	54
$A2_{Out} = T_C \cdot G_{Am} \cdot A_{In}$, sendo $0 \leq T_C \leq 1$ (7).....	54
$T_{UV} = \frac{A2_{Out}}{R_{Out}} = \frac{T_C \cdot G_{Am} \cdot A_{in}}{G_{Ref} \cdot R_{in}} = T_C$ (8).....	54
$A2_{Out}' = G_{Am} \cdot A_{In}' = G_{Am} \cdot A_{In} \cdot L(t)$ (9).....	55
$R_{Out}' = G_{Ref} \cdot R_{In}' = G_{Ref} \cdot R_{In} \cdot L(t)$ (10).....	55
$T_{UV} = \frac{A2_{Out}'}{R_{Out}'} = \frac{T_C \cdot G_{Am} \cdot A_{in} \cdot L(t)}{G_{Ref} \cdot R_{in} \cdot L(t')} = T_C \frac{L(t)}{L(t')} = T_C$, sendo $t'=t$ (11).....	55
$G = \left(1 + \frac{1k}{R_2}\right) \cdot 100k$, sendo $1k\Omega \leq R_2 \leq 10k\Omega$ (12).....	61
$110000 \leq G \leq 200000 [V/A]$ (13).....	61
$R_{Dig} = \frac{10k}{2^8} = \frac{10000}{256} = 39\Omega/bit$ (14).....	62
$Rs = \frac{V_{in}}{2^{N_{bias}}} = \frac{5v}{2^{10}} = 0,00488v = 4,88mv$ (15).....	66

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^{500} \frac{A_i}{R_i}}{500} \quad (16) \dots\dots\dots 66$$

$$I = I_m \cos^2(\theta) \quad (17) \dots\dots\dots 80$$

$$I(\lambda, d) = I_0(\lambda).e^{-d.(\mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda))} \quad (18) \dots\dots\dots 114$$

$$I(365,121) = I_0(365).e^{-121.(0,0056 \pm 0,0089)} = I_0(365).0,9999 \quad (19) \dots\dots 150$$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	O Olho Humano	33
1.2	Córnea	34
1.3	Radiação Ultravioleta	36
1.4	Danos Causados pela Radiação UV	40
1.5	Procedimentos Oftalmológicos.....	42
1.5.1	Cirurgia Foto-Refrativa	42
1.5.2	Crosslinking do Colágeno Corneano	43
1.6	Espectroscopia Corneana na Região do Ultravioleta	46
1.7	Transmitância e Absorbância de Luz	47
2	OBJETIVOS E CONTRIBUIÇÕES	49
3	MÉTODO	51
3.1	Desenvolvimento do Protótipo de Transmitância UV	52
3.1.1	Princípio do Uso do Duplo Feixe	53
3.1.2	Hardware	55
3.1.3	Evolução do Hardware	69
3.1.4	Software	73
3.1.5	Estrutura e Suporte do Protótipo UV	78
3.2	Ensaio	80
3.2.1	Determinação da Região Linear do Sensor	80
3.2.2	Amostras de Acrílico.....	81
3.2.3	Ensaio em Córneas in vitro.....	84

3.2.4	Ensaio de Córneas com remoção do tecido.....	86
3.2.5	Ensaio de Córneas simulando a cirurgia foto-refrativa.....	90
3.2.6	Ensaio de Paquimetria: Ultrassônica x Mecânica	93
3.2.7	Ensaio de Fluorescência da córnea durante o Crosslinking.....	96
3.2.8	Ensaio de análise de absorbância da córnea no crosslinking	99
3.2.9	Ensaio de Transmitância UV da córnea durante crosslinking	104
3.2.10	Ensaio de Transmitância UV com desidratação da córnea.....	114
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	117
4.1	Desenvolvimento do Protótipo de Transmitância UV.....	117
4.2	Ensaio.....	118
4.2.1	Determinação da Região Linear do Sensor	119
4.2.2	Amostras de Acrílico	119
4.2.3	Ensaio em Córneas in vitro	122
4.2.4	Ensaio de Córneas com remoção do tecido.....	124
4.2.5	Ensaio de Córneas simulando a cirurgia foto-refrativa.....	128
4.2.6	Ensaio de Paquimetria: Ultrassônica x Mecânica	132
4.2.7	Ensaio de Fluorescência da córnea durante o Crosslinking.....	134
4.2.8	Ensaio de análise de absorbância da córnea no crosslinking	138
4.2.9	Ensaio de Transmitância UV da córnea durante o crosslinking	143
4.2.10	Ensaio de Transmitância UV com desidratação da córnea.....	147
5	CONCLUSÃO	151
5.1	Protótipo UV	151
5.2	Procedimento de Crosslinking do colágeno corneano.....	153
5.3	Conclusão Geral	155

6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	157
	REFERÊNCIAS.....	159
	APÊNDICE	169
	Apêndice A - Firmware Protótipo 3A (MCU)	169
	Apêndice B - Firmware Protótipo 3B (MCU)	175
	Apêndice C - Software Protótipo 3B (PC)	179
	Apêndice D - Comparação entre paquímetros.....	187
	Apêndice E - Métodos de Análises Estatísticas Utilizados	189
	Apêndice F - Declaração de Comitê de Ética	192

1 INTRODUÇÃO

A radiação Ultravioleta (UV) pode causar danos ao olho humano. Entretanto, a córnea apresenta uma proteção natural aos raios Ultravioleta do Tipo-A (UVA) e dos raios Ultravioleta do Tipo-B (UVB), a fim de evitar a exposição dos componentes ópticos internos do olho (DOUGHTY; CULLEN, 1989; RINGVOLD, 1998).

O tecido corneano é transparente e avascular, permitindo assim que a luz incidente passe pelas estruturas oculares posteriores. A medida que a córnea é continuamente exposta ao espectro eletromagnético, abrangendo o intervalo desde o ultravioleta próximo ao infravermelho próximo, a faixa do ultravioleta, é um fator de estresse ambiental, que gera radicais livres e espécies reativas de oxigênio nocivas para a maioria das células e tecidos (WENK et al., 2001). Uma vez que a córnea absorve a maior parte do UV que adentra o olho, ela é suscetível a danos causados pelas espécies reativas de oxigênio.

Embora a córnea e o humor aquoso do olho humano absorvam quantidades significativas de radiação UVA e UVB, quase 50% da radiação a 320nm é transmitida através do cristalino. Já a transmitância abaixo de 320nm diminui substancialmente, de modo que menos de 1% é transmitida abaixo 320nm (BOETTNER; WOLTER, 1962; CEJKA et al., 2007; HOFFMAN et al., 1987). No entanto, experimentos de laboratório em animais indicam que o comprimento de onda no UVB baixo (ou seja, abaixo de 290nm) é talvez 250 vezes mais agressivo do que o comprimento de onda no UVB alto, até 320nm, na indução de catarata, que é a opacificação do cristalino que é normalmente transparente, causando assim uma diminuição da visão (BABU; MISRA; JOSHI, 1995; DILLON et al., 1999; DOLIN, 1994; DONG et al., 2003; HOFFMAN et al., 1987).

Estudos recentes mostram que a exposição da córnea à radiação ultravioleta induz alterações patológicas na sua estrutura (BABU; MISRA; JOSHI, 1995; CEJKOVÁ, 2004; RINGVOLD, 1983, 1998; ROGERS et al., 2004). Os raios UV podem causar edema na córnea, opacidade do cristalino, causando catarata (DILLON et al., 1999; DOLIN, 1994; DONG et al., 2003), e danos à retina.

A exposição UV da córnea em níveis elevados ou baixos níveis freqüentemente causam danos irreversíveis, resultando em ceratopatias afetando a parte anterior do epitélio e do estroma (FRIS, 2006; MICHAEL et al., 1998; PODSKOCHY; GAN; FAGERHOLM, 2000; SLINEY, 2001, 2005; ZUCLICH, 1980, 1989). Tornou-se evidente nos últimos anos, que a remoção da camada anterior da córnea torna as estruturas internas do olho mais suscetíveis aos danos induzidos pela radiação UV. Isto é particularmente importante, já que a ceratotomia foto refrativa (PRK – Photorefractive Keratectomy) recentemente se tornou um procedimento oftalmológico comum.

O PRK é a aplicação de raios ultravioleta com fótons de alta energia (193nm) gerados por um excimer laser de fluoreto de argônio (LEMBARES; HU; KALMUS, 1997), que é aplicado no estroma anterior da córnea para alterar a sua curvatura e, portanto, corrigir um erro de refração (miopia, hipermetropia e astigmatismo total) (SEILER; MCDONNELL, 1995). O processo físico de remodelação da córnea por PRK é chamado de foto ablação. Nestes tipos de cirurgia a remoção do tecido é realizada para a correção da visão. Portanto, a avaliação da proteção UVA e UVB natural da córnea, após a remoção de tecido, se torna essencial.

Outro procedimento oftalmológico em destaque, que utiliza radiação ultravioleta de alta potência aplicado sobre o olho do paciente é o *crosslinking* (CHAN; FRANZCO; WACHLER, 2007; KOPPEN; GOBIN; TASSIGNON, 2010; RAISKUP-WOLF, 2008; WOLLENSAK et al., 2003a, 2003b, 2003c). Este tratamento começa a se tornar um método bastante utilizado no tratamento de ceratocone, patologia em qual a córnea tem um afinamento da espessura central, e em conjunto com outros tratamentos como a própria cirurgia foto refrativa. Basicamente o *crosslinking* utiliza a combinação da substância riboflavina (agente fotossensível) e da emissão de UV com irradiância de 3mw/cm^2 por 30 minutos (5.405J/cm^2), gerando assim o processo de hidroxilação por radicais livres e ligações covalentes entre fibrilas colágenas (GROTTONE et al., 2008). Por se tratar de um procedimento relativamente recente, alguns parâmetros técnicos e de procedimento devem ser mais explorados, e vários dos aspectos de segurança do tratamento devem ser investigados.

A seguir serão comentados detalhadamente o olho humano, a córnea, a radiação ultravioleta, os danos causados pela radiação UV, os procedimentos oftalmológicos estudados, a espectroscopia corneana na região do ultravioleta e os conceitos de transmitância e absorbância de luz.

1.1 O Olho Humano

O olho é um órgão altamente específico para a foto recepção, processo no qual energia luminosa proveniente do ambiente provoca mudanças em células nervosas na retina, os cones e bastonetes.

O olho é aproximadamente uma esfera de 2,5cm de diâmetro e volume de 6,5ml. Existe uma variação de tamanho entre indivíduos, mas o comprimento axial médio do globo ocular é de 24mm (variando entre 21-26mm), e o comprimento horizontal é de 23,5mm (FORRESTER et al., 2002).

A estrutura ocular apresentada na Figura 1 é constituída pela camada externa (córnea e esclera); a camada média formada pela íris, coróide, e corpo ciliar; pelos meios ópticos formado pelo humor aquoso e humor vítreo; pelo cristalino; e pela camada interna constituída pela retina (mácula).

Figura 1: O olho humano e suas estruturas. Imagem adaptada do site <http://www.blundelloptometry.com/anatomy.htm>, acessado em 27/05/2009.

1.2 Córnea

A superfície da córnea (interface ar-tecido) e o filme lacrimal são responsáveis pela maior parte da refração do olho, já que estão em contato com o ar. O índice de refração geralmente muda um pouco com a idade. A transparência da córnea é a propriedade mais importante, embora devido à sua posição muito exposta, a córnea deve também apresentar uma barreira física resistente a traumas e infecções (CULLEN, 2009).

A transparência da córnea é possível por uma série de fatores relacionados à regularidade e lisura do epitélio; sua avascularidade; e a disposição regular dos componentes celulares e extracelulares no estroma, o que depende do estado de hidratação, metabolismo e nutrição dos elementos do estroma.

A espessura da córnea é maior na periferia ($\sim 0.67\text{mm}$) do que no centro ($\sim 0.52\text{mm}$) (FORRESTER et al., 2002). A córnea é constituída de cinco camadas, as quais podem ser vistas na Figura 2 e são mais bem descritas nos tópicos seguintes.

Figura 2: (a) Esquema das cinco camadas da córnea. Figura adaptada do site: <http://www.lasik.md/learnaboutlasik/proceduresintroduction.php>, acessado em 12/06/2009. (b) Fotomicrografia; 1) Epitélio, 2) Membrana de Bowman, 3) Estroma, 4) Membrana de Descemet, 5) Endotélio. Adaptado do site: <http://www.missionforvisionusa.org/anatomy/2005/10/cornea-histology.html>, acessado em 12/06/2009.

- **Epitélio:** principal responsável pela textura suave da superfície da córnea. Possui espessura entre 50-60 μ m, sendo constituída por cinco ou seis camadas de células. Está sempre coberta por uma fina camada de filme lacrimal, que é recomposto a cada piscar, este filme preenche pequenas irregularidades e alimenta a córnea por absorção. O epitélio tem uma grande necessidade de oxigenação, e a sua ausência causa a perda de sua transparência.
- **Lâmina anterior:** denominada de Membrana de Bowman é uma região acelular formada por finas fibras de colágeno dispostas aleatoriamente, proporcionando uma espessura entre 8-12 μ m.
- **Estroma:** compõe 90% de toda estrutura da córnea sendo um tecido conjuntivo denso de notável regularidade. É formado predominantemente por lamelas de colágeno (200-250 camadas) com 2 μ m de espessura cada, achatadas e orientadas paralelamente com a superfície da córnea.
- **Lâmina posterior:** também conhecida como Membrana de Descemet, aparece como uma membrana amorfa, elástica, cuja espessura aumenta com a idade. A espessura desta membrana é de aproximadamente 7 μ m no ápice.
- **Endotélio:** é a camada mais posterior da córnea e apresenta uma espessura de aproximadamente 6 μ m. É constituída por apenas uma camada de células e não se regenera. O endotélio é responsável principalmente por manter a transparência da córnea através de um mecanismo no qual a água que penetra no estroma, pelo interior do olho, retorna para o local de origem acompanhando o bombeamento ativo de sais minerais feito pelas células endoteliais. Qualquer tipo de agressões endoteliais, por cirurgias ou inflamações, pode causar edema e embaçamento por insuficiência da sua função, causando uma maior entrada de água no estroma, do que saída (FARRELL; MCCALLY, 1987; FORRESTER et al., 2002).

Na Figura 3 tem-se uma foto da córnea utilizada durante este estudo logo após ser removida e sendo preparada para o armazenamento.

Figura 3: Córnea do Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, utilizada nas medidas.

1.3 Radiação Ultravioleta

O Sol emite energia em variados comprimentos de onda do espectro eletromagnético, sendo 44% de toda essa energia emitida entre 400 e 700nm, denominado espectro visível. A radiação ultravioleta abaixo de 400nm corresponde a 7% desta energia; o infravermelho próximo (700 - 1500nm) corresponde a 37%; e o infravermelho distante, maior do que 1500nm, corresponde a 11%. Menos de 1% da radiação emitida é de microondas e ondas de rádio, e abaixo da região ultravioleta, como raios X e raios gama (CORRÊA, 2003). Na Figura 4 tem-se a distribuição espectral de emissão ilustrada.

Figura 4: Espectro de emissão do Sol. Imagem retirada e adaptada do site: <http://www.webartigos.com/articles/25877/1/raios-ultravioleta/pagina1.html>, acessado em 05/12/2009.

Os comprimentos de onda menores que o violeta são conhecidos como ultravioleta. A luz ultravioleta é separada em três regiões do espectro: UVA (315-400nm), UVB (280-315nm), UVC (100-280nm) (TAYLOR et al., 1990) e estão posicionados abaixo do espectro visível e acima dos raios X como ilustrado na Figura 5.

Figura 5: Espectro eletromagnético e a região do ultravioleta. Imagem retirada do site: <http://satelite.cptec.inpe.br/uv/R-UV.html>, acessado em 28/05/09.

Quanto menor o comprimento de onda maior a quantidade de energia que a onda possui. Por isto a radiação ultravioleta possui mais energia do que a região do visível e em comprimentos de onda maiores. Assim, pode-se afirmar que os raios ultravioleta possuem maior quantidade de energia quando comparados as demais regiões.

Por possuírem essa alta quantidade de energia a radiação ultravioleta é capaz de danificar o DNA celular (PATTON et al., 1999) e produzir mutações genéticas, sendo tão potentes que podem até mesmo eliminar organismos unicelulares (AHRENS; 2000). Um diagrama demonstrando o aumento de energia pela diminuição do comprimento de onda é vista na Figura 6.

Figura 6: Distribuição de energia pelo comprimento de onda. Imagem adaptada do site: <http://www.webartigos.com/articles/25877/1/raios-ultravioleta/pagina1.html>, acessado em 05/12/2009.

A maior parte dos raios UVC que podem causar sérios danos às células é absorvida pela estratosfera na camada de ozônio. Porém, isso não garante que a radiação ultravioleta não possa causar danos, pois os raios do tipo UVA e UVB atingem a superfície terrestre em proporção muito maior (AHRENS; 2000).

A estrutura ocular apresenta uma defesa natural contra radiação UV, favorecendo a entrada da luz visível e protegendo mais o meio ocular quanto menor o comprimento de onda (BOETTNER; WOLTER, 1962). A maior parte da radiação UVC inferior a 280nm é absorvida no epitélio da córnea (causando grande degradação celular da região atingida) (PODSKOCHY, 2004), a radiação UVB tem uma absorção média de 80% no epitélio, e a radiação UVA apresenta uma absorção de 25 – 34% no estroma (CULLEN, 2009; KINSEY, 1948; PODSKOCHY, 2004; TSUBAI; MATSUO, 2002; ZIGMAN, 1993).

Um esquema de absorção da radiação ultravioleta no meio ocular é apresentado na Figura 7, os valores representam a porcentagem de radiação ultravioleta incidente sobre a superfície da córnea que são absorvidas por várias camadas.

Figura 7: Absorção UV no meio ocular. Adaptado de Farrell e McCally (1987).

Portanto, a córnea é um tecido constantemente exposto a um amplo espectro de luz, incluindo a banda do ultravioleta (BRAINARD et al., 1999; SLINEY, 2001, 2005). A exposição à radiação UV é um fator de estresse ambiental bem conhecido (CEJKOVÁ, 2004) e que gera radicais livres e espécies reativas de oxigênio prejudiciais à grande parte das células e tecidos (WENK et al., 2001). A córnea absorve a maior parte do UV que atinge o olho, sugerindo que esta estrutura seria especialmente suscetível a danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS).

1.4 Danos Causados pela Radiação UV

Em geral, a exposição exagerada a todo tipo de radiação pode levar a algum dano à saúde dos olhos (HOOVER, 1986; SLINEY; FREASIER, 1973; SLINEY, 1995, 1997). A radiação ultravioleta pode causar danos à pele humana e também pode ocasionar ou intensificar problemas e patologias nos olhos (ROSENTHAL et al., 1985, 1988, 1991; WEGENER, 1995).

A Tabela 1 apresenta um resumo das possíveis patologias com os respectivos espectros.

Tabela 1: Efeitos da radiação solar sobre o olho humano (VERGAZ, 2001).

Espectro	Tecido afetado	Local de absorção	Tipo de dano
UVC / UVB	Córnea	Epitélio	Fotoquímico: fotoqueratite e opacidades na córnea
UVB / UVA	Cristalino	Núcleo	Fotoquímico: Catarata
Visível	Retina	Epitélio pigmentário Hemoglobina Pigmento macular	Térmico: diminuição da visão Hemorragia intra-ocular Alterações na percepção de cores
IVA	Retina Cristalino	Epitélio pigmentário Epitélio	Térmico: diminuição da visão Catarata
IVB	Córnea	Epitélio	Opacidades
IVC	Córnea	Epitélio	Queimaduras superficiais

Assim quanto menor o comprimento de onda da radiação, maior o dano causado à estrutura ocular, logo a radiação ultravioleta é mais nociva do que os comprimentos de onda visível e infravermelho. Um fato importante de ser destacado é que os danos causados pela radiação ultravioleta não apresentam uma percepção imediata ao indivíduo prejudicado, diferentemente das outras formas de agressão ao meio ocular, as quais são perceptíveis quase instantaneamente, como à radiação infravermelha que se manifesta na forma de calor. (VERGAZ, 2001).

Estudos bioquímicos indicam que a exposição dos olhos a radiação UV próxima, por períodos suficientes de tempo mesmo com baixa irradiação quando comparada com a irradiação solar, é capaz de interferir na síntese das proteínas do cristalino, podendo causar catarata (BABU; MISRA; JOSHI, 1995; DILLON et al., 1999; DOLIN, 1994; DONG et al., 2003; PITTS, 1977; LÖFGREN; MICHAEL; SÖDERBERG, 2003; WEINREB et al., 2001).

A Tabela 2 apresenta os limites de exposição a radiação UV por comprimento de onda, com o tempo de exposição e tempo de reversão do dano para a córnea e para o cristalino.

Tabela 2: Limite de Exposição da radiação UV (PITTS, 1977).

Comprimento de Onda (nm)	Limite de exposição de radiação com dano reversível (J/cm ²)				Tempo de Reversão
	Limite da córnea	Duração da Exposição (s)	Limite do Cristalino	Duração da Exposição (s)	
295	0.020	130	0.75	7,339	24 horas
300	0.050	137	0.15	661	3 dias
305	0.070	182	0.30	880	2 semanas
310	0.055	201	0.75	4,892	1 semana
315	2.250	3,882	4.50	6,374	-
320	7.500	23,217	> 8.00	-	-
335	10.990	18,581	> 15.00	-	-
365	42.500	16,647	>70.00	-	-

Estudos indicam a relação entre a exposição a radiação UVB e a formação de catarata, o que comprova a necessidade de proteção ocular contra a radiação UVB (TAYLOR et al., 1988; TAYLOR, 1989a, 1989b; WEST et al., 1998).

Também foi relatado que as exposições olho humano a radiação UV, pode produzir alterações significativas na adaptação subsequente ao escuro, e uma diminuição permanente de sensibilidade visual, nos cones e bastonetes (WALD, 1952).

Assim a córnea que é exposta continuamente a radiação UV, pode sofrer danos irreversíveis (FRIS, 2006; MICHAEL et al., 1998; PODSKOCHY; GAN; FAGERHOLM, 2000; SLINEY, 2001, 2005; ZUCLICH, 1980, 1989).

1.5 Procedimentos Oftalmológicos

A seguir serão apresentados os procedimentos oftalmológicos que serão abordados neste trabalho. São eles a Cirurgia Foto-Refrativa e o *Crosslinking* de colágeno corneano.

1.5.1 Cirurgia Foto-Refrativa

O PRK (*photo-refractive keratotomy*) especificamente é a aplicação de fótons ultravioleta de alta energia (193nm – 6,3 eV de energia), gerados por um laser de excimer e aplicados no estroma anterior da córnea, para alterar a sua curvatura e corrigir um erro de refração (miopia, hipermetropia e astigmatismo total) (LEMBARES; HU; KALMUS, 1997; SEILER; MCDONNELL, 1995). O processo físico de remodelação da córnea por PRK é chamado de foto ablação. Nestes tipos de cirurgia a remoção do tecido é realizada para a correção da visão. Segundo Munnerlyn (CHANG et al., 2003), uma quantidade de 14µm de tecido estromal é removido para cada dioptria corrigida.

Um esquema da cirurgia é apresentado na Figura 8.

Figura 8: Esquema do PRK. Imagem adaptada do site: <http://www.eyesurgeryusa.com/john-teahan/corrective-eye-surgery-procedures-albuquerque.htm> , acessado em 05/12/2009.

A cirurgia é realizada pela raspagem do epitélio, em seguida a camada de *Bowman* e uma parte do estroma subjacente são removidas pelo excimer laser, deixando, assim, o restante do estroma sem proteção contra os raios UV, pelo menos temporariamente (KOLOZSVÁRI et al., 2002).

1.5.2 Crosslinking do Cólageno Corneano

O procedimento do *crosslinking* (CHAN; FRANZCO; WACHLER, 2007; KOPPEN; GOBIN; TASSIGNON, 2010; RAISKUP-WOLF, 2008; WOLLENSAK et al., 2003a, 2003b) apresenta como base estudos de olhos e córneas, principalmente em modelos animais em espécies como coelho e porco, os quais em sua maioria estabeleceram os parâmetros de segurança e os procedimentos do tratamento.

O experimento de WOLLENSAK et al., 2003a, apresentou a análise de cortes histológicos de células endoteliais de córneas de coelhos, tratadas utilizando a combinação de riboflavina com a aplicação de diversas irradiações na superfície (I_s) da córnea, na faixa de 0,75 a 4,0mW/cm². As respectivas irradiâncias endoteliais (I_p) na faixa de 0,09 a 0,5mW/cm² foram calculadas utilizando a Equação 1, sendo a profundidade (d) de 400μ e o coeficiente de absorção UVA (μ) de 53cm⁻¹, obtida em estudos anteriores (SPÖRL et al., 1998, 2000).

$$I_p = I_s \cdot e^{(-d\mu)} \quad (1)$$

Das córneas submetidas ao tratamento, só foram observados danos com significativa necrose das células endoteliais, quando expostas com dose de $0,36\text{mW/cm}^2$. Este limiar de dose em córneas de coelhos é cerca de duas vezes maior do que a dose de UVA utilizada no tratamento de córneas humanas com ceratocone. Assim as córneas de coelhos com espessura menor que 400μ para uma dose na superfície de 3mw/cm^2 atingiram um nível citotóxico de $0,35\text{mw/cm}^2$, concluindo que a paquimetria é essencial antes do tratamento e que em córneas mais finas que 400μ a irradiação de UV não é recomendada pelo risco citotóxico ao endotélio.

Já o estudo de SPÖRL et al., 2000, utilizou técnicas do *crosslinking* otimizadas em córneas de olhos suínos enucleados, e aplicou em córneas de coelhos in vivo, a fim de avaliar a biocompatibilidade dos modelos e a duração do efeito de aumento de resistência proporcionada pelo tratamento. O trabalho apresenta um gráfico de ensaios preliminares em olhos de porco, com as curvas de transmitância UV por espessura, para diferentes concentrações de riboflavina – Figura 9 – na qual se observa que para uma solução de riboflavina com concentração de 0,11%, a espessura de 500μ implica em uma transmitância UV em torno de 5%.

Figura 9: Curvas de concentração de Riboflavina – Transmitância ultravioleta por espessura. Adaptado de SPÖRL et al. (2000).

Mais recentemente o *crosslinking* vem se tornando um procedimento oftalmológico em destaque. O protocolo, até a data atual, consiste em instilar gotas de Riboflavina (Vitamina B2) à 0,1% antes e durante a aplicação de radiação UVA (365nm), a cada 5 minutos, por um período total de 30 minutos. A exposição é realizada por um feixe UVA, com potencia de 1,51mW, irradiância de 3mW/cm² aplicados diretamente na córnea, por um período de 30min, gerando uma dose de 5,4J/cm² (WOLLENSAK et al., 2003a; 2010). Durante o procedimento do *crosslinking*, ao ser irradiada pela luz ultravioleta, a substância fotossensível riboflavina libera radicais livres, o que aumenta o número de ligações covalentes entre as fibrilas colágenas. O que promove um aumento na resistência mecânica da córnea, e por conseqüência uma maior estabilidade e uma menor propensão as alterações que possam ocorrer na curvatura e na estrutura da córnea (FILIPPELLO; STAGNI, 2010; GROTTONE et al., 2008; KOHLHAAS et.al, 2006; WOLLENSAK et al., 2004b).

Um diagrama do processo é apresentado na Figura 10, apresentado a formação das ligações covalentes entre fibrilas colágenas pelo processo de hidroxilação por radicais livres.

Figura 10: Diagrama do procedimento do *Crosslinking*.

Assim, os protocolos do tratamento e os níveis de segurança necessitam de um modelo testado em córneas humanas *in vitro*, a fim de verificar os níveis citotóxicos, a espessura mínima da córnea tratada e a quantidade de radiação UV que atinge o endotélio e estruturas mais internas durante o tratamento.

1.6 Espectroscopia Corneana na Região do Ultravioleta

Um dos métodos eficientes para avaliar a proteção ultravioleta natural da córnea é a realização da espectroscopia corneana, ou seja, a verificação da transmitância da córnea para os comprimentos de onda variando de $\lambda = 280\text{nm} - 400\text{nm}$. Para tal, utiliza-se um espectrofotômetro (BASHKATOV et al., 2010; HENRIKSSON; BERGMANSON; WALSH, 2010).

Os métodos conhecidos como espectroscópicos são baseados na absorção e emissão de radiação eletromagnética por diversas moléculas. A espectrofotometria é baseada na absorção da radiação nos comprimentos de onda do ultravioleta, visível e infravermelho. O dispositivo que realiza estas medidas é o espectrofotômetro (VENTURA et al., 2000, 2005).

A Figura 11 traz a foto de um dos espectrofotômetros utilizado na nossa pesquisa. Ele é relativamente portátil, mas é necessário ter uma fonte de luz à parte e um computador para conectá-lo.

Figura 11: Espectrofotômetro *Ocean Optics HR4000CG-UV-NIR*. Imagem retirada do site: <http://www.oceanoptics.com/Products/ready-to-ship.asp>, acessado em 05/03/2010.

1.7 Transmitância e Absorbância de Luz

A quantidade de luz absorvida pode ser expressa tanto como valores de transmitância ou de absorbância.

A transmitância T de uma determinada amostra é dada pela Equação 2, onde I representa a luz que atravessa a amostra; e I_0 a luz incidente. A Equação 3 mostra a medida complementar da transmitância, a absorbância A (GORDON; 1995).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

$$A = -\ln(T) = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (3)$$

Resumindo, o espectrofotômetro foi utilizado nesta pesquisa com a finalidade de analisar com passos de 0,5nm a transmissão da luz monocromática incidente na córnea, varrendo o intervalo ultravioleta de 300-400nm. Após a realização desta medida, um gráfico de transmissão (em unidades arbitrárias - u.a.) em função do comprimento de onda (em nanômetros - nm) é gerado, a área sob a curva é integrada e obtém-se a transmissão média do tecido corneano, para a banda espectral selecionada. A Figura 12 mostra a foto do equipamento disponível no LIO, o espectrofotômetro *Cary 5000*, da *VARIAN*. Este espectrofotômetro foi utilizado na análise espectral de absorbância e transmitância das córneas *in vitro*.

Figura 12: Espectrofotômetro UV-Visível-IR – Cary 5000 (VARIAN). Imagem retirada do site: http://www.ati.surrey.ac.uk/facilities/optical_suite, acessado em 05/03/2010.

2 OBJETIVOS E CONTRIBUIÇÕES

A presente tese de doutorado têm como objetivos estudar a transmitância ultravioleta em córneas humanas *in vitro* em diferentes cenários, abordando principalmente dois procedimentos oftalmológicos em destaque na oftalmologia, a cirurgia foto-refrativa e o *crosslinking* de colágeno corneano. Para possibilitar tal estudo foi proposto o desenvolvimento de um equipamento portátil que pudesse ser utilizado no banco de olhos, e que medisse a transmissão média do tecido corneano na faixa UVA e UVB, com características físicas e de precisão necessárias para este tipo de avaliação.

Foram propostos também novos métodos de análise do procedimento do *crosslinking* do colágeno corneano, para verificar a segurança, confiabilidade e eficácia do protocolo atualmente utilizado, buscando alternativas e melhorias para este tratamento.

Assim os objetivos específicos desta tese de doutorado consistem em:

- 1) Estudo da proteção UV de córneas *in vitro*;
- 2) Desenvolvimento de um dispositivo medidor de transmitância ultravioleta na região UVA e UVB próximo, com tolerância de 0,5%, portabilidade e fácil utilização;
- 3) Análise de desempenho, estabilidade, repetibilidade das medidas e validação do sistema desenvolvido com espectrofotômetros comerciais;
- 4) Estudo de alterações da proteção UV em córneas após a cirurgia foto-refrativa PRK;
- 5) Estudo da paquimetria por ultrassom em córneas *in vitro*;
- 6) Estudo da fluorescência do colágeno corneano durante o *crosslinking*;
- 7) Comparação dos espectros de absorbância de córneas pré e pós *crosslinking*;
- 8) Análise da transmitância UV da córnea durante o tratamento do *crosslinking*.
- 9) Análise da transmitância UV da córnea durante a desidratação do tecido corneano.

Este estudo se mostra importante uma vez que, recentemente, trabalhos apontam que a córnea, quando exposta à radiação ultravioleta, pode sofrer transformações patológicas em sua estrutura (BABU; MISRA; JOSHI, 1995; DOUGHTY; CULLEN, 1989;). Assim o estudo da proteção ultravioleta natural da córnea e a análise da transmitância UV deste tecido em diferentes condições, simulando procedimentos oftalmológicos que, de certa forma, alteram a estrutura da córnea é imperativo.

O protótipo de medida de transmitância UV desenvolvido representa uma ferramenta adicional para a análise das córneas *in vitro* quanto a proteção ultravioleta na faixa do UV-A e UV-B próximo (300 – 400nm) (LINCOLN; VENTURA; FARIA E SOUSA, 2010a, 2010b; VENTURA; LINCOLN et al., 2011). O protótipo é um equipamento compacto e portátil, que realiza medidas de transmitância UV da córnea e pode ser utilizado na classificação da qualidade da proteção UV de córneas *in vitro* nos bancos de olhos, e pode também ser utilizado no estudo de novos procedimentos oftalmológicos que possam alterar a proteção UV natural da córnea.

O estudo do procedimento do *crosslinking* do colágeno corneano apresentou uma nova abordagem deste tratamento com novas possibilidades na melhoria do protocolo, quanto a segurança, diminuição do tempo de tratamento e até reformulação do protocolo de aplicação. Foram realizados ensaios inéditos com acompanhamento durante o tratamento onde foram encontrados novos níveis de transmitância UV, e que sugerem uma reavaliação dos atuais níveis citotóxicos aplicados ao tecido corneano. Os resultados destes ensaios de transmitância UV com córneas humanas *in vitro* durante o *crosslinking* indicam a possibilidade de alteração do protocolo atual, e podem ser utilizados como base para a criação de novos métodos de aplicação do tratamento e no desenvolvimento de novos equipamentos de irradiação UV para o *crosslinking*.

3 MÉTODO

Para que o método utilizado possa ser apresentado, é necessário se ter o conhecimento da procedência e manipulação do principal material alvo de nossos estudos: o tecido corneano fornecido pelo banco de olhos.

O Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto tem como objetivo a captação da córnea, a análise do tecido e a preparação das mesmas para serem enviadas ao transplante. Ainda preserva córneas dedicadas às pesquisas, colaborando sobremaneira com as pesquisas de córnea no Brasil.

A captação anual é de 2.400 olhos em média (dados fornecidos pelo Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto em 2009). No processo de captação é realizada a extração do globo ocular como um todo sendo, em seguida, transportado até o Banco de Olhos. A Figura 13 mostra uma foto do globo ocular no momento da extração da córnea.

Figura 13: Globo ocular antes da retirada da córnea. Foto feita no Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto em 2009.

Na sala limpa do banco de olhos é realizada a extração da córnea que, por sua vez, é armazenada em um frasco contendo *Optisol-GS* - coquetel de medicamentos e nutrientes - que mantém a córnea viva por até quatorze dias. A Figura 14 apresenta duas córneas preservadas em *Optisol-GS* com os reservatórios lacrados.

Figura 14: Córnea preservada em *Optisol-GS*.

As córneas são analisadas passando por diversos critérios de seleção como contagem endotelial, testes de sorologia, qualidade do tecido (edemas, fissuras, erupções e traumas), tempo da coleta e de armazenagem, transmitância no visível, entre outros. Nesta pesquisa utilizou-se córneas de qualidade óptica boa, porém recusadas para o transplante por vários motivos, entre eles sorologia positiva.

Todos os experimentos realizados neste trabalho com córneas humanas foram submetidos e aprovados de acordo com a declaração do Comitê de Ética, que está detalhado no Apêndice F.

3.1 Desenvolvimento do Protótipo de Transmitância UV

O sistema desenvolvido neste trabalho consiste em um equipamento portátil que deve realizar medidas de transmitância UV na faixa de 300 – 400nm, com tolerância de 0,5% (exigida para garantir a confiabilidade das medidas, uma vez que alterações na estrutura da córnea podem gerar alterações mínimas de até 1%) (LINCOLN; VENTURA; FARIA E SOUSA, 2010a, 2010b; VENTURA; LINCOLN et al., 2011). Nos seguintes tópicos serão apresentados, em detalhes, cada componente do equipamento.

3.1.1 Princípio do Uso do Duplo Feixe

Para garantir a tolerância com variação máxima de 0,5% foi utilizada a montagem de duplo feixe óptico, no qual a fonte de radiação UV atinge dois sensores simultaneamente, sendo que um deles é responsável pela referência, livre de qualquer obstáculo e monitora apenas as variações inerentes do sistema e da lâmpada. Já o outro sensor é utilizado na medição das amostras onde a córnea é posicionada para aferição da transmitância. Na Figura 15 pode-se ver em destaque o sistema de duplo feixe.

Figura 15: Sistema de duplo feixe desenvolvido: **(a)** Esquematização dos feixes de referência e de medida; **(b)** Foto do sistema emitindo luz UV e sendo recebida pelos dois sensores, indicados pelas flechas.

A utilização de duplo feixe como referência da fonte de luz para as medidas pode apresentar grandeza do sinal dos sensores e do ganho diferenciados para cada feixe. Porém os sinais dos dois amplificadores são iguais e a referência ainda mantém a medida exata.

Sendo as seguintes variáveis para os canais de amostra e referência:

- G_{Ref} = Ganho do canal de referência;
- G_{Am} = Ganho do canal da amostra;

- A_{In} = Sinal de entrada da amostra;
- A_{Out} = Sinal de saída do amplificador do canal da amostra;
- R_{In} = Sinal de entrada de referência
- R_{Out} = Sinal de saída do amplificador do canal de referência.

Nas Equação 4 e 5 tem-se os sinais equivalentes de saída dos amplificadores.

$$A_{Out} = G_{Am} \cdot A_{In} \quad (4)$$

$$R_{Out} = G_{Ref} \cdot R_{In} \quad (5)$$

Na calibração do sistema, G_{Am} é ajustado até que os sinais de saída se igualem, assim tem-se o sinal de referência de 100%, sendo $A_{Out} = R_{Out}$. Quando a calibração é realizada, a transmitância UV medida (T_{UV}) é a dada pela Equação 6.

$$T_{UV} = \frac{G_{Am} \cdot A_{In}}{G_{Ref} \cdot R_{In}} = \frac{A_{Out}}{R_{Out}} = 1 \quad (6)$$

Se uma córnea com transmitância T_C é posicionada na frente do sensor de amostra, obtém-se nova intensidade da corrente na saída do sensor de amostra ($A2_{Out}$), representada na Equação 7. Já a nova transmitância medida pelo sistema é a apresentada na Equação 8.

$$A2_{Out} = T_C \cdot G_{Am} \cdot A_{In} \quad , \text{ sendo } 0 \leq T_C \leq 1 \quad (7)$$

$$T_{UV} = \frac{A2_{Out}}{R_{Out}} = \frac{T_C \cdot G_{Am} \cdot A_{In}}{G_{Ref} \cdot R_{In}} = T_C \quad (8)$$

Caso a fonte de luz UV sofra variação na intensidade de emissão, o sensor de referência acompanhará a oscilação e manterá a medida de transmitância correta e independente da variação. Assim, dada uma variação de intensidade do sinal em ambos os sensores (A_{In}' e R_{In}') diretamente proporcional a oscilação da fonte UV ($L(t)$), o sinal de saída de cada canal ($A2_{Out}'$ e R_{Out}') é o mesmo apresentado pela Equação 9 e Equação 10 respectivamente.

$$A2_{Out}' = G_{Am} \cdot A_{In}' = G_{Am} \cdot A_{In} \cdot L(t) \quad (9)$$

$$R_{Out}' = G_{Ref} \cdot R_{In}' = G_{Ref} \cdot R_{In} \cdot L(t) \quad (10)$$

Então o valor de transmitância UV medido com variação na fonte será o apresentado na Equação 11.

$$T_{UV} = \frac{A2_{Out}'}{R_{Out}'} = \frac{T_C \cdot G_{Am} \cdot A_{in} \cdot L(t)}{G_{Ref} \cdot R_{in} \cdot L(t')} = T_C \frac{L(t)}{L(t')} = T_C, \text{ sendo } t'=t \quad (11)$$

Observe que a condição $t'=t$ é sempre atendida, já que a conversão é realizada pela divisão de um sinal pelo outro no mesmo instante de tempo.

3.1.2 Hardware

Nos itens seguintes são apresentados em detalhe cada componente do *hardware* do sistema de medida de transmitância UV de córneas.

3.1.2.1 Fonte UV

Foram analisadas diversas fontes de ultravioleta (LEDs, lâmpadas fluorescentes, lâmpadas incandescentes) comparando-se os seguintes aspectos técnicos:

- Espectro de emissão: O espectro de emissão requerido compreende a região do UV próximo (300-400nm);
- Custo: viabilidade de manutenção;
- Desempenho: variação da irradiância da fonte a qual tem influência na resposta do sensor (análise percentual da variação de tensão do sistema);
- Estabilidade: tempo de aquecimento e estabilização do espectro de emissão.
- Disponibilidade no mercado: viabilidade de aquisição, reposição e substituição.

Os LEDs seriam uma alternativa bastante interessante pelo tamanho e potência bastante reduzidos, porém o custo muito elevado (em torno de U\$250,00 cada) e a dificuldade de disponibilidade (apenas importados e venda por atacado) na banda requerida inviabilizaram sua utilização, para formar a banda de trabalho seriam necessários um conjunto de pelo menos 5 LEDs, sendo que quanto menor o comprimento de onda de emissão maior o custo e a dificuldade de aquisição.

As lâmpadas incandescentes apresentam um custo também elevado e uma potência acima da necessária (potência por volta de 100W) gerando calor e consumo de energia em excesso. Por fim a lâmpada ultravioleta escolhida foi a fluorescente, por apresentar custo baixo e um espectro de emissão de acordo com a banda de emissão requerida pelo projeto. Na Tabela 3 tem-se as fontes de luz analisadas, a fonte escolhida é destacada em vermelho.

Tabela 3: Comparação entre as fontes de radiações UV analisadas.

Fonte de Luz	Espectro Emissão (nm)	Custo	Desempenho (Variação Irradiância %)	Estabilidade (s)	Disponibilidade
LED	280 – 410	Muito Alto (~U\$250,00 cada)	< 2	1	Difícil
Incandescente	350 – 410	Alto (~R\$50,00 cada)	< 20	60	Razoável
Fluorescente	300 – 550	Baixo (~R\$8,00 cada)	< 5	10	Fácil

A Figura 16 mostra os três tipos de fonte ultravioleta analisadas.

Figura 16: Fontes UV Analisadas: **(a)** LED: VCC / VAOL-3GUV0Y4; **(b)** Incandescente: Osram / HQV125W E27; **(c)** Fluorescente: Philips / TL4W05.

Dentro da categoria das lâmpadas fluorescentes, várias buscas foram realizadas para se identificar a mais adequada. Dentre todas as encontradas, três lâmpadas fluorescentes foram analisadas, como apresentadas na Tabela 4, como em destaque a lâmpada escolhida.

Tabela 4: Comparação entre as fontes de UV fluorescentes.

Fonte de Luz	Espectro Emissão (nm)	Custo	Desempenho (Variação da Irradiância %)	Estabilidade (s)	Disponibilidade
T54W Blacklight Blue Osram	330 – 390	Baixo (~R\$6,00 cada)	< 8	15	Fácil
TL4/08 Philips / Osram	320 – 380	Razoável (~R\$18,00 cada)	< 20	10	Fácil
TL4W05 Philips	300 – 550	Baixo (~R\$8,00 cada)	< 5	10	Fácil

* Pesquisa realizada em 01/08/2010.

O espectro de emissão da lâmpada escolhida no desenvolvimento do protótipo é ilustrado na Figura 17.

Figura 17: a) Fonte fluorescente UV TL4W05 - Philips b) Espectro de emissão da lâmpada obtido no espectrofotômetro.

3.1.2.2 Sensor UV

O sensor ultravioleta utilizado apresenta uma banda larga de resposta e sensibilidade espectral alta na faixa de 245nm – 400nm, montado em invólucro hermeticamente fechado do tipo *TO-46*, com área ativa de 1.2mm² e com janela com filtro UV – *UG11*. Uma característica imprescindível do sensor é a sensibilidade e resposta apenas na região UV, filtrando a região visível e infravermelha, a fim de evitar interferências externas e possibilitando a utilização de fontes de luz com espectros parciais nestas regiões.

O gráfico de sensibilidade e uma foto do sensor utilizado são apresentados na Figura 18.

Figura 18: a) Sensor UV EPD-365-0-1.4 / EPIGAP; b) Espectro de sensibilidade disponibilizado pelo fornecedor.

3.1.2.3 Fonte de Alimentação

A fonte utiliza um transformador 127 – 220 / 12 + 12 V / 1A, que transforma 127V ou 220V em 12VAC. Foi utilizada uma ponte de diodos para retificação de onda completa da senóide de entrada. Os reguladores de tensão *LM7805*, *LM7808* e *LM7908* fornecem respectivamente +5V, +8V e – 8V.

A alimentação simétrica $\pm 8V$ é utilizada para alimentar os amplificadores operacionais utilizados no circuito, a alimentação de +5V é utilizada na alimentação do microcontrolador e do potenciômetro digital. A Figura 19 representa o bloco da fonte de alimentação.

Figura 19: Esquemático da fonte de alimentação do sistema. Valores de referência; $C1=C2=100\mu\text{F}$; $C3=C4=C5=220\text{nF}$.

3.1.2.4 Amplificador de Transimpedância

O amplificador de transimpedância funciona como um conversor corrente – tensão, além de possibilitar um ganho ajustável. Nesta montagem foi utilizado o amplificador de instrumentação *LF356*, indicado para composição de amplificadores de fotodiodos, por apresentar um baixo ruído de corrente de entrada, *offset* ajustável e alta impedância de entrada.

Dentro das montagens do tipo transimpedância foi utilizada uma configuração Tee (GRAEME, 1995), possibilitando um *offset* com maior precisão. Na Figura 20 é apresentado o desenho do amplificador de transimpedância Tee.

Figura 20: Desenho do amplificador de transimpedância do tipo Tee.

O ajuste de ganho é feito pela carga em R_4 (*trimpot* - resistor variável de $10k\Omega$) para que os resistores R_1 e R_2 sejam casados ($680k\Omega$) possibilitando a redução do *offset*, junto com R_3 (680Ω). A carga R_4 pode ser substituída por um potenciômetro digital de $10k\Omega$, para ajuste automático do ganho. Também foi incluso um *trimpot* R_5 ($50k\Omega$) para ajuste do *offset* do amplificador operacional. Já os capacitores C1 e C2 ($28nF$) funcionam como filtro.

A variação máxima do ganho (G) é calculada pela Equação 12 e a faixa de ganho permitida é apresentada na Equação 13.

$$G = \left(1 + \frac{1k}{R_2} \right) \cdot 100k \quad , \text{ sendo } 1k\Omega \leq R_2 \leq 10k\Omega \quad (12)$$

$$110000 \leq G \leq 200000 \text{ [V/A]} \quad (13)$$

3.1.2.5 Potenciômetro Digital

O sistema necessita de um ajuste fino no ganho dos amplificadores de transimpedância para que ocorra a correta calibração de referência em 100%. Este ajuste foi implementado com um potenciômetro digital, Figura 21, que é controlado pelo microcontrolador. O potenciômetro digital utilizado foi o MCP41010 de 10k Ω , variação de 256 valores, possibilitando um incremento (R_{Dig}) de 39 Ω por posição como mostrado na Equação 14, e comunicação por protocolo serial SPI.

$$R_{Dig} = \frac{10k}{2^8} = \frac{10000}{256} = 39\Omega/bit \quad (14)$$

CS	- Chip Select	PA0	- Potentiometer Terminal A Connection
SCK	- Serial Clock	PB0	- Potentiometer Terminal B Connection
SI	- Serial Data Input	PW0	- Potentiometer Wiper Connection

Figura 21: Pinagem do Potenciômetro Digital MCP41010.

A comunicação entre o microcontrolador *PIC 18F4550* e o potenciômetro digital é estabelecida inicialmente com o envio de uma palavra de comando (palavra de 8 bits enviada bit a bit, definindo o funcionamento do potenciômetro) no pino SI. Para controlar o potenciômetro durante a comunicação, o pino CS fica em nível lógico baixo durante todo processo de comunicação e é alterado para nível lógico alto ao final do processo. O pino SCK funciona como *clock* da comunicação, e os dados são enviados na subida do *clock*. Os terminais PA0 e PW0 são conectados ao circuito amplificador de transimpedância em série com o potenciômetro *R4*, já ilustrado na Figura 20.

3.1.2.6 Display

O *display* (SD-C1602F / Santech) utiliza dois registradores de oito bits, um de instrução (IR) e outro de dados (DR). O *display* requer três linhas de controle e também quatro ou oito linhas de I/O para o duto de dados. No caso deste projeto, foram utilizadas quatro linhas de I/O para o duto de dados. Quando o *display* LCD não está habilitado, as linhas de dados *tristate* assumem o estado de alta impedância, não interferindo com o funcionamento dos demais componentes. Nos protótipos foram utilizados dois tipos de *display* de LCD, sendo na primeira etapa um LCD 16x2 apresentando apenas informações mínimas em tempo real aos usuários como exemplificado na Figura 22.

Figura 22: LCD 16x2 (SD-C1602F / Santech) – transmitância com o sistema calibrado.

Na versão final foi utilizado um LCD de 20x4 (TC2004B-02 / TINSHARP) possibilitando a implementação de um menu interativo com o usuário, permitindo o acréscimo de novas opções, como calibração e armazenamento de informações. A tela com a transmitância da amostra medida é apresentada na Figura 23.

Figura 23: LCD 20x4 (TC2004B-02 / TINSHARP) apresentando a transmitância de uma amostra.

3.1.2.7 Microcontroladores - MSP 430/PIC18F

Pela necessidade de um sistema portátil e compacto, o microcontrolador utilizado é um componente fundamental, sendo responsável por integrar e gerir todos os subsistemas do equipamento.

Foram utilizadas duas famílias de microcontroladores neste projeto: inicialmente foi utilizado o microcontrolador *MSPF2274* da família *MSP430*; e no projeto final foi utilizado um *PIC18F4550* da família *PIC18F*.

- **MSP430**

O *MSP430* incorpora uma CPU de 16bits do tipo RISC, com periféricos integrados (AD, Clock), alto desempenho analógico ideal para precisão de medidas. É um microcontrolador de baixo consumo de potência, trabalha em tensões abaixo de 3.3V, contém um conversor AD de 10 bits integrado.

No projeto inicial foi utilizado o *MSPF2274* integrado em uma *Target Board* como mostra a Figura 24. Esta placa oferece comunicação sem fio, dois *LEDs* de monitoramento, um botão e 14 I/O (portas de entrada ou saída disponíveis para uso).

Figura 24: *MSPF2274 – Target Board.*

- **PIC18F**

O microcontrolador *PIC 18F4550* da família *18F* (Figura 25), utilizado neste projeto, apresenta características particularmente interessantes ao nosso protótipo, são elas: conexão *USB 2.0* (baixa velocidade – 1.5Mb/s e alta velocidade – 12Mb/s); Oscilador interno (variando de 31kHz até 8MHz); Modo de *Clock* externo (máximo de 48Mhz); Conversor AD de 10bits e 13 canais de entrada; Programação *in-circuit* via dois pinos; Acesso a 35 I/O.

Além disso, é um microcontrolador bem difundido, oferece encapsulamento *DIP* (*Dual in-line Package*), o que facilita o manuseio e a implementação em bancada, além de possuir baixo custo.

Figura 25: Microcontrolador *18F4550* – Encapsulamento *DIP*

A programação é realizada por um programador *USB*, que facilita o desenvolvimento do sistema embarcado diminuindo o tempo de implementação e atualização do sistema.

No projeto final se optou pelo uso dos microcontroladores *PIC* por possibilitar uma interface *USB* integrada e por trabalhar com tensão de 5V, permitindo melhor resolução no conversor AD integrado.

3.1.2.8 Conversão dos Dados – AD10

As saídas analógicas dos amplificadores de transimpedância são convertidas em valores digitais, pelo conversor analógico digital (AD10) integrado do microcontrolador. O sistema utiliza os dois canais na conversão, usando como referência a resposta do feixe livre e, como valor de conversão, a resposta do outro feixe. A resolução R_s do sistema é dada pela Equação 15, onde V_{in} é a tensão de entrada do conversor e N_{bits} é o número de bits do conversor AD, no caso 10bits.

$$R_s = \frac{V_{in}}{2^{N_{bits}}} = \frac{5v}{2^{10}} = 0,00488v = 4,88mv \quad (15)$$

Assim nosso protótipo é sensível a variações de aproximadamente 5mv que corresponde a uma variação de aproximadamente 0,1% nas medidas de transmitância.

3.1.2.9 Tratamento matemático

O tratamento matemático utilizado pelo equipamento é dado via *software* e realiza uma média de 500 medidas por segundo. A Equação 16 apresenta o cálculo realizado pelo microcontrolador, cada vez que o resultado é apresentado na tela. Sendo A_i o valor do sensor da amostra e R_i o valor do sensor de referência, tem-se:

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^{500} \frac{A_i}{R_i}}{500} \quad (16)$$

O valor de 500 medidas foi obtido de forma empírica, esse número foi escolhido por não apresentar um atraso significativo na apresentação da medida ao usuário e por evitar que ruídos e medidas errôneas pontuais sejam mostrados como resultado.

3.1.2.10 PCB – Printed Circuit Board

Após a finalização do sistema em bancada, foi projetada uma placa de circuito impresso para viabilizar a portabilidade, durabilidade e estabilidade do sistema. A placa foi desenvolvida no programa *KiCad*, passando por um processo de desenvolvimento em quatro etapas:

1. Implementação do esquemático total do projeto;
2. Conversão do esquemático para *layout*;
3. Disposição dos componentes na placa buscando um projeto otimizado, minimizando o tamanho e seguindo as regras básicas de uma *PCB*;
4. Roteamento em dupla camada.

Na Figura 26 é apresentado o *layout* final da placa.

Figura 26: *Layout* final da *PCB*.

Com o layout finalizado foi confeccionada a placa de circuito impresso de fenolite com dupla camada de cobre com dimensão de 10cm x 9cm e área total de 90cm², uma foto das duas faces das placas são apresentadas na Figura 27.

Figura 27: PCB de fenolite dupla face.

Com a placa finalizada, foi realizado o posicionamento e a solda de todos os componentes. A placa final com o lado dos componentes e o lado da solda são apresentados na Figura 28.

Figura 28: PCB – face da solda e face dos componentes.

3.1.3 Evolução do Hardware

O hardware do sistema passou por três versões distintas, para o aperfeiçoamento de funções, melhora da estabilidade e do desempenho. Nos tópicos a seguir são apresentados os diagramas do *hardware* nas suas três versões.

- **Primeira versão:**

Sistema composto pela fonte de radiação ultravioleta, dois fotodiodos ultravioleta, amplificador de transimpedância do tipo comum, microcontrolador MSP430, *display* de LCD 16x2, como mostrado na Figura 29.

Figura 29: Sistema UV versão 1.

Este sistema possibilitou o desenvolvimento inicial do conceito do equipamento fornecendo dados e apresentando os pontos críticos do sistema que deveriam ser corrigidos para seu funcionamento adequado. Os pontos críticos são: resolução mínima do sistema de 1%; tolerância na medida de 0,5%; sistema para neutralização de variações na fonte de radiação, tipo de conexão e apresentação dos resultados ao usuário.

- **Segunda versão:**

Nesta segunda versão houve uma adaptação do primeiro sistema com a substituição do módulo amplificador comum por um de transimpedância do tipo Tee e foi acrescentado um potenciômetro digital, possibilitando a calibração automática do sistema. O diagrama com as modificações é apresentado na Figura 30.

Figura 30: Sistema UV versão 2.

O segundo sistema possibilitou uma melhora significativa na estabilidade e tolerância do sistema, além da possibilidade de efetuar a calibração automaticamente via *software* pelo uso do potenciômetro digital. O tempo de resposta melhorou bastante em relação ao anterior com a utilização do novo estágio amplificador.

- **Terceira versão:**

Nesta última versão o sistema foi implementado em duas modalidades: uma seguindo os sistemas anteriores do tipo independente, e outra para utilização em conjunto com computadores do tipo PC.

A versão final do tipo independente é uma adaptação do segundo sistema com a substituição do microcontrolador MSP para um da família PIC, e um novo *display* de LCD de 20x4. Foram também adicionados dois botões de controle e interface com o usuário. O diagrama final do sistema independente é apresentado na Figura 31.

Figura 31: Sistema UV versão 3.A

A outra modalidade para uso conectado a um PC utiliza a mesma base da versão final, porém sem os botões e sem *display* de LCD, e com uma conexão *USB* entre o sistema e o computador auxiliar. O controle do sistema e a apresentação dos resultados são realizados pelo computador auxiliar.

O diagrama final do sistema com PC é apresentado na Figura 32.

Figura 32: Sistema UV versão 3.B

3.1.4 Software

Para melhor compreensão, são apresentados nos próximos itens os *softwares* desenvolvidos para o presente estudo.

3.1.4.1 Software Embarcado

O *software* embarcado no microcontrolador foi desenvolvido em linguagem de programação C em todas as fases do projeto. Essa linguagem foi escolhida pela sua portabilidade e facilidade de migração de plataformas, bibliotecas padronizadas, variedade de operadores, facilidade de acesso a *hardware* e facilidade de otimização das aplicações na codificação e depuração, reduzindo assim o tempo e o custo de programação. O programa embarcado tem uma plataforma base que é responsável por gerenciar todos os sistemas do equipamento, inicialização, calibração, aquisição e tratamento matemático das medidas e disponibilização das informações em tempo real.

Do *software* base foram implementados dois *software* principais, o primeiro dedicado à versão 3.1 do sistema, na qual a apresentação dos resultados é por meio de um *display* de LCD. Já o segundo *software* foi desenvolvido para realizar a conexão USB e se comunicar com um computador – PC, apresentando os resultados em um *software* dedicado neste PC. Nos tópicos seguintes tem-se a descrição e os fluxogramas dos dois *softwares*.

- **Versão 3.A – conectividade *display* de LCD**

O *software* é dividido em duas fases, começando com a inicialização e configuração do microcontrolador, ajustando os modos de operação, habilitação do conversor analógico digital (AD no modo com 10 bits de conversão), frequência de *clock* de trabalho (8MHz) e habilitação da interrupção no botão de controle. Posteriormente é realizada a inicialização do *display* de LCD no modo de 4bits e é apresentada uma mensagem de alerta, “INICIALIZANDO...”, que fica escrita no *display* de LCD até o fim do processo de inicialização. A última etapa desta primeira fase é dada pela comunicação inicial com o potenciômetro digital e pelo ajuste inicial da resistência já programada no *software*.

A segunda fase começa com a atualização das informações no *display*, fornecendo ao usuário um menu com as opções “1 – Transmitância UV” e “2 – Calibrar”. Nas duas opções é feita a aquisição dos dados pelo conversor AD e o tratamento matemático pela média das medidas. Na opção 1 é apresentado ao usuário o valor instantâneo da transmitância UV, e na opção 2 é realizado um novo ajuste do valor do potenciômetro para uma calibração de 100%.

O fluxograma do *software* da versão com LCD é apresentado na Figura 33, e o *software* completo e comentado é apresentado no Apêndice A.

Figura 33: Fluxograma do *Software* embarcado com *display* de LCD.

- **Versão 3.B – conectividade *USB* – PC**

Este *software* também é dividido em duas fases, primeiro com a inicialização e configuração do microcontrolador ajustando os modos de operação, porém com uma frequência de *clock* de trabalho diferente (12MHz para o microcontrolador e 48MHz para a conexão *USB*), e habilitação da interrupção *USB*.

Em seguida é realizada a comunicação inicial com o potenciômetro, realizando o ajuste inicial da resistência. Por fim é feita a inicialização da comunicação *USB* entre o sistema e o computador – PC com o *software* dedicado.

A segunda fase é dependente da escolha do usuário no *software* dedicado no PC com as opções de interação com o sistema “Calcular Transmitância UV” e “Calibrar”. Nas duas opções é feita novamente a aquisição dos dados pelo conversor AD e o tratamento matemático. Ao selecionar-se a opção CALIBRAR, é realizado o reajuste do valor do potenciômetro até uma calibração de 100%. Na opção de cálculo da transmitância é apresentado ao usuário o valor instantâneo da transmitância UV na tela do computador.

O fluxograma do *software* da versão *USB* é apresentado na Figura 34. O *software* completo é descrito no Apêndice B.

Figura 34: Fluxograma do *software* com conexão *USB*.

Esta versão foi desenvolvida para facilitar a manipulação dos dados e para possibilitar o controle do sistema através de um computador por um *software* que concentra todas as informações necessárias. O *software* em questão é descrito no próximo item.

3.1.4.2 Software no PC

Em conjunto com o sistema com conexão *USB* foi desenvolvido um programa em plataforma “Delphi 7” direcionados aos tópicos da pesquisa. O programa apresenta os moldes do protocolo estabelecido para realização das medidas que será mais detalhadamente abordado posteriormente.

O *software* apresenta uma tela única onde é possível visualizar e armazenar os dados essenciais no processo de análise da transmitância UV da córnea. São eles:

- **Código da córnea:** Identifica cada córnea analisada no processo. Cada córnea apresenta um código único iniciando com cinco dígitos para identificação do doador anônimo e por último a letra D ou E, indicando o olho direito ou esquerdo. Exemplo: 10225D – Doador 10225 e córnea do olho direito;
- **Data da coleta:** data formada pelo dia, mês e ano (dd/mm/aaaa) em que a córnea foi captada e retirada do doador;
- **Contagem endotelial:** É o número de células endoteliais por milímetro quadrado (células/mm²) que a córnea apresenta no momento da coleta;
- **Paquimetria Central:** É registrada a espessura central da córnea, em µm, nos quatro estados possíveis (Inicial, sem epitélio, corte da lamela e lamela);
- **Transmitância UV:** Valor em porcentagem da transmitância ultravioleta da amostra em tempo real.

A tela do *software* é apresentada na Figura 35.

Figura 35: Tela do *software* no PC desenvolvido em Delphi 7.

Para a facilidade e boa interface no uso do programa são disponibilizados cinco botões de navegação para o usuário, são eles:

- **Novo:** Limpa os campos editáveis, utilizado no início da análise de uma nova amostra;
- **Iniciar:** Estabelece a comunicação com o sistema e apresenta instantaneamente a transmitância UV na tela;
- **Calibrar:** Envia o comando para calibração do sistema. O programa aguarda até o processo terminar;
- **Salvar:** Os dados inseridos no programa são armazenados em um arquivo de texto no formato “txt” já tabelado e organizado, as medidas ficam ordenadas pela ordem que foram inseridas e a data e hora também são registradas;
- **Sair:** Encerra a comunicação com o Sistema UV e finaliza o programa.

O Software desenvolvido é descrito no Apêndice C.

3.1.5 Estrutura e Suporte do Protótipo UV

O suporte na qual a córnea é posicionada foi evoluindo junto com o protótipo e passou por três transformações até sua versão final. Inicialmente foi utilizada uma placa plana com dois orifícios de 8mm de diâmetro, como é apresentada na Figura 36a, porém esta estrutura não permitia o posicionamento ideal, dificultando a realização das medidas.

Na segunda versão foi criado um suporte fixo de orifícios de 6mm de diâmetro apresentado na Figura 36b, assim o posicionamento do suporte ficou fixo melhorando a repetibilidade das medidas, porém a própria curvatura da córnea interferia sobremaneira nas medidas.

Figura 36: Suportes iniciais. **a)** Primeira versão; **b)** Segunda versão.

Assim na versão final foi adicionada uma semi esfera de metal de raio $r = 8,55\text{mm}$, com um orifício central também de 6mm. Cada semi-esfera foi posicionada em um novo suporte, com dois orifícios igualmente espaçados e alinhados com o feixe UV, com isso foi possível manter a córnea com uma mesma curvatura durante todas as medidas possibilitando uma melhor repetibilidade e estabilidade das medidas. Na Figura 37 tem-se o suporte final utilizado.

Figura 37: Suporte final com semi-esfera para os feixes de referência e de teste.

A estrutura deve seguir algumas especificações técnicas uma vez que se pode trabalhar com material contaminado, assim toda a estrutura que fica exposta à amostra foi desenvolvida em metal, possibilitando a esterilização e reutilização em diversas medidas. Esta estrutura tem um sistema de gaveta, onde o suporte da córnea desliza sempre para mesma posição, como apresentado na Figura 38.

Figura 38: Estrutura de metal deslizante.

3.2 Ensaios

O protótipo seguiu por um processo de desenvolvimento começando por ensaios individuais em bancada de cada subsistema, evoluindo para os ensaios do sistema completo com amostras de acrílico específicas. No laboratório foram realizados ensaios de verificação da linearidade, estabilidade, repetibilidade e tempo de resposta do sistema.

Por fim foram realizados os ensaios no banco de olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com córneas humanas *in vitro*. Todos os procedimentos relacionados a manipulação de material biológico (manuseio, raspagem, corte das córneas *in vitro*) foram realizados pelo diretor clínico do Banco de Olhos, Prof. Dr. Sidney J. Faria e Sousa.

3.2.1 Determinação da Região Linear do Sensor

Pela Lei de Malus (GHATAK, 2008; HECHT, ZAJAC, 2009) apresentada na Equação 17, quando se tem 2 filtros polarizados em série, a intensidade luminosa transmitida segue a curva do cosseno ao quadrado e é máxima quando o ângulo θ entre dois polarizadores assumir os valores 0^0 e 180^0 (orientação paralela) e mínima quando o ângulo θ assumir os valores 90^0 e 270^0 (orientações ortogonais).

$$I = I_m \cos^2(\theta) \quad (17)$$

I = intensidade transmitida;

I_m = intensidade máxima de transmissão;

θ = ângulo entre as direções de propagação dos filtros polarizadores.

Uma das preocupações com a resposta do sensor era conhecer a sua região de linearidade. Assim, para verificar a resposta do sensor em função da variação de intensidade de luz incidente, utilizaram-se dois polarizadores circulares para ultravioleta sobrepostos posicionados entre a fonte de UV e o fotodiodo receptor de UV. A Figura 39 ilustra a montagem realizada.

Figura 39: Montagem dos polarizadores (P1 e P2) de luz UV para estudo da resposta do sensor à onda eletromagnética E_1 em função da posição angular θ entre os polarizadores. Retirado e adaptado do site: <http://www.physics.brocku.ca/Courses/1P22-Crandles/lightoptics.php>, acessado em 05/03/10.

Foram efetuadas medidas da tensão de resposta do sensor UV, ligado ao amplificador de transimpedância, com variação de cinco graus desde 0^0 a 180^0 sendo um polarizador fixo e o outro sobreposto (de análise) livre para rotacionar. A precisão de rotação dos polarizadores é de $0,5^0$.

3.2.2 Amostras de Acrílico

A fim de verificar a correlação das medidas do nosso protótipo com o espectrofotômetro *Cary 17 Olis* atualizado (gentilmente cedido pelo IFSC-USP para estas medidas), foram analisadas três amostras de placas de acrílico com espessura de 1,20mm – 2,2mm – 3,54mm e composições diferentes, como apresentada na Figura 40.

Figura 40: Amostras de Acrílico analisadas.

A Figura 41 mostra como foi realizada a medida da transmitância UV das amostras de acrílico no protótipo desenvolvido. Cada amostra de acrílico foi medida repetidamente sendo retirada e recolocada a cada medida. A amostra era posicionada no suporte, que por sua vez era posicionado entre o feixe da amostra, e a medida era tomada após 5 segundos garantindo a estabilização da medida.

Figura 41: Medida UV das amostras de acrílico.

Os resultados de transmitância das três placas de acrílico foram comparados estatisticamente pelo método ANOVA de Medidas Repetidas Unifatorial, verificando a significância estatística da variação da transmitância em cada medida repetida.

Para garantir a precisão do protótipo desenvolvido as três amostras de acrílico utilizadas e mais 5 novas amostras, totalizando 8 amostras, foram medidas pelo Protótipo, e comparadas com as medidas de espectroscopia de transmitância UV no espectrofotômetro *Cary 17 Olis* atualizado – Figura 42. O espectrofotômetro Cary foi previamente calibrado com Óxido Holmium, em passos de 0,5nm, no intervalo de 280 - 750nm, como mostra a Figura 43 com a tela de calibração.

Figura 42: Espectrofotômetro Cary 17.

Figura 43: Tela com o gráfico de transmitância de calibração.

Os espectros das amostras foram então tomados com passos de 0,5nm na região de 300-400nm e a área sob a curva foi integrada, proporcionando a transmitância média. Em seguida essa transmitância média foi correlacionada em relação à transmitância do protótipo, utilizando o método de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1983, 1986, 1995, 1999; HIRAKATA et al., 2009).

3.2.3 Ensaio em Córneas *in vitro*

Neste ensaio foi elaborado o procedimento de medida da transmitância UV de seis córneas preservadas em *Optisol-GS* no estágio inicial, ou seja, sem nenhum tipo de degradação ou remoção do tecido corneano, e com qualidade óptica e biológica boa, servindo como validação inicial do sistema uma vez que a transmitância média de uma córnea intacta deve estar em torno de 65% de acordo com a literatura atual (KOLOZSVÁRI et al., 2002).

Depois de alguns experimentos preparatórios, o ensaio final descrito neste capítulo teve duração de 8 horas, entre preparação do material, calibração e ajuste dos instrumentos de medida.

Cada uma das seis córneas foi posicionada no suporte do protótipo como mostra a Figura 44, assim foram realizadas cinco medidas em cada córnea, sempre retirando e recolocando as córneas no suporte. Cada córnea foi analisada em um período de 5 segundos por medida, totalizando 25 segundos de exposição à fonte UV. Os resultados das cinco medidas realizadas em cada córnea foram analisados pelo método de Medidas Repetidas Unifatorial (ANOVA), verificando a significância estatística da variação da transmitância para cada repetição de medida.

Figura 44: Medida Inicial da córnea *in vitro*.

Para a análise de correlação foram utilizadas um total de **40 córneas** (analisadas em todos os ensaios). As córneas em estado inicial tiveram seu espectro de transmitância medido no Protótipo UV e no espectrofotômetro *HR4000CG-UV-NIR* da *Ocean Optics* apresentado na Figura 45. Um sistema mecânico de posicionamento foi confeccionado para que servisse de suporte para a fibra ótica, garantindo o posicionamento vertical e centralizado. Desta forma, a região da curvatura da córnea a ser medida era a mesma em ambos os sistemas. É importante notar que a interferência da curvatura da córnea sobre os feixes pode levar a resultados diferentes nos sistemas, uma vez que o feixe torna-se focalizado e a intensidade de luz por unidade de área é diferente.

Figura 45: Medida de transmitância de UV (300nm – 400nm) no espectrofotômetro da *HR4000CG-UV-NIR*: **(a)** Espectrofotômetro; **(b)** detalhes do suporte para a fibra ótica de recepção ficar na posição vertical e centralizada.

Como o sistema desenvolvido tem um feixe de referência para evitar erros devido a flutuações inerentes da eletrônica e ruídos, para comparação dos resultados entre os dois sistemas foi feito um espectro da fonte UV, que foi utilizado como linha de base. Em seguida foram obtidos os espectros de cada amostra, com tempo de aquisição de 3 segundos. O cálculo de transmitância espectral foi obtido pela divisão do espectro da amostra pelo espectro da linha de base da fonte UV, para assim se obter um valor de transmitância média final, dado pela média simples dos valores de intensidade em cada comprimento de onda de 300-400nm. Em seguida essa transmitância média foi correlacionada e analisada pelo método de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1983, 1986, 1995, 1999; HIRAKATA et al., 2009).

3.2.4 Ensaio de Córneas com remoção do tecido

O propósito deste ensaio foi de se identificar e se comparar com a literatura da área a importância das três camadas mais significativas da córnea (epitélio, estroma e endotélio) na proteção natural contra radiação ultravioleta.

Este estudo se deu ao longo de vários meses, necessitando de um grande período de experimentos preparatórios, até a definição do protocolo e todos os ajustes necessários nos procedimentos escolhidos. O ensaio final descrito neste item teve duração de mais de 50 horas, divididas em 5 dias.

O protocolo final, com procedimentos bem definidos, foi estabelecido e seguido durante o estudo, basicamente estruturado pela medida de paquimetria ultrassônica seguido pela medida da transmitância UV da córnea em cada um dos estágios (Inicial; sem epitélio; sem endotélio; corte lamelar).

A paquimetria foi realizada em todos os estágios requerendo de 5 a 30 segundos por medida e foi obtida utilizando um paquímetro de ultrassom *PacScan300p* – Figura 46a. A medida é realizada com o contato da sonda na região central da córnea como apresentado na Figura 46b e foi feita com o uso de um suporte fixo, permitindo a medida vertical e centralizada.

Figura 46: a) Paquímetro PacScan300p. b) Sonda posicionada na córnea.

O corte lamelar foi realizado pelo microcerátomo, que é um dispositivo que realiza cortes ajustáveis de finas camadas na córnea, ele é formado por um compartimento hidráulico onde a córnea é posicionada e pressionada por baixo por soro em uma pressão constante para que durante o corte siga um traçado fixo; um conjunto de lâminas que podem ser trocados para realizar os cortes em espessuras específicas; e um sistema motorizado que avança e retorna a lâmina. O microcerátomo utilizado foi o *Masik* da empresa *LOKAL* e operado pelo Prof. Dr. Sidney J. Faria e Sousa).

Ao todo foram medidas dezesseis córneas preservadas em *Optisol-GS*, com boa qualidade óptica e contagem endotelial acima de 2500 células/mm², seguindo o protocolo estipulado em quatro estágios distintos, que são apresentados nos tópicos seguintes. Cada medida de transmitância teve duração de 5 segundos, totalizando 20 segundos de exposição à radiação UV para cada córnea somando-se a exposição dos 4 estágios.

Um diagrama do protocolo é apresentado na Figura 47.

Figura 47: Diagrama do protocolo.

1. Primeiramente foram realizadas as medidas da porcentagem de transmitâncias UV e a paquimetria da córnea no estado inicial – Figura 48;

Figura 48: Medida inicial da transmitância.

A medida inicial serve de parâmetro para a comparação dos efeitos que a remoção de cada uma das camadas da córnea irá proporcionar e identifica qualquer tipo de alteração do tecido antes de se iniciar a remoção das camadas.

2. Em seqüência o tecido epitelial da córnea foi retirado com uma raspagem controlada desta camada, realizada em aproximadamente 2 minutos, e assim uma nova paquimetria e transmitância UV foram realizadas – Figura 49;

Figura 49: Remoção do Epitélio.

3. Em seqüência, foi retirada a camada endotelial, também pelo processo de raspagem, durando no máximo 1 minuto. Então foi realizada a medida da transmitância UV e a paquimetria mais uma vez – Figura 50;

Figura 50: Remoção do Endotélio.

4. Por fim foi realizado o corte lamelar utilizando um microcerátomo, que leva 10 segundos para realizar o corte, e ao todo de 5 a 10 minutos contando a montagem, posicionamento da córnea, estabilização da pressão para o corte e outros ajustes. E por uma última vez foi feita a medida de transmissão UV e paquimetria – Figura 51.

Figura 51: a) Corte lamelar – Microcerátomo. b) Lamela cortada.

Em cada uma das etapas do protocolo, foram realizadas medidas paralelas para captação do espectro de transmitância, utilizando um espectrofotômetro *HR4000CG-UV-NIR* (*Ocean Optics*), para futura comparação de correlação. Os gráficos de transmitância foram obtidos pela divisão do espectro da córnea em cada estágio, pelo da linha de base da fonte UV, e a transmitância média foi calculada pela média aritmética dos valores em cada comprimento de onda.

As transmitâncias em cada etapa do protocolo foram então analisadas pelo método de Medidas Repetidas Unifatorial (ANOVA), e quando estatisticamente significativas foram analisadas pelo teste de *Bonferroni* (HOCHBERG, 1988; RIFFENBURGH, 2005; SIMES, 1986), para determinação de quais variações realmente são significativas.

Também foi realizado a correlação entre as medidas do espectrofotômetro *HR4000CG-UV-NIR* (*Ocean Optics*), e do protótipo UV pelo método de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1983, 1986, 1995, 1999; HIRAKATA et al., 2009).

3.2.5 Ensaio de Córneas simulando a cirurgia foto-refrativa

O objetivo deste ensaio em particular foi de se identificar qual o impacto da cirurgia foto-refrativa (PRK) na proteção natural da córnea contra radiação ultravioleta, uma vez que neste tipo de cirurgia tem-se a retirada de tecido do epitélio e de parte do estroma. Assim, após alguns experimentos preparatórios, para definição do protocolo e ajustes nos procedimentos, o ensaio final descrito neste capítulo teve duração de 20 horas, divididas em 3 dias.

A paquimetria foi novamente realizada como no item **4.2.4** utilizando o paquímetro ultra-sônico *PacScan300p*. A Figura 52 mostra o suporte e a medida da paquimetria na região central da córnea.

Figura 52: Paquimetria, suporte e medida.

Neste ensaio um novo protocolo foi implementado e seguido durante todo o estudo, no qual foram feitas as medidas da transmitância UV da córnea e a paquimetria em três estágios. As medidas de transmitância tiveram duração de 5 segundos cada uma, totalizando 15 segundos de exposição a radiação UV em cada uma das córneas quando somada a exposição dos 3 estágios. O protocolo e cada um dos procedimentos são mais bem abordados nos tópicos seguintes.

Um diagrama do protocolo é apresentado na Figura 53.

Figura 53: Protocolo do estudo simulado da cirurgia foto-refrativa.

1. Paquimetria e porcentagem de transmitâncias UV da córnea no estado inicial – Figura 54, estabelecendo a transmitância natural das córneas analisadas;

Figura 54: Transmissão Inicial.

2. Na segunda etapa o tecido epitelial da córnea foi retirado com uma raspagem controlada, um procedimento que demanda no máximo 2 minutos para ser completada, e assim uma nova paquimetria e medida de transmitância UV foram realizadas – Figura 55;

Figura 55: Remoção Epitelial antes da segunda medida da transmitância UV.

3. Por último o corte lamelar no estroma utilizando um microcerátomo, procedimentos este que demora de 10 a 15 minutos para preparação e execução, já o corte com a passagem da lamina ocorre em 10 segundos. Assim a última paquimetria e medida da transmitância UV foi realizada – Figura 56.

Figura 56: Corte lamelar com o microcerátomo simulando a cirurgia foto-refrativa.

A fim de verificar a correlação das medidas da transmitância UV com a redução de tecido do nosso protótipo com o espectrofotômetro *HR4000CG-UV-NIR* (*Ocean Optics*), após cada medida no nosso protótipo outra medida equivalente foi tomada com o espectrofotômetro como apresentada na Figura 57.

Figura 57: Medida da transmitância com o espectrofotômetro *Ocean Optics*.

As medidas foram realizadas no mesmo suporte do protótipo e com a mesma fonte de radiação UV. O cálculo de transmitância espectral é o mesmo já utilizado, dado pela divisão do espectro da amostra pelo espectro da linha de base da fonte UV, com a transmitância média final de cada amostra calculado pela média simples dos valores de intensidade em cada comprimento de onda de 300-400nm.

As transmitâncias em cada uma das etapas do protocolo foram analisadas pelo método ANOVA (Medidas Repetidas Unifatorial), e em seguida foi aplicado o teste de *Bonferroni* (HOCHBERG, 1988; RIFFENBURGH, 2005; SIMES, 1986). A correlação entre as medidas dos dois sistemas foram realizadas utilizando o método de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1983, 1986, 1995, 1999; HIRAKATA et al., 2009).

3.2.6 Ensaio de Paquimetria: Ultrassônica x Mecânica

Apesar de se ter construído um sistema estável para realizar as medidas paquimétricas na córnea, realizou-se o seguinte teste: a córnea de um globo ocular humano foi retirada e realizada a paquimetria em dois aparelhos comerciais:

- a) Sonomed *PacScan300p*;
- b) Alcon *OcuScan*.

A medida apresentou uma repetibilidade 90% no paquímetro Sonomed, quando operado pelo mesmo usuário, e o tempo de medida variou de 5 até 60 segundos. Já a paquimetria realizada no Alcon tinha um repetibilidade muito menor, em torno de 70%, e tempo de medida de 10 a 80 segundos. Apresentando ainda variações bruscas dependendo da inclinação da sonda.

Para garantir as medidas de paquimetria foi elaborada uma série de procedimentos utilizando uma linha de montagem para avaliação da paquimetria. Assim, foi utilizado um micrômetro mecânico com visor digital de ponta fina *Digimess IP54* de 0.001mm de precisão; um sistema de magnificação de imagem de 10X acoplado com uma câmera de vídeo do tipo CCD (*WATEC 221S*), que por sua vez disponibilizava as imagens num laptop; e um suporte para que o micrômetro ficasse

centralizado e na posição vertical para as medidas. A Figura 58 mostra a foto do sistema montado para as avaliações com o micrômetro mecânico.

Figura 58: Sistema de medida de espessura com micrômetro mecânico.

A Figura 59 apresenta a tela com uma seqüência de imagem ampliada em 10X que é apresentada no computador para a correta visualização das medidas.

Figura 59: Tela visualizada no computador pelo usuário. Seqüência com seis imagens até o contato da ponta do micrômetro com a córnea.

O processo consistiu no seguinte protocolo: oito olhos, com até 72 horas post-mortem foram selecionados, retirados da geladeira, suas córneas removidas, rotuladas de 1-8 e colocadas em seqüência, como apresentadas na Figura 60. Este experimento levou ao todo 10 horas para ser montado e executado.

Figura 60: Disposição das 8 córneas utilizadas nas medidas de paquimetria.

O paquímetro *Sonomed*, que apresentou a maior repetibilidade para o uso clínico, foi selecionado para fazer as medidas. Neste paquímetro por ultrassom foram realizadas três medidas por dois usuários e quatro medidas por um usuário, totalizando 10 medidas em cada córnea. Cada usuário apresentou um tempo de medida similar variando entre 5 a 60 segundos por córnea. Esse tempo é tomado considerando todo o procedimento de medida, desde o posicionamento da córnea até a medida em si.

As mesmas oito córneas foram submetidas a mais cinco medidas, por cada um dos três usuários, utilizando o micrômetro mecânico. Assim um total de 15 medidas foi realizado. Nesta etapa cada usuário também apresentou um tempo de medida similar, variando de entre 5 a 30 segundos por córnea. Tempo estimado no procedimento como um todo, ou seja, posicionamento da córnea e manipulação do micrometro até contato da ponta.

O usuário que realizava as medidas não podia saber do resultado, ou seja, uma segunda pessoa anotava os resultados para que não houvesse influência na medida posterior ou no descarte de alguma medida no ato da medição.

3.2.7 Ensaio de Fluorescência da córnea durante o Crosslinking

O objetivo deste ensaio foi observar a fluorescência do colágeno corneano antes, durante e depois do *crosslinking*, tentando identificar alguma mudança espectral do gráfico de fluorescência o que poderia caracterizar o processo de fortalecimento das fibras de colágeno, permitindo assim um acompanhamento personalizado do tratamento para cada paciente.

Este estudo foi desenvolvido em um período de 4 meses, e o estudo final apresentado neste item foi realizado num total de 10 horas. Foram utilizados quatro olhos humanos enucleados com média de 1,5 dias de captação. Na Tabela 5 tem-se os dias post-mortem de cada olho.

Tabela 5: Dias post-mortem dos olhos utilizadas na medida de fluorescência.

Olho	Dias post-mortem
1	2
2	2
3	1
4	1
Média	1,5

Cada olho foi posicionado em um aparato fixo e estável, onde o procedimento padrão do *crosslinking* foi aplicado (desepitelização da córnea; riboflavina 0,1% instilada na córnea a cada 5 minutos por um total de 30 minutos; emissão de UV utilizando o equipamento *XLINK (Opto Eletrônica)* por 30 minutos – $365\pm 5\text{nm}$, $3\text{mW}/\text{cm}^2$, 1.51mW , $5.405\text{J}/\text{cm}^2$, 8mm de diâmetro, 45mm de distância – sempre instilando riboflavina a cada 5 minutos.

Durante o tratamento uma fibra óptica UV-VIS ($600\mu\text{m}$ de diâmetro) foi posicionada próximo a córnea em um ângulo aproximado de 45° , realizando a captação da fluorescência da córnea e da riboflavina utilizando a excitação da própria fonte de luz UV (365nm) do tratamento.

A Figura 61 mostra o suporte e o posicionamento da fibra óptica.

Figura 61: Captção da fluorescência – suporte e posicionamento da fibra óptica.

Assim para cada um dos olhos, foram obtidos os espectros de fluorescência das seguintes combinações:

- Córnea: espectro de fluorescência da córnea no estado inicial sem epitélio – na Figura 62 tem-se o processo de desepitelização da córnea e o momento da captura do espectro de fluorescência do olho;

Figura 62: (a) Desepitelização da córnea; (b) captura do espectro de fluorescência do olho.

- Riboflavina: espectro de fluorescência da riboflavina utilizada no tratamento na concentração de 0,1% - Figura 63.

Figura 63: Captura do espectro de fluorescência da Riboflavina. a) Detalhe do *probe* de captura da fluorescência; b) Emissão do UV e fluorescência da Riboflavina.

- Córnea + Riboflavina: espectro de fluorescência da combinação córnea mais riboflavina durante as 6 instilações e os 30 minutos de preparação para aplicação do UV. As fotos apresentadas na Figura 64 mostram o momento da instilação de riboflavina e a captura do espectro do olho já com riboflavina;

Figura 64: Captura do espectro de fluorescência do olho + riboflavina. a) Instilação da riboflavina durante o tratamento; b) Captura do espectro de fluorescência.

- **Córnea + Riboflavina + Crosslinking:** espectro de fluorescência da córnea durante a irradiação UV por 30 minutos. Tem-se na Figura 65 a captação do espectro de fluorescência durante o *crosslinking* por dois ângulos diferentes, onde pode-se observar a luz de excitação UV e a luz da fluorescência.

Figura 65: Captura do espectro de fluorescência da córnea + riboflavina + *crosslinking*. a) Vista frontal; (b) Vista Lateral.

Na medida da fluorescência da riboflavina e da primeira etapa durante a instilação de riboflavina o espectro foi captado ao se ligar a fonte UV do *crosslinking* por 3 segundos. Já na fase final do tratamento os espectros foram captados continuamente durante o tratamento.

A fibra óptica utilizada foi conectada ao espectrofotômetro *USB2000-UV-VIS* (*Ocean Optics*), e os espectros de fluorescência de cada etapa foram armazenados no computador. A análise se deu pela comparação dos espectros.

3.2.8 Ensaio de análise de absorbância da córnea no *crosslinking*

O objetivo deste estudo foi observar os espectros de absorbância utilizando o espectrofotômetro *Cary 5000 - VARIAN* (Figura 66) na região de 280-800nm, em temperatura ambiente, nas córneas humanas *in vitro* submetidas ao procedimento do *crosslinking*, a fim de identificar possíveis alterações na estrutura do espectro de absorbância da córnea durante e depois do tratamento.

Figura 66: Espectrofotômetro Cary 5000 – VARIAN, utilizado nas medidas de absorvância espectral das córneas *in vitro*.

Este experimento foi planejado e executado em 5 meses, considerando todos os ajustes necessários nas configurações do suporte apropriado para posicionar a córnea no espectrofotômetro e na definição do protocolo de medida, de forma a não apresentar comprometimentos no tratamento e nas medidas. O procedimento descrito foi realizado em um período de 40 horas, divididas em 4 dias.

Foram utilizadas dez córneas humanas preservadas em *Optisol-GS* com média de 7 dias de captação e espessura média de 562 μ m, medida pelo paquímetro corneano SW-1000P (Suowei®). A Tabela 6 apresenta as informações individuais de espessura e dias post-mortem.

Tabela 6: Córneas utilizadas na medida de absorbância.

Córnea	Espessura (μm) $\pm$ 70 μm	Dias post-mortem
1	657	11
2	604	9
3	514	9
4	568	9
5	574	10
6	528	10
7	608	3
8	601	3
9	464	3
10	498	3
Média	562	7

As córneas foram lavadas com soro fisiológico 0,9% para remoção do *Optisol-GS*, pois este meio poderia interferir pela suas características de absorção na região do procedimento do *crosslinking* pelo equipamento *XLINK (Opto Eletrônica)* - 365nm, na Figura 67 é apresentado o espectro de transmitância do *Optisol-GS* na região de 280-800nm, onde pode-se observar uma transmitância de cerca de 50% na banda de pico em 365nm.

Figura 67: Espectro de transmitância do *Optisol-GS*.

As amostras foram então posicionadas em um suporte semi-esférico de aço inox com um orifício central de 6mm, como ilustrado na Figura 68. O suporte foi projetado para manter as córneas analisadas com um raio de curvatura fixo e estável, $r = 8,55\text{mm}$.

Figura 68: Suporte semi-esférico.

Cada uma das dez córneas seguiu o protocolo padrão do *crosslinking* a seguir:

- Desepitelização da área de 8mm central da córnea, analisada em biomicroscópio, instilação de uma gota de riboflavina 0,1% na córnea desnuda, a cada 5 minutos, totalizando 60 minutos e 12 instilações;
- Irradiação por UVA ($365\pm 5\text{nm}$, 3mW/cm^2 , $1,51\text{mW}$, $5,405\text{J/cm}^2$, 8mm de diâmetro de feixe, 45mm de distância entre amostra e fonte) iniciada após a sétima instilação, finalizando após 30 minutos de irradiação contínua.

O procedimento é exemplificado pelo diagrama mostrado na Figura 69.

Figura 69: Diagrama do procedimento do *crosslinking*.

As dez córneas foram analisadas em quatro estágios distintos (Inicial, pós-riboflavina, pós-*crosslinking*, pós-lavagem):

- Inicial: espectro pré-tratamento, com a medida inicial da córnea *in vitro* desepitelizada;
- Pós-riboflavina: espectro intermediário após a instilação de riboflavina por 30 minutos com uma gota a cada 5 minutos;
- Pós-*crosslinking*: espectro pós-tratamento, após a irradiação de ultravioleta por 30 minutos;
- Pós-lavagem: espectro final, após a lavagem da córnea para remoção do excesso de riboflavina.

Cada uma das córneas foi posicionada ,com o suporte semi-esférico de raio $r= 8,55\text{mm}$, no espectrofotômetro (*Cary 5000 - VARIAN*) Figura 70, e o espectro de absorbância foi obtido na região de 280-800nm com passos de 1nm, e com tempo médio para aquisição de cada espectro de 1 minuto. O processo foi repetido em todos os quatro estágios.

Figura 70: Suporte semi-esférico com a córnea posicionado no Espectrofotômetro *Cary 5000* – *VARIAN*. Vista superior.

3.2.9 Ensaio de Transmitância UV da córnea durante crosslinking

Este estudo tem como intuito verificar a quantidade de radiação ultravioleta que atravessa a córnea durante o tratamento do *crosslinking*, analisando a porcentagem de transmissão e a potência de radiação, durante os 30 minutos de tratamento com alta exposição UV, os quais podem atingir as estruturas oculares posteriores.

O planejamento e execução deste ensaio aconteceram em um período de 12 meses, e o estudo apresentado neste tópico ocorreu ao longo de 80 horas, divididos em 10 dias. Foram utilizadas ao todo 29 *in vitro*, lavadas com soro para retirada do excesso de *Optisol-GS*, por este componente poder interferir nas medidas de transmitância durante o tratamento, uma vez que esta substância absorve na região analisada, como já apresentado na Figura 67.

As córneas foram então submetidas ao procedimento padrão do *crosslinking*, cujo protocolo do tratamento pode ser dividido em três etapas dadas por:

- a) Raspagem epitelial – Figura 71 – A remoção do epitélio foi realizada pelo médico responsável, utilizando um microscópio para se certificar da retirada total do tecido na região central;

Figura 71: Raspagem epitelial da córnea antes do procedimento.

- b) Instilação de uma gota da solução de riboflavina 0.1% (*Ophthalmos*®) a cada 5 minutos por um total de 30 minutos – Figura 72;

Figura 72: Instilação de riboflavina na córnea.

- c) Irradiação de ultravioleta UVA-365nm (*XLINK – Opto Eletrônica*) com potência de 3mw/cm^2 por mais 30 minutos sempre instilando a solução de riboflavina a cada 5 minutos – Figura 73.

Figura 73: Irradiação UV durante o procedimento do *Crosslinking*.

Todas as córneas tiveram sua paquimetria inicial sem epitélio medida, sendo realizadas 10 medidas por córnea, sempre com a ponta da sonda posicionada na região central da córnea. As medidas foram realizadas utilizando um paquímetro SW-1000P (Suowei®), que apresenta um feedback visual e sonoro durante a medida, o aviso visual é dado através da ilustração das ondas de reflexão do ultrassom, um exemplo da medida com a tela do equipamento e apresentada na Figura 74.

Figura 74: Paquimetria da córnea desepitelizada.

Os dias post-mortem, até a data em que foi executado o procedimento, também foram registrados juntos com a data de coleta da córnea e com o código de referência que é utilizado para controle do banco de olhos. O frasco de conservação contendo a córnea preservada em *Optisol-GS*, com as informações da mesma, é apresentado na Figura 75.

Figura 75: Frasco com as informações específicas contendo a córnea utilizada.

Os valores médios da paquimetria das 29 córneas, assim como o desvio padrão e os dias post-mortem, são apresentados na Tabela 7. As córneas que passaram pelo procedimento apresentaram uma paquimetria média de 569 μ m e uma média de dias post-mortem de 6 dias.

Tabela 7: Espessura e dias post-mortem das córneas utilizadas.

Córnea	Espessura (μm)	Dias post-mortem
1	565	5
2	608	5
3	649	5
4	464	4
5	498	4
6	520	7
7	502	3
8	651	8
9	598	6
10	657	11
11	604	9
12	514	9
13	568	10
14	574	10
15	528	11
16	642	3
17	632	3
18	514	3
19	508	2
20	565	1
21	488	1
22	682	1
23	591	11
24	507	11
25	537	11
26	503	8
27	569	8
28	624	5
29	640	5
Média	569	6

O suporte para sustentação da córnea e posicionamento da fibra óptica – BIF600-UV/VIS *Ocean Optics* – foi melhorado a cada experimento, passando por quatro estágios de evolução descritos a seguir.

- **SUPORTES:**

- **ACRÍLICO 1**

No primeiro experimento foi utilizado um suporte acrílico (câmara de preservação – *Chiron Ophthalmics*) com um furo central, no qual a fibra óptica ficava presa por pressão a 50mm do endotélio. A desvantagem deste sistema foi à dificuldade para manter a estabilidade da fibra óptica e as complicações para o escoamento da riboflavina durante o tratamento. Na Figura 76 tem-se a apresentação do primeiro suporte desenvolvido.

Figura 76: Primeiro suporte – fibra à 50mm a partir do endotélio. a) Vista lateral; b) Vista superior.

- **ACRÍLICO 2**

O segundo suporte utilizado na sustentação da córnea e na fixação da fibra óptica foi melhorado, utilizando apenas a tampa da câmara do suporte acrílico (câmara de preservação – *Chiron Ophthalmics*) com um furo central, porém a fibra óptica foi fixada mais abaixo por um sistema mecânico a 100mm a partir do endotélio. Os problemas deste suporte foram dados pela distância da fibra óptica em relação a córnea, e na limitação na parte final do tratamento com o acúmulo de riboflavina que poderia atrapalhar as medidas. Este segundo suporte é apresentado na Figura 77.

Figura 77: Segundo suporte confeccionado: fibra à 100mm a partir do endotélio. a) Durante o ajuste da mira; b) Durante a irradiação do UV.

▪ Alumínio

O terceiro suporte foi confeccionado em alumínio, especialmente para este experimento. Para sustentação da córnea foi criado um suporte semi-esférico, mantendo a curvatura da córnea analisada constante durante todo o procedimento, com $r = 8,55\text{mm}$. A fixação da fibra óptica foi aperfeiçoada com a adaptação da mesma rosca da cabeça da fibra na base do suporte de alumínio, criando uma vedação e uma fixação ideal. Outro atributo melhorado foi o escoamento da riboflavina durante o tratamento, permitida pela canaleta criada no suporte de alumínio. O único problema aparente deste suporte foi o fato da fibra ter ficado posicionada a 17,8mm do endotélio, não tão perto da córnea quanto poderia ter sido planejada. O terceiro suporte é ilustrado pela foto apresentada na Figura 78.

Figura 78: Terceiro suporte confeccionado: fibra à 17,8mm a partir do endotélio. a) Detalhe superior; b) Detalhe lateral.

▪ TEFLON

O quarto e ultimo suporte utilizado não apresentou problemas de nenhuma natureza, contornando todos os problemas encontrados anteriormente. O suporte foi desenvolvido em teflon branco, com uma peça de aço inox com uma ponta semi-esférica para posicionamento da córnea (mantendo a curvatura e estabilidade do tecido com $r = 8,55\text{mm}$) e na outra ponta a rosca complementar da ponta da fibra óptica (mantendo a fibra muito próxima da superfície posterior da córnea, a apenas $0,3\text{mm}$). Todas as peças são esterilizáveis e reutilizáveis mesmo quando em contato com material contaminado. A Figura 79 mostra o último suporte desenvolvido, o qual apresentou a maior confiabilidade e estabilidade das medidas.

Figura 79: Quarto suporte confeccionado: fibra à $0,3\text{mm}$ a partir do endotélio. a) Vista total do sistema; b) Detalhe do suporte.

Assim, é apresentado o sistema final composto por um suporte de teflon com canaleta para escoamento da riboflavina excedente, um suporte de aço inox semi-esférico (para manter a córnea estabilizada durante todo o procedimento com $r = 8,55\text{mm}$), uma fibra óptica – BIF600-UV/VIS *Ocean Optics* – (núcleo de $600\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro) com boa transmissão no UV acoplada a semi-esfera em uma ponta e na outra ponta ao espectrofotômetro *USB2000-UV-VIS (OceanOptics)* para captura a transmitância UV durante o procedimento. Na Figura 80 tem-se a montagem completa do sistema, como equipamento de irradiação UV *OPTO XLINK - Corneal Crosslinkig System (Opto Eletrônica)*, Paquímetro *SW-1000P (Suoweí)*, espectrofotômetro *USB2000-UV-VIS (OceanOptics)*.

Figura 80: Sistema de medidas da transmitância do UVA em procedimento de crosslinking corneando em córneas doadas.

A fibra óptica foi posicionada sob o aparato alinhada com o feixe de emissão do equipamento de *crosslinking*. Como primeiro passo foi obtido uma linha de base do sistema sem a córnea, registrando a quantidade de UV que atingia a fibra com exposição direta por 3 segundos do feixe UV, ajustado para a potência de $3\text{mw}/\text{cm}^2$. Na Figura 81 tem-se o gráfico de transmitância gerado pelo canhão de UV do *crosslinking* e captado pela fibra óptica acoplada ao espectrofotômetro.

Figura 81: Linha de base do ar para transmitância obtida no espectrofotômetro USB2000 – Ocean Optics.

Posteriormente a córnea foi posicionada no aparato e um novo espectro, agora da transmitância inicial da córnea foi obtido pela emissão de UVA – 370nm - por 3 segundos, registrando a transmissão natural da córnea antes do tratamento. Pelos espectros da Figura 82 podem-se observar a redução dos valores absolutos de transmitância do sistema da córnea quando comparado com a linha de base, correspondente a proteção UV natural da córnea, nesta região do espectro.

Figura 82: Comparação do espectro de transmitância da córnea com o da linha de base.

Durante a fase inicial do tratamento, que corresponde à instilação de riboflavina a cada 30 minutos, foi realizada a medida de transmitância a cada 5 minutos, antes e após a instilação da riboflavina. O espectro de transmitância foi obtido pela irradiação da córnea por 3 segundos pelo próprio equipamento de *crosslinking*.

A faixa de comprimento de onda escolhida para a análise da transmitância vai de 360nm até 370nm, pois é a região que apresenta a maior intensidade no espectro do equipamento. O espectro de transmitância foi calculado pela divisão do espectro de intensidade UV em cada medida pelo espectro da linha de base sem a córnea. E por fim a transmitância média foi calculada pela média aritmética simples do espectro de transmitância.

3.2.10 Ensaio de Transmitância UV com desidratação da córnea

A luz que se propaga pela córnea apresenta uma atenuação dada pelo espalhamento e pela absorção, a intensidade I da luz propagada pela córnea de espessura d é definida pela lei de Beer dada pela Equação 18 (GORDON, 1995; PIRCHER *et al.*, 2003).

$$I(\lambda, d) = I_0(\lambda).e^{-d.(\mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda))} \quad (18)$$

Onde I_0 é a luz incidente na amostra, λ é o comprimento de onda, μ_a é o coeficiente de absorção e μ_s é o coeficiente de espalhamento.

Neste estudo foram utilizadas quatro córneas *in vitro* preservadas em OPTISOL-GS, com média de seis dias post-mortem e paquimetria média de $542,3 \pm 20,5 \mu\text{m}$. A espessura da córnea foi medida antes e depois do tratamento pelo paquímetro SW-1000P (Suoweï®).

Cada uma das córneas foi retirada do frasco de preservação e para remoção do excesso de OPTISOL-GS as córneas foram lavadas com solução salina. As córneas foram desepitelizadas por raspagem mecânica com uma lâmina, e depois foram posicionadas em um aparato com suporte semi-esférico, apresentado na Figura 83, para uma permanência constante da curvatura da córnea com $r = 8,55\text{mm}$ durante as medidas de transmitância.

Figura 83: Detalhe do aparato de sustentação e de medida da córnea durante os estudos.

Uma fibra óptica – BIF600-UV/VIS *Ocean Optics* – com boa transmitância no UV e com 600 μm de diâmetro foi posicionada na parte posterior da córnea próxima ao endotélio.

Na Figura 84a traz o espectro de transmissão da fibra. A fibra foi conectada ao espectrofotômetro *USB 2000 UV-VIS* da *Ocean Optics*, que por sua vez mostra e armazena os dados em um notebook. O equipamento de *crosslinking OPTO – Xlink* foi utilizado como fonte de irradiação UV para as medidas de transmitância, com pico de emissão em 365nm e com largura de banda considerada nas medidas de 360-370nm. Antes do posicionamento da córnea o sistema foi calibrado mantendo a superfície superior do suporte a 45mm da fonte de irradiação com uma potência de 1,51mW, irradiação de 3mW/cm² e spot de 8mm, seguindo o protocolo padrão deste tipo de tratamento (WOLLENSAK et al., 2011).

Na Figura 84b tem-se o espectro inicial medido e armazenado e que foi utilizado como linha de base (L_Base).

Figura 84: a) Espectro de transmissão da Fibra; b) Espectro de Linha de Base – UV 3mW/cm²

Obteve-se então, o espectro de transmitância da córnea (Tc_Inicial). Em seguida iniciaram-se as medidas relativas ao estudo da variação da transmitância UV no período de 1 hora, e a cada 5 minutos o equipamento *Xlink* foi ligado por um período não maior do que 3 segundos para a captura e armazenamento de um novo espectro de transmitância, totalizando 12 espectros com transmitância proporcional ao tempo de desidratação (D_5min, D_10min, D_15min, D_20min, D_25min, D_30min, D_35min, D_40min, D_45min, D_50min, D_55min, D_60min).

As medidas de transmitância por período de tempo da desidratação foram obtidas da divisão dos espectros em cada etapa do estudo pelo espectro de linha de base, calculadas pela média na região de interesse 360-370nm. Foi realizado

também um cálculo teórico da variação da transmitância UV, utilizando o coeficiente de absorção e espalhamento da água na região UV-365nm (MOREL et al., 2007; SOGANDARES; FRY, 1997), e a espessura da água perdida durante o processo de desidratação.

A análise estatística foi realizada utilizando o método ANOVA de Medidas Repetidas Unifatorial, verificando a significância estatística da variação da transmitância ao longo do tempo de desidratação. Por fim foi realizada uma comparação *post hoc* entre todos os pares de córneas utilizando o teste de Bonferroni (HOCHBERG, 1988; RIFFENBURGH, 2005; SIMES, 1986), para identificação dos períodos específicos onde são observadas variações significativas da transmitância UV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados deste trabalho e suas respectivas discussões estão categorizados, em subitens, para melhor organização e entendimento.

4.1 Desenvolvimento do Protótipo de Transmitância UV

O protótipo para medida de transmitância UV apresentou resultados coerentes, atendendo aos requisitos necessários e essenciais para realizar as medidas de transmitância média na região UV para medidas em córneas.

A potência média que atinge a córnea durante a medida é de $0,100\text{mW/cm}^2$, o que não causa dano ao tecido durante o tempo de medida da amostra.

Na Tabela 8 é apresentada uma análise comparativa qualitativa de características técnicas dos sistemas desenvolvidos comparando as principais diferenças entre cada versão. A resolução corresponde ao menor valor detectado pelo sistema de medida; a tolerância mostra as variações de medida; o tempo de aquecimento diz respeito ao tempo mínimo que o sistema precisa para estabilizar a emissão da fonte de UV e apresentar resultados confiáveis; o tempo de resposta corresponde ao tempo necessário para estabilização da medida; e a conectividade apresenta os meios de interação com o usuário e apresentação da medida.

Tabela 8: Comparação entre as versões do sistema UV desenvolvido.

Versão N°	Resolução (%)	Tolerância (%)	Tempo de Aquecimento (min)	Tempo de Resposta (s)	Conectividade
1	2,5	5	5	25	Display LCD
2	1	0,5	3	10	Display LCD
3.A	0,25	0,25	< 1	< 1	Display LCD
3.B	0,25	0,25	< 1	< 1	USB - PC

O protótipo final utilizado (versão 3A) é apresentado na Figura 85, realizando uma medida de transmitância com o valor em tempo real mostrado no *display*.

Figura 85: Última versão do Protótipo UV – 3A.

Esse protótipo apresentou um sistema confiável para ser utilizado no banco de olhos na análise de córneas, bem como disponibilizar novos meios para os clínicos realizarem experiências sobre a proteção UV natural das córneas doadas, como mostra a comparação com o espectrofotômetro *CARY-17* da *VARIAN* a seguir.

O sistema apresentou uma tolerância na medida de 0,25%, que está dentro dos limites necessários de 0,5% neste tipo de medição (KOLOZSVÁRI et al., 2002).

4.2 Ensaios

Cada um dos resultados dos ensaios deste trabalho está arranjado, em subitens, apresentando uma estrutura mais bem organizada facilitando a compreensão de cada experimento.

4.2.1 Determinação da Região Linear do Sensor

Na Figura 86 é apresentada a curva resultante da resposta do sensor UV pela variação de intensidade de UV. O ajuste dos dados fornecidos pelo gráfico mostra que a equação expressa pela transmitância em função do ângulo obedece à lei de Malus (GHATAK, 2008; HECHT, ZAJAC, 2009), e assim para a fonte de luz utilizada no projeto e para região UV de interesse (300-400nm) o sensor apresenta uma resposta linear.

Figura 86: Gráfico da Lei de Malus – Valores Experimental (azul) x Teórico (vermelha).

4.2.2 Amostras de Acrílico

Para a comparação de amostras padronizadas, foram utilizadas inicialmente três placas de acrílico (com diferentes composições e diferentes espectros de transmitância) para medidas no Protótipo de medida de transmitância UV. Cada placa de acrílico medida apresenta uma porcentagem de transmitância UV característica que foi testada repetidamente no protótipo. A cada medida realizada a amostra era retirada e recolocada para aquisição da nova transmitância, para teste de repetibilidade do sistema. As medidas estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9: Repetibilidade da Transmitância UV das amostras acrílicas medidas no Protótipo 3A.

Amostra de Acrílico	Transmitância UV - %								
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Tipo A1 - 1,20mm	82,4	82,5	82,4	82,3	82,4	82,4	82,4	82,4	82,4
Tipo A2 - 2,20mm	91,9	92,0	92,0	91,9	91,9	91,9	91,9	91,9	91,9
Tipo A1 - 3,54mm	59,7	59,6	59,6	59,7	59,8	59,7	59,7	59,7	59,7

A transmitância UV das 3 placas de acrílico durante o estudo de repetibilidade, com nove medidas por amostra, não apresentou alteração estatística significativa ($P=0,6551$) pelo método ANOVA de medidas repetidas unifatorial.

Para analisar a coerência das medidas realizadas pelo Protótipo UV com o espectrofotômetro *Cary 17*, foram analisadas ao todo 8 amostras em ambos os sistemas, assim foi gerado um diagrama de correlação entre as médias de transmitância de cada equipamento. O Gráfico de correlação é apresentado na Figura 87, com fator $r^2 = 0,9997$, indicando a concordância entre os dois sistemas.

Figura 87: Diagrama de correlação das amostras de acrílico – Protótipo 3A x Cary 17.

Foi obtido também um gráfico da diferença para as amostras de acrílico, Figura 88, onde é visualizado o viés de 1,60% (o quanto as diferenças se afastam do

valor zero ideal), o erro (a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média), e os limites correspondentes para 95% de concordância, entre 0.55 – 2.65%.

Figura 88: Diagrama da diferença das amostras de acrílico – Protótipo 3A x Cary 17.

A Figura 87 mostra que embora os dados tendam a ser correlatos (o que é efetivamente confirmado pelo fator de correlação $r^2 = 0,9997$) nosso protótipo tende a medir sempre mais que o espectrofotômetro Cary 17. A Figura 88 mostra as diferenças de transmitância para cada par de medidas cotejada com a média das mesmas. Mostra ainda os limites superiores e inferiores de concordância entre as medidas ou seja a diferença média $\pm 1,96$ desvios padrões. Assim como as diferenças seguem distribuição normal espera-se que 95% delas esteja dentro dos limites de concordância, fato que acabou acontecendo.

Pode-se então identificar dois componentes entre as discordâncias de medidas: um componente sistemático (representado pela média) de +1,6% em favor do Protótipo 3.A e um viés aleatório de aproximadamente 1%. O componente sistemático poderá ser corrigido por ajustes apropriados na parte mecânica, pela correção da distância do sensor até a superfície da semi-esfera que serve de aparato para o material de medida, ou uma correção via *software* pela compensação no cálculo de transmitância. O viés aleatório é mais difícil de se corrigir porém apresentou um valor tolerável para este tipo de medida.

Estas medidas foram realizadas com amostras de acrílico rígidas, assegurando que o tempo de medida e outros fatores (compressão, posicionamento, focalização, degradação) não interfiram nas propriedades ópticas (como pode ocorrer na córnea humana com o decorrer do tempo) e consequentemente possam gerar alterações nos valores de transmitância. Assim foi possível proporcionar uma correlação efetiva entre os dois aparelhos.

4.2.3 Ensaio em Córneas *in vitro*

Garantida a correlação entre os aparelhos, foram realizados ensaios com as amostras de nosso interesse: as córneas humanas preservadas. Nesta etapa foram analisadas repetidamente 6 córneas *in vitro* preservadas. Os resultados da transmitância inicial de cada córnea são apresentados na Tabela 10, onde pode-se observar a boa estabilidade e repetibilidade com variações inferiores a 0,25%. A contagem endotelial, que é um dos itens que demonstra a vitalidade da córnea foi realizada pelo Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

As medidas foram analisadas pelo método ANOVA, e não apresentaram relevância estatística significativa ($P=0,13701$) na variações de transmitância ao longo da repetição de cinco medições por amostra.

Tabela 10: Transmitância UV de córneas *in vitro* no estágio inicial.

Córnea	Transmitância UV - % Estado Inicial					Contagem Endotelial (células/ mm ²)
	M1	M2	M3	M4	M5	
1	63,7	63,7	63,7	63,7	63,7	2946
2	61,5	61,5	61,4	61,4	61,5	2811
3	58,9	59,0	59,0	59,0	59,0	2767
4	60,1	60,2	60,1	60,1	60,1	2667
5	59,1	59,1	59,1	59,1	59,1	2526
6	60,9	60,9	60,8	60,8	60,9	2807

Para análise de correlação foram utilizados os dados de transmitância inicial das córneas *in vitro* captados em **todos os ensaios**, resultando num total de **40 córneas** medidas nos dois sistemas. O diagrama de correlação das córneas em seu estado inicial é apresentado na Figura 89, indicando a coerência das medidas do protótipo UV quando relacionadas com o espectrofotômetro *HR4000CG-UV-NIR* da *Ocean Optics*, apresentando um fator $r^2 = 0,9898$.

Figura 89: Diagrama de Correlação das 40 córneas (Inicial) – Protótipo 3B x *Ocean Optics*.

Na Figura 90 é apresentado o gráfico da diferença da transmitância inicial, onde a comparação dos sistemas apresenta o viés de 1,37%, indicando a pequena variação entre as médias. Ainda é possível notar que todos os dados se encontram dentro do intervalo com 95% de confiança, marcados pelos limites de concordância de 0.60 – 2.15% (variação de transmitância UV entre os dois sistemas).

Figura 90: Diagrama da diferença das córneas no estado inicial – Protótipo 3B x *Ocean Optics*.

Aqui também observa-se forte correlação entre as medidas ($r^2 = 0,9898$) e a repetição do fato do nosso protótipo fornecer consistentemente valores maiores de transmitância que o espectrofotômetro. A Figura 90 mostra as diferenças de transmitância para cada par de medidas cotejada com a média das mesmas. Mostra ainda os limites superiores e inferiores de concordância entre essas medidas. O erro sistemático é até ligeiramente menor ou seja de 1,37%. O viés aleatório passa a ser de 0,8% ou seja muito próximo do achado no experimento com as peças de acrílico. Reforça-se portanto a ideia de que nosso protótipo exagera na medida da transmitância da ordem de 1 a 1,5%,

Estes ensaios serviram como validação inicial do sistema de média UV para córneas, uma vez que a transmitância média inicial de uma córnea intacta obtida pelo protótipo (~60%) está de acordo com a literatura atual, que sugerem valores entre 60% e 70% de transmitância na região UV de 315-400nm (KOLOZSVÁRI et al., 2002; WOLLENSAK et al., 2003a).

4.2.4 Ensaio de Córneas com remoção do tecido

A remoção dos tecidos foi realizada com o propósito de se identificar e se comparar a importância das três camadas mais significativas da córnea (epitélio, estroma e endotélio) na proteção natural contra radiação ultravioleta. Foram analisadas 16 córneas em quatro estágios distintos, os resultados da transmitância em cada um dos estágios do protocolo e a contagem endotelial são apresentados na Tabela 11.

Os resultados deste ensaio apontam que para o pior caso, uma córnea com transmitância final de 87,9% de ultravioleta, representa um aumento de 25 pontos percentuais na transmitância (aumento de 40%) quando comparada com o estado inicial medido.

Tabela 11: Transmitância UV das córneas *in vitro* em cada etapa de remoção de tecido.

TRANSMITÂNCIA UV (%)						
Córnea	Contagem Endotelial (células/mm ²)	Espessura (μm)	Córnea Intacta	Epitélio Removido	Endotélio Removido	Lamela Removida (150μm ±50μm)
1	2967	558	68,9	69,7	71,0	86,7
2	3085	644	61,2	66,7	69,8	79,4
3	3068	632	62,1	67,3	69,4	81,1
4	3285	673	60,9	70,0	72,0	77,5
5	2406	653	62,9	71,7	73,7	79,1
6	2590	701	60,3	73,4	75,5	78,2
7	3102	768	51,7	63,6	65,7	74,8
8	2517	770	52,8	60,3	62,2	73,8
9	2696	690	63,1	71,7	74,0	82,9
10	2527	675	62,2	66,2	69,3	76,5
11	2632	669	63,4	69,2	71,2	74,8
12	2287	663	64,2	71,1	73,0	80,6
13	2306	711	62,5	69,8	71,9	87,9
14	2767	714	58,0	62,1	64,1	69,5
15	2622	587	67,9	72,1	74,3	80,4
16	2746	650	61,4	71,3	73,4	78,7
Média	2725,2	672,4	61,5	68,5	70,7	78,9
DP	300,4	55,9	4,5	3,8	3,8	4,6
Min	2287,0	558,0	51,7	60,3	62,2	69,5
Max	3285,0	770,0	68,9	73,4	75,5	87,9

Para a uma melhor visualização dos resultados da progressão da transmitância com a remoção do tecido, tem-se o gráfico na Figura 91, onde se pode observar o aumento gradual da transmitância UV em cada um dos estágios pelo qual as córneas foram submetidas.

Figura 91: Gráfico de diminuição da proteção UV com remoção de tecido.

Pelo gráfico da Figura 91 observa-se a influência proporcional de cada camada na quantidade de UV absorvida, com os resultados indicando a insignificante influência do endotélio, com uma diminuição média de 2,2 pontos percentuais (diminuição de 3%), sem relevância estatística significativa ($P=0,0788$). Provavelmente justificado por esta camada apresentar a menor espessura ($\sim 10\mu\text{m}$) entre todas analisadas.

Já o epitélio, camada capaz de se regenerar em alguns dias e rica em DNA, (CEJKA et al., 2007; RINGVOLD, 1983, 1997; ROGERS et al., 2004) o que indica alta absorção de UV, apresentou uma queda de proteção mais significativa, com um aumento médio na transmissão de 7 pontos percentuais (aumento de 12%), com relevância estatística significativa ($P<0,05$). Esta camada apresenta uma espessura de $50\mu\text{m}$ (SNELL; LEMP, 1998).

Por fim, pode-se notar que com a remoção do estroma foi causada uma alta diminuição da proteção UV, identificando possivelmente a mais importante camada na tarefa de absorção. Foi observado um aumento na transmitância média acima de 8,2 pontos percentuais (aumento de 12%), com a remoção de aproximadamente 150 μ m, apresentando relevância estatística significativa ($P < 0,05$).

Neste ensaio também foi realizado a análise de correlação com as medidas de transmitância em todas as etapas do protocolo (com 16 medidas em cada um dos 4 estágios, totalizando 64 medidas), entre o Protótipo 3B desenvolvido e o espectrofotômetro *HR4000CG* da *Ocean Optics*, apresentados na Figura 92. O coeficiente de correlação obtido foi $r^2 = 0,9906$, mesmo com a degradação do tecido corneano, após as etapas de remoção epitelial e corte lamelar.

Figura 92: Diagrama de Correlação com remoção do tecido - Protótipo 3B x *Ocean Optics*.

Neste ensaio foi observado no gráfico da diferença, Figura 93, um viés de 1,61% em relação ao valor ideal. Já os limites de concordância obtidos para 95% de confiança foram de 0,13 - 3,09%.

Figura 93: Diagrama da diferença com remoção de tecido – Protótipo 3B x *Ocean Optics*.

Os gráficos das Figuras de 92 a 93 mais uma vez confirmam medidas maiores de transmitância com o Protótipo 3B, e a alta correlação entre os métodos ($r^2 = 0,9906$), erro sistemático de +1,6% e viés aleatório um pouco maior, mas ainda assim tolerável, em torno de 1,5%.

4.2.5 Ensaio de Córneas simulando a cirurgia foto-refrativa

Neste procedimento, foi feita a simulação da cirurgia de correção de ametropias oculares, os resultados com a transmitância UV medida pelo protótipo em sete córneas humanas *in vitro*, bem como a contagem endotelial, são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Transmitância UV das córneas em cada estágio – Remoção Epitélio e Estroma.

TRANSMISTÂNCIA UV (%)				
Córnea	Córnea Intacta	Epitélio Removido	Lamela Removida	Contagem Endotelial (células/mm²)
1	69,0	69,9	85,8	3002
2	62,2	67,7	78,3	3154
3	62,1	66,3	80,2	3324
4	61,9	70,0	76,3	2874
5	68,8	71,9	80,4	2720
6	61,2	72,3	78,5	2756
7	66,5	70,8	80,3	2579
Média	64,5	69,8	80,0	2915,6
DP	3,5	2,2	3,0	261,4
Min	61,2	66,3	76,3	2579,0
Max	69,0	72,3	85,8	3324,0

Pelo gráfico da Figura 94 visualiza-se melhor os resultados da progressão da transmitância em cada etapa, apontando a influência da remoção do epitélio e do estroma, que geram uma diminuição da proteção UV natural.

Figura 94: Gráfico de aumento da transmitância UV – Remoção do Epitélio e Estroma.

Ficou evidente pela Tabela 12 a influência em certa quantidade de absorbância UV que cada camada é responsável, como sugerida no ensaio anterior. Nossas análises demonstram uma queda estatisticamente significativa ($P < 0,05$), com média de 5,3 pontos percentuais (queda de 8%) com a remoção do epitélio, já esperada pela grande quantidade de DNA contida nesta camada (CEJKA et al., 2007; RINGVOLD, 1983, 1997; ROGERS et al., 2004).

Na remoção do estroma pelo corte lamelar de aproximadamente $150\mu\text{m}$ de espessura, foi notado um aumento maior ainda da transmitância UV, apresentando também um valor estatisticamente significativo ($P < 0,05$), com 10,1 pontos percentuais adicionais (aumento de 15%).

Por fim, foi realizado mais uma análise de correlação utilizando as medidas de transmitância das córneas nas três etapas do procedimento. O diagrama de correlação apresentado na Figura 95, entre o nosso protótipo e o espectrofotômetro da *Ocean Optics*, apresentou um coeficiente de correlação $r^2 = 0,9962$, evidenciando mais uma vez a forte correlação entre os sistemas.

Figura 95: Diagrama de Correlação da córnea com remoção do Epitélio e do Estroma. Protótipo 3B x *Ocean Optics*.

Mais uma vez foi gerado o gráfico da diferença entre os dois sistemas de medida. O gráfico da Figura 96 apresenta um viés de 1,3%, com limites para 95% de concordância entre 0.4 – 2.2%.

Figura 96: Diagrama da diferença das córneas com Remoção do Epitélio e Estroma – Protótipo 3B x *Ocean Optics*.

Novamente tem-se os gráficos de correlação e da diferença, Figuras 95 e 96 respectivamente, confirmando o valor um pouco maior das medidas de transmitância com o Protótipo 3B, e a alta correlação entre os dois métodos de medida ($r^2 = 0,9962$), um erro sistemático de +1,3% e viés aleatório um pouco menor, em torno de 0,9%.

4.2.6 Ensaio de Paquimetria: Ultrassônica x Mecânica

A paquimetria é um dado importante para esta análise. Assim, realizou-se a paquimetria de duas maneiras para comparação de dois métodos de: paquímetro por ultrassom *Sonomed* e micrômetro mecânico, com sensor de toque e sistema de magnificação e câmera, por nós montados (LINCOLN; VENTURA; FARIA E SOUSA, 2011).

Na Figura 97, tem-se o gráfico das dez medidas realizadas em oito córneas *in vitro* realizadas por três usuários (Usuário A realizou as medidas de 1 a 3 \ Usuário B realizou as medidas de 4 a 6 \ Usuário C realizou as medidas de 7 a 10) com o paquímetro por ultrassom *Sonomed*, de modo cego, ou seja, quando A realizava a medida não olhava o resultado, B o anotava e C era o próximo a realizar as medidas que seriam anotadas por sua vez, por A.

Figura 97: Gráfico de medidas de espessura por ultrassom realizada por 3 usuários distintos.

O gráfico da Figura 98 ilustra os resultados da medida de espessura das mesmas oito córneas *in vitro* realizadas novamente por três usuários, com cinco medidas por usuário (Usuário A realizou as medidas de 1 a 5 \ Usuário B realizou as medidas de 6 a 10 \ Usuário C realizou as medidas de 11 a 15) com o micrômetro mecânico.

Figura 98: Gráfico de medidas de espessura com micrômetro.

Pela análise estatística dos dados pode-se notar que a média de desvio padrão de cada um dos instrumentos é relativamente a mesma, ou seja, em três córneas a média do desvio padrão do paquímetro ultrassônico foi melhor ($\sigma = 26,56 / 30,94 / 36,05$) e em outras três a média do desvio padrão do micrômetro foi melhor ($\sigma = 28,79 / 25,28 / 26,28$); para uma córnea a média do desvio padrão de ambos foi a mesma ($\sigma \approx 31$); e a última córnea foi descartada devido ao desgaste e perda da qualidade de tecido.

Deve-se ressaltar alguns aspectos de dificuldade no manuseio do sistema de medida ultrassônico (medida que é realizada na prática clínica), que envolve vários fatores que afetam a velocidade de apresentação dos dados: a pressão feita no tecido; a centralização, inclinação e o contato integral da sonda; a umidade do tecido e pela demora, em alguns casos, na resposta do aparelho. No Apêndice D são apresentados os resultados obtidos, com o desvio padrão de cada equipamento.

4.2.7 Ensaio de Fluorescência da córnea durante o Crosslinking

Uma outra parte da pesquisa envolve estudar a proteção ultravioleta natural da córnea no processo de crosslinking do colágeno corneano. Um aspecto interessante estudado foi a fluorescência da córnea durante o procedimento. Neste estudo o intuito foi de verificar se conforme as novas ligações de colágeno eram formadas, alguma alteração no espectro de fluorescência poderia ser observada, tendo assim a possibilidade de fazer um estudo em tempo real e relacionar o perfil do gráfico da fluorescência em função do aumento da rigidez corneana.

Neste estudo os quatro olhos que foram submetidos ao procedimento do *crosslinking*, apresentaram os espectros de fluorescência apresentados a seguir.

Na Figura 99 observa-se a mira do sistema de tratamento do *crosslinking*, que é refletida pela córnea e foi usada como base, assim em todos os espectros obtidos posteriormente o pico em 635nm deverá ser ignorado.

Figura 99: Gráfico de reflexão da mira do equipamento do *crosslinking* – pico em 635nm.

O espectro de fluorescência da Figura 100, foi obtido pela excitação dos olhos pela fonte de luz do *crosslinking*. Pode-se observar a existência de picos de fluorescência em 452nm e 486nm, que concorda com a literatura. (ROVATI; DOCCHIO, 2004).

Figura 100: Espectro de fluorescência do olho humano, com excitação em 365nm. Picos de fluorescência em 452nm e 486nm.

Como último espectro base, foi utilizada a Riboflavina 0,1%, que faz parte do procedimento e apresentou um espectro de fluorescência com pico de emissão em 535nm, como apresentando na Figura 101. Além disso, é sabido que a Riboflavina apresenta picos de absorção em 370nm e 440nm.

Figura 101: Espectro de fluorescência da Riboflavina. Pico de emissão em 535nm.

Assim, já durante a primeira fase do tratamento, foram obtidos os espectros apresentados na Figura 102, correspondentes ao período de instilação de riboflavina a cada 5 minutos por 30 minutos, onde é possível observar o aumento da fluorescência da Riboflavina com pico em 535nm e a diminuição dos picos de

fluorescência do olho em 452nm e 486nm. Justificados pelos picos de absorção da Riboflavina , em 440nm, que é muito próximo aos picos de emissão da fluorescência do olho (ROVATI; DOCCHIO, 2004).

Figura 102: Espectro de fluorescência Olho+Riboflavina no período de 5 a 30 minutos.

Já durante o tratamento contínuo, com 30 minutos de emissão de UV, pode-se observar uma relativa estabilidade do espectro de fluorescência do conjunto (olho+ Riboflavina +xlink). A Figura 103, apresenta os espectros de fluorescência, com picos de emissão estáveis do início ao fim da irradiação UV em 365nm (excitação).

Figura 103: Espectro de fluorescência Olho+Riboflavina+Xlink no período de 5 a 30 minutos.

Por fim, nos espectros de fluorescência apresentados na Figura 104, tem-se uma composição de todas as fases do tratamento juntas, permitindo uma visualização contínua do tratamento, desde o olho desepitelizado, passando pela instilação de Riboflavina e finalizando com o *crosslinking*.

Pode-se observar que em cada estágio do tratamento os picos de emissão do olho são suprimidos, enquanto o pico da Riboflavina vai aumentando gradativamente até uma estabilização durante o *crosslinking*.

Figura 104: Espectro de fluorescência Olho, Riboflavina a 5 e 30 minutos, e Xlink.

Pelos espectros de fluorescência foi possível visualizar o acúmulo de Riboflavina durante o estágio de instilação por 30 minutos, e durante o tratamento, com o *crosslinking* pode-se observar uma estabilidade da fluorescência. Porém a fluorescência do colágeno da córnea não pode ser identificada uma vez que a Riboflavina possui um pico de absorção na mesma faixa espectral, mascarando a banda. Abaixando à temperatura criogênica a amostra, talvez fosse possível identificar as bandas, porém, a córnea não resistiria à temperatura de Nitrogênio líquido e perderia suas características.

Após o final do tratamento e de todas as medidas, a córnea foi retirada do olho para inspeção visual do tecido, e na Figura 105 pode se observar os traços de Riboflavina e do enrijecimento do tecido.

Figura 105: Córnea retirada do olho enucleado após o *crosslinking*.

4.2.8 Ensaio de análise de absorbância da córnea no *crosslinking*

Um dos objetivos do projeto do doutorado foi a observação da estabilidade da proteção natural do ultravioleta pela córnea pós-procedimento do *crosslinking* do colágeno corneano.

Neste trabalho em cada uma das dez córneas utilizadas foram obtidos quatro espectros de absorbância na região de 280-800nm, um em cada estágio do tratamento (Inicial, pós-Riboflavina, pós-*crosslinking*, pós-lavagem) totalizando assim 10 espectros por estágio e 40 no total.

Conforme os estudos encontrados na literatura (AHMAD; FASIHULLAH; VAID, 2006) a Riboflavina apresenta dois picos máximos de absorção luminosa. Um no ultravioleta em 365nm, e outro no espectro azul entre 435nm e 450nm, como apresentados na Figura 106.

Figura 106: Picos de absorção da Riboflavina em solução tampão-fosfato 0,05M. Adaptado de AHMAD; FASIHULLAH; VAID, 2006.

No estágio inicial, a córnea foi desepitelizada e o espectro de absorbância na região de 280-800nm foi obtido, conforme mostrado na Figura 107. Este espectro de absorbância serviu como referência, apresentando os picos de absorbância da córnea na região UV – Visível.

Figura 107: Estágio Inicial – córnea desepitelizada Espectro de absorbância 280-800nm.

Após a segunda etapa do tratamento, instilação de Riboflavina por 30 minutos, obteve-se um novo espectro de absorbância, Figura 108. Pode-se observar o

surgimento de dois novos picos de absorção, em 370nm e 440nm, correspondentes à Riboflavina contida na córnea.

Figura 108: Pós-riboflavina – Espectro de absorbância 280-800nm

O espectro obtido após a finalização do tratamento – Figura 109, com a emissão de UV (365nm) por 30 minutos, apresentou os mesmos picos de absorção do procedimento anterior, com uma pequena acentuação no ângulo de subida.

Figura 109: Pós-procedimento de *crosslinking* – Espectro de absorbância 280-800nm

Já o espectro de absorbância da Figura 110 pós-lavagem com soro fisiológico 0,9%, para remoção do excesso de Riboflavina acumulado durante o tratamento, apresentou uma regressão dos picos de absorbância da Riboflavina.

Figura 110: Pós-lavagem com soro fisiológico 0,9% – Espectro de absorbância da córnea pós-*crosslinking* no intervalo 280-800nm

A Figura 111 apresenta os espectros de absorbância em todas as etapas do tratamento, e a Figura 112 tem-se em destaque a região que apresentou alteração na banda espectral. Nas Figuras 111 e 112 pode-se observar a alteração do espectro de absorbância durante o tratamento, e por fim a normalização do espectro final quando comparado com o inicial.

Assim, os resultados das análises dos espectros de absorbância indicam que não foram observadas diferenças significativas no perfil da banda ou deslocamento de banda no espectro de absorbância da córnea pré e pós procedimento de *crosslinking*.

Figura 111: Comparação entre os espectros de absorvância em cada estágio.

Figura 112: Destaque da faixa de interesse (280-600nm) dos espectros de absorvância.

4.2.9 Ensaio de Transmitância UV da córnea durante o *crosslinking*

Neste experimento a transmitância UV da córnea foi monitorada durante todo o procedimento do *crosslinking*. Foram obtidos espectros de transmitância da córnea no estado inicial e a cada 5 minutos, totalizando 6 medidas durante a instilação da Riboflavina e outras 6 medidas durante a emissão contínua de UV, com instilação de Riboflavina a cada 5 minutos continuada, e mais espectro de base. Os 14 espectros são apresentados na Figura 113, onde pode-se observar a diminuição da transmissão do UVA através da córnea durante o tratamento.

Figura 113: Espectro de Transmitância UVA da córnea durante o procedimento clínico de *crosslinking* do colágeno corneano.

Ao todo vinte e nove córneas foram submetidas ao procedimento descrito em diferentes configurações. Foram confeccionados 4 suportes diferentes ao longo do projeto para estes ensaios. O primeiro, a sonda estava à 50mm do endotélio; o segundo a sonda encontrava-se a 100mm do endotélio; no terceiro, a sonda situava-se à 17,8mm do endotélio; e no quarto e ultimo suporte a fibra foi posicionada à 0,3mm do endotélio. Os suportes foram sendo aprimorados, e observou-se que as medidas alteravam-se em valores absolutos, obviamente,

devido, entre outros fatores, principalmente à curvatura da córnea, concentrando o número de fótons por unidade de área na sonda, quanto mais próximo ao ponto focal da córnea. Assim, para a análise final dos dados, apenas as córneas analisadas com a sonda imediatamente após o endotélio (quarto suporte) serão consideradas nesta sessão. Assim os valores percentuais médios de transmitância UV das 10 córneas analisadas no suporte final em cada um dos estágios do tratamento são mostrados na Tabela 13.

Todas as etapas de medida apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni (HOCHBERG, 1988; RIFFENBURGH, 2005; SIMES, 1986). O Apêndice E traz uma breve explicação de cada um dos métodos de análise estatística das córneas utilizadas neste trabalho, bem como a análise estatística do protótipo desenvolvido, utilizando o método de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1983, 1986, 1995, 1999; HIRAKATA et al., 2009).

Tabela 13: Valores de transmitância das 10 córneas no suporte final durante o *crosslinking*. R indica instilação de Riboflavina e o número seguinte o tempo de estágio do tratamento em minutos; X indica a irradiação UVA adicionada de instilação de Riboflavina e o número seguinte o tempo de estágio do tratamento em minutos.

Córnea	Base	R5	R10	R15	R20	R25	R30	X5	X10	X15	X20	X25	X30
1	66,9	49,0	39,1	33,5	29,1	25,9	23,5	20,3	18,0	16,5	15,3	14,3	13,7
2	58,1	40,2	34,0	30,0	26,8	25,4	22,9	20,1	17,9	16,4	15,1	14,1	13,0
3	60,2	45,6	35,5	29,8	26,1	23,0	20,7	18,2	16,1	14,5	13,2	12,4	11,3
4	64,4	43,3	30,7	29,8	23,6	19,2	16,8	15,6	12,3	12,4	11,7	11,1	10,4
5	69,7	49,8	30,0	25,5	21,0	17,8	15,2	14,6	13,7	12,6	12,5	11,5	10,5
6	53,9	39,5	31,2	28,5	26,8	23,3	20,9	18,4	16,2	15,7	14,0	12,3	12,1
7	64,9	48,0	32,9	28,4	26,9	24,1	22,7	20,7	16,8	15,2	13,6	12,4	11,8
8	69,6	49,3	34,8	31,9	28,8	26,7	25,1	22,8	18,3	16,3	15,6	14,4	13,3
9	66,5	46,9	35,3	30,9	28,2	25,3	23,3	21,1	20,5	18,2	16,3	15,7	14,6
10	66,5	41,5	30,2	28,1	24,3	21,6	19,9	16,8	14,6	13,4	12,9	11,7	11,1

Os valores médios das 10 córneas testadas, assim como o desvio padrão de cada etapa do tratamento e o limite inferior e superior de 95% de confiança, são apresentados na Tabela 14. Pode-se observar que a média da córnea no estado inicial sem epitélio (64,1%), corresponde ao valor encontrado na literatura de 60% a 70% (CULLEN, 2009; KINSEY, 1948; KOLOZSVÁRI et al., 2002; TSUBAI; MATSUO, 2002; WOLLENSAK et al., 2003a; ZIGMAN, 1993), e que o desvio padrão máximo entre todas as médias foi de 5,1.

Tabela 14: Valores de transmitância média, desvio padrão e limite de confiança superior e inferior. R indica instilação de Riboflavina e o número seguinte o tempo de estágio do tratamento em minutos; X indica a irradiação UVA adicionada de instilação de Riboflavina e o número seguinte o tempo de estágio do tratamento em minutos.

	Base	R5	R10	R15	R20	R25	R30	X5	X10	X15	X20	X25	X30
Média	64,1	45,3	33,4	29,6	26,1	23,2	21,1	18,9	16,4	15,1	14,0	13,0	12,2
DP	5,1	3,9	2,9	2,2	2,5	2,9	3,1	2,6	2,4	1,9	1,5	1,5	1,4
95% Inf	62,1	43,8	32,2	28,8	25,2	22,1	19,9	17,8	15,5	14,4	13,4	12,4	11,6
95% Sup	66,1	46,9	34,5	30,5	27,1	24,4	22,3	19,9	17,4	15,9	14,6	13,6	12,7

Para uma melhor visualização dos dados, o gráfico da Figura 114 ilustra a curva de diminuição da transmitância UVA ao longo dos 60 minutos do tratamento, mostrando uma curva característica de aumento de proteção UVA do início ao final do tratamento.

Figura 114: Espectro de Transmitância UV da córnea em cada estágio do *crosslinking*.

Duas transições muito importantes estão marcadas na Figura 114. A primeira é marcada como Riboflavina, mostrando a queda acentuada de em média 18,8 pontos percentuais (queda de 29,2%) após os 5 primeiros minutos de instilação de Riboflavina. E a segunda é marcada pelo início da emissão de luz UVA, na qual observa-se que a transmitância da córnea no momento de início da irradiação UVA é de 21,1%, bastante diferente do indicado na literatura (SPÖRL et al., 2000; WOLLENSAK et al., 2004a), que é de apenas 5% para medidas realizadas em coelhos e transferidas para o olho humano.

Pode-se observar também que ao final da instilação total de Riboflavina, a porcentagem média de transmitância UVA foi de 12,2%, confirmando os estudos recentes descritos na literatura (KOPPEN; GOBIN; TASSIGNON, 2010).

Assim, ao final da irradiação, tem-se na Figura 115 a córnea pós o tratamento do *crosslinking*, com o tecido corneano com uma cor amarelada caracterizada pela Riboflavina, e aparentemente com uma rigidez muito maior do que a apresentada no estado inicial.

Figura 115: Córnea humana *in vitro* pós procedimento de *crosslinking* de colágeno

4.2.10 Ensaio de Transmitância UV com desidratação da córnea

Para o ensaio de desidratação das córneas *in vitro* durante os 60 minutos do tratamento do *crosslinking*, tem-se na Tabela 15 as medidas de transmitância por período de tempo da desidratação, que foram obtidas da divisão dos espectros em cada etapa do estudo pelo espectro de linha de base. São apresentados também os valores médios de transmitância UV, calculados pela média na região de interesse 360-370nm.

Tabela 15: Valores de transmitância UV média por período de tempo, " D" indica porcentagem de transmissão de UVA durante a desidratação e o número seguinte o tempo decorrido para a medida em minutos.

Córnea	Transmitância UV 360-370nm (%) x Tempo de Desidratação (min)												
	D0	D5	D10	D15	D20	D25	D30	D35	D40	D45	D50	D55	D60
1	73,3	73,7	74,5	74,8	74,7	74,9	74,6	74,5	74,3	74,4	74,4	73,1	71,6
2	75,9	75,4	76,1	76,5	76,2	76,5	76,7	77,0	75,3	75,3	75,2	73,9	73,1
3	71,3	71,8	72,0	72,6	72,0	72,4	71,8	71,9	70,2	68,6	67,3	65,8	65,0
4	72,4	73,1	72,8	72,8	72,7	72,9	72,4	72,1	71,6	70,6	70,5	69,4	68,9
Média	73,2	73,5	73,8	74,1	73,9	74,2	73,9	73,9	72,8	72,2	71,9	70,6	69,7
DP	2,0	1,5	1,8	1,8	1,9	1,9	2,2	2,4	2,4	3,2	3,7	3,7	3,5
Variação	-	0,3	0,6	0,9	0,7	1,0	0,7	0,7	-0,4	-1,0	-1,3	-2,6	-3,5

A média de transmitância UVA das córneas *in vitro* em estágio inicial, ou seja, assim que retirada da geladeira e atingida a temperatura ambiente, foi de 73,2 $\pm$ 2%. Durante o estudo da desidratação, por um período de 60 minutos, foram realizadas medidas a cada 5 minutos. Uma variação muito pequena foi observada, com média de 0,2% na transmitância nos primeiros 50 minutos, e sem alteração estatística significativa ($P=0,11837$).

Nos 10 minutos finais foi possível observar uma leve diminuição da transmitância, com uma variação média de 3,1%, como demonstrada no gráfico da Figura 116, apresentando uma alteração estatística significativa ($P=0,04027$). Pelo teste *post hoc* de Bonferroni (HOCHBERG, 1988; RIFFENBURGH, 2005; SIMES, 1986), foi observada que apenas os contrastes entre os períodos de tempo 0-35min com 55min, e 0-45min com 60min se mostraram estatisticamente significativos ($P<0,05$).

Figura 116: Gráfico de transmitância média UV ao longo dos 60 minutos de desidratação corneana.

A alteração nos 10 minutos finais foi causada pelo enrugamento da córnea, detalhado na Figura 117, que ocasionou um desvio no feixe de luz que passa pelo tecido. Ao final do processo, passados os 60 minutos, a transmitância média foi de $69,7 \pm 3,5\%$ e a paquimetria $421,5 \pm 26,3 \mu\text{m}$.

Figura 117: Detalhe da córnea desidratada apresentando enrugamento após os 60 minutos.

Para o cálculo teórico da variação da transmitância UVA na diminuição da espessura da córnea pela desidratação Equação 19, considerando-se a espessura média ($d = 121 \mu\text{m}$) devido à perda de água na córnea durante o processo de desidratação; o coeficiente de absorção da água $\mu_{a_H2O} = 0,00656 \text{ m}^{-1}$ para 365nm; e o coeficiente de espalhamento $\mu_{s_H2O} = 0,00629 \text{ m}^{-1}$ (MOREL et al., 2007; SOGANDARES; FRY, 1997), obtendo uma variação da ordem de 0,0001%.

$$I(365,121) = I_0(365).e^{-121.(0,0056+0,0089)} = I_0(365).0,9999 \quad (19)$$

5 CONCLUSÃO

As conclusões de cada etapa do estudo são descritas nos próximos itens, bem como a conclusão geral do trabalho, apontando os objetivos alcançados no desenvolvimento dos estudos descritos nos capítulos anteriores.

5.1 Protótipo UV

O protótipo de medida de transmitância UV, na região de 300-400nm, apresentou-se um protótipo eficiente tanto na utilização no banco de olhos no teste de córneas *in vitro*, bem como uma ferramenta auxiliar no estudo da proteção UV natural das córneas doadas. O protótipo tornou-se um sistema de simples utilização para o clínico, com uma curva de aprendizagem de poucos minutos. O sistema oferece uma tolerância na medida de 0,25%, o que está de acordo com a precisão requerida neste tipo de medições, que é de 0,5% (KOLOZSVÁRI et al., 2002).

Nos experimentos com amostras conhecidas e rígidas, como as de lâminas de acrílico, o protótipo UV mostrou um bom fator de correlação ($r^2 = 0,9997$) com o espectrofotômetro *Cary 17*.

Nos ensaios em de córneas *in vitro*, onde a curvatura e espessuras não são constantes ao longo da amostra, os resultados tiveram correlação de $r^2 = 0,9898$ com o espectrofotômetro *HR4000CG-UV-NIR* da *Ocean Optics*. É fato que apenas a região estritamente central foi medida, para que estas alterações não interferissem nos resultados devido ao mal posicionamento das amostras.

Nos ensaios com remoção de tecido, o fator de correlação foi de $r^2 = 0,9906$, mesmo com a degradação do tecido. No ensaio de simulação de cirurgia foto-refrativa, o fator de correlação foi de $r^2 = 0,9962$. Vale a pena mencionar que, com a remoção das lamelas, o tecido fica mais fino e difícil de trabalhar, atrapalhando a centralização no sistema e exigindo uma manipulação mais cuidadosa a fim de se evitar dobras do tecido corneano.

O protótipo UV foi também analisado utilizando o método de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1983, 1986, 1995, 1999; HIRAKATA et al., 2009), o qual apresentou medidas correlacionadas e concordantes com viés clinicamente aceitável. Isso leva a entender que o viés pequeno em cada um dos ensaios e com valor médio de 1,5%, do ponto de vista clínico-experimental, é insignificante dado a instabilidade das medidas ao longo do tempo com a degradação das córneas. Assim, é possível concluir que as medidas realizadas pelo protótipo quando comparado com os espectrofotômetros apresentaram resultados de transmitância com variações clínicas aceitáveis, viés baixo e com alto índice de correlação (LINCOLN; VENTURA; FARIA E SOUSA, 2010a, 2010b; VENTURA; LINCOLN et al., 2011).

Os dados coletados mostram que, conforme as lamelas são removidas, a proteção natural da córnea diminui. Ficou evidente pelos resultados apresentados que cada camada da córnea influencia em certa quantidade de absorbância UV, como esperado. Nossos resultados demonstram a influência modesta e sem relevância estatística ($P > 0,05$) da camada de endotélio - média de 2,2 pontos percentuais ($\sim 10\mu\text{m}$ de espessura) para estas medidas, uma vez que o endotélio é preservado durante a cirurgia foto-refrativo *in vivo*; uma queda relevante com significância estatística ($P < 0,05$) - média de 5,3 a 7 pontos percentuais, com a remoção do epitélio ($\sim 50\mu\text{m}$ de espessura); e uma forte diminuição, com significância estatística ($P < 0,05$), na absorbância UV da córnea quando o estroma é removido ($\sim 150\mu\text{m}$ de espessura) - média de 8,2 a 10,1 pontos percentuais.

O sistema tem apresentado um bom desempenho como protótipo portátil e de fácil utilização para os médicos e profissionais de Banco de Olhos. Sua flutuação de 0,25% em transmitância fornece resultados confiáveis. O tempo para a estabilização do sistema também é bem adequado para o uso laboratorial (10s) e as peças que estão em contato direto com as córneas são todas produzidas em metal e em condições de serem removidas e esterilizadas.

As 44 córneas humanas testadas demonstraram que, conforme a camada do estroma é reduzida, há uma perda significativa da proteção UV natural da córnea. A degradação relativa da proteção UV natural das córneas apresentou relação direta com a realização da ablação pela cirurgia foto-refrativa (PRK), estabelecendo uma correspondência de perda da proteção UV em função da redução do estroma.

5.2 Procedimento de *Crosslinking* do colágeno corneano

No estudo direcionado ao procedimento do *crosslinking*, diferentes ensaios foram planejados e executados, a fim de verificar os seguintes aspectos técnicos: segurança dos protocolos atuais do tratamento; segurança da exposição ao longo período de irradiação UV; eficácia do procedimento.

O primeiro estudo desenvolvido teve como objetivo o acompanhamento da fluorescência da córnea durante o tratamento do *crosslinking*, a fim de se identificar parâmetros de alteração na estrutura da córnea e possibilitar a personalização deste procedimento caso a caso. Porém, durante o tratamento, foram observados picos de fluorescência da córnea em 440nm e 450nm, na mesma região dos picos de absorção da Riboflavina em 440nm (AHMAD; FASIHULLAH; VAID, 2006), , impossibilitando assim, o acompanhamento da alteração da fluorescência da córnea, e inviabilizando a personalização do procedimento e o acompanhamento da formação das ligações de colágeno.

No segundo estudo, tem-se a análise da absorbância da córnea *in vitro* durante o *crosslinking*, na tentativa de se identificar alterações no perfil da banda de absorção do tecido corneano, como o surgimento, ou deslocamento e a permanência de novos picos e vales. Foram observadas alterações dos espectros de absorbância da córnea, com o aparecimento de picos de absorção em 370nm e 440nm, atribuídos aos picos de absorção da Riboflavina que é instilada a cada 5 minutos durante os 60 minutos de tratamento. Porém, após os 30 minutos de irradiação de luz ultravioleta com pico em 365nm, não foi observado nenhuma outra alteração no espectro de absorbância, e por fim, no espectro final de absorbância das córneas *in vitro* submetidas ao *crosslinking*, após a lavagem da córnea em soro fisiológico 0,9%, para eliminação da Riboflavina, foi observado o perfil dos espectros originais, com o desaparecimento dos picos da Riboflavina, indicando que neste ensaio não foram observadas alterações permanentes na estrutura do espectro de absorbância. Isto levou ao descarte deste tipo de abordagem para observar clinicamente, em tempo real a formação do *crosslinking* do tecido corneano.

O terceiro estudo, referente à transmitância UV da córnea durante o *crosslinking*, teve como principal objetivo caracterizar a transmitância da córnea em três estágios importantes: no pré-tratamento, durante a instilação de Riboflavina;

durante o tratamento; e ao final do tratamento, para futuras análises dos limites citotóxicos em função da quantidade de radiação UV que atinge o endotélio durante os 30 minutos de irradiação. Este ensaio apresentou dados divergentes dos encontrados na literatura que é de 5% de transmitância UV (SPÖRL et al., 2000; WOLLENSAK et al., 2004a). Nossos estudos apontam que a transmitância é em média de 21% no início da irradiação UVA, após os 30 minutos de instilação de Riboflavina. Durante a irradiação de UV a transmitância varia de 21% (Início da irradiação) até 12,2% (término da irradiação) (VENTURA; LINCOLN; MELLO; FARIA E SOUSA, 2012). Estes dados indicam que o limite citotóxico do endotélio de $0,360\text{mW/cm}^2$, atualmente concebido mundialmente, e que foi calculado utilizando modelos em animais (WOLLENSAK et al., 2005, 2008), pode não ser diretamente correspondente ao limite citotóxico do endotélio da córnea humana, uma vez que não há relatos na literatura de pacientes que tiveram o endotélio corneano danificado em função do tratamento. Este é um dado importante que por apresentar uma dose mais alta de radiação recebida pelo endotélio, sem o danificá-lo, permite pensar-se no desenvolvimento de um tratamento mais rápido, com potências maiores.

O quarto estudo, referente à desidratação da córnea *in vitro* fora do meio de preservação, indicou que as paquimetrias obtidas pré e pós procedimento apresentaram uma diferença média de $120,8\mu\text{m}$. Essa variação na espessura correspondeu à perda de água, que por sua vez apresenta um coeficiente de absorção relativamente baixo na região UV de 360-370nm, indicando uma possível razão para a não variação significativa da transmitância UVA. No período final do procedimento foi observada uma diminuição na transmitância, muito provavelmente relacionada com o enrugamento do tecido, que pode causar um desvio no feixe de medição. Assim, pode-se supor que a transmitância UVA de córneas *in vitro* na região do tratamento do *crosslinking* (360-370nm) é invariante no período de 60 minutos (LINCOLN et al., 2012), mesmo com a diminuição da espessura, uma vez que o estroma corneano que é o material que absorve a maior parte nesta região de emissão UV permanece intacto, ocorrendo apenas perda de líquido (principalmente água), que apresenta um coeficiente de absorção $\mu_{a_{H_2O}} = 0,00656\text{m}^{-1}$, muito menor em relação ao coeficiente de absorção do estroma corneano $\mu_{a_{es}} = 2500\text{m}^{-1}$, (KOLOZSVÁRI et al., 2002), com diferença da ordem de 10^{-6} . Assim o estudo do *crosslinking* utilizando modelos com córneas *in vitro* apresenta um elevado grau de

confiabilidade, pelo menos quanto à estabilidade da transmitância UV na região de aplicação do tratamento (365nm) durante os 60 minutos do tratamento mesmo com a desidratação do tecido corneano.

5.3 Conclusão Geral

O presente trabalho abordou dois procedimentos de grande importância no cenário oftalmológico, a cirurgia foto-refrativa e o *crosslinking* de colágeno corneano, e apresentou também um protótipo de medida UV para córneas *in vitro*.

Este trabalho apresentou resultados essenciais para um maior entendimento destes procedimentos, evidenciando a importância de cada camada da córnea na proteção do olho contra a radiação UV.

No estudo do protótipo UV, foi possível identificar e caracterizar a transmitância UV de córneas e a proteção natural que elas oferecem a esta radiação.

A simulação da cirurgia refrativa indicou que a remoção do estroma pode diminuir a proteção natural da córnea significativamente, e a aplicação do *crosslinking* em córneas que já passaram pelo procedimento da refrativa devem ter um cuidado maior, uma vez que sua proteção ao UV já foi alterada e não segue o modelo normal.

Nos estudos do *crosslinking* do colágeno corneano não foi possível a identificação de fatores de indicação da promoção do colágeno em tempo real, porém consegue-se acompanhar e caracterizar a transmitância da radiação incidente durante todo o tratamento, possibilitando o desenvolvimento de novos protocolos, com aperfeiçoamento e a otimização da potência e do tempo de tratamento.

Nossos estudos podem, num futuro, servir como base para construção de novos equipamentos, com maior eficácia clínica, e também para o auxílio, na área médica para determinação dos limites citotóxicos do endotélio corneano, para irradiações UVA.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho apresentou um protótipo de medida da transmitância UV, sendo uma ferramenta útil na análise da proteção UV de córneas e na implementação de novos estudos relacionados a transmitância UV. Neste trabalho foram também apresentadas novas ideias e a indicação da necessidade de revisão dos níveis citotóxicos para córneas humanas na região UVA

O estudo de transmitância UV da córnea durante o procedimento do *crosslinking* ainda pode ser explorado em diversos aspectos. Estudos recentes sugerem desde a alteração no tempo de instilação de riboflavina (WOLLENSAK et al; 2011), passando por alterações no protocolo do tratamento, com diferentes potências de tempos de tratamento (KOPPEN; GOBIN; TASSIGNON, 2010), até a mudança na forma de aplicação do tratamento, preservando o epitélio durante o tratamento (FILIPPELLO; STAGNI, 2010).

Assim, os seguintes estudos deverão ser realizados na continuação deste trabalho:

- O procedimento do *crosslinking* deverá ser realizado utilizando-se diferentes potências de emissão de UV e tempos de tratamento variados;
- Comparação do tratamento realizado com e sem epitélio;
- Estudo da transmitância UV na aplicação do *crosslinking* no Protocolo de Atenas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q.; VAID, FH. Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution. **J Photochem Photobiol B.**, v. 82, n. 1, p. 21-27, 2006.

AHRENS, C. D. **Essentials of Meteorology: an invitation to the atmosphere**. 3rd ed. London: Cengage Learning, 2000. 454 p.

BABU, V.; MISRA, R. B.; JOSHI, P. C. Ultraviolet-B effects on Ocular tissues. **Biochem. Biophys. Res. Comn.**, v. 210, p. 417-423, 1995.

BASHKATOV, A. N.; GENINA, E. A. KOCHUBEY, V. I.; TUCHIN, V. V. Optical Properties of Human Sclera in Spectral Range 370–2500nm. **Optics and Spectroscopy**, v. 109, n. 2, p. 197–204, 2010.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Measurement in Medicine: The analysis of method comparison studies. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 32, p. 307-317, 1983. (Series D -The Statistician).

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, v. 327, p. 307-310, 1986.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Comparing two methods of clinical measurement: a personal history. **Int J Epidemiol**, v. 24, n. 1, p. 7-14, 1995.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Measuring agreement in method comparison studies. **Statistical Methods in Medical Research**, v. 8, n. 2, p. 135-160, 1999.

BOETTNER, E. A.; WOLTER, J. R. Transmission of the Ocular Media. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 1, p. 776-783, 1962.

BRAINARD, G. C.; BEACHAM, S.; SANFORD, B. E.; HANIFIN, J. P.; STRELETZ, L.; SLINEY, D. Near ultraviolet radiation elicits visual evoked potentials in children, **Clinical Neurophysiology**, v. 110, p. 379-383, 1999.

CEJKA, C.; PLÁTENÍK, J.; GURYCA, V.; SIRC, J.; MICHÁLEK, J.; BRŮNOVÁ, B.; CEJKOVÁ, J. Light Absorption Properties of the Rabbit Cornea Repeatedly Irradiated with UVB Rays. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, p. 652–657, 2007.

CEJKOVÁ, J.; STÍPEK, S.; CRKOVSKÁ, J.; ARDAN, T.; PLÁTENÍK, J.; CEJKA, C.; MIDELFART, A. UV Rays, the prooxidant/antioxidant imbalance in the cornea and oxidative eye damage. **Physiol Res.**, v. 53, p. 1-10, 2004.

CHAN, C. C. K.; FRANZCO, M. S.; WACHLER, B. S. B. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. **J Cataract Refract Surg.**, v. 33, p. 75–80, 2007.

CHANG, A. W. et.al. Corneal tissue ablation depth and the Munnerlyn formula, **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 29, n. 6, p. 1204-1210, 2003.

CORRÊA, M. P. **Índice ultravioleta: avaliações e aplicações**. São Paulo, 2003. 247p. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Ciências Atmosféricas, Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Universidade de São Paulo.

CULLEN, A. P. Photobiology of the Cornea. Photobiological Sciences Online. ed. KC Smith. American Society for Photobiology, 2009. http://www.photobiology.info/**Cullen.html

DILLON, J. et al. Sunlight Exposure and Cataract. **Jama**, v. 281, n. 3, p. 229-230, 1999.

DOLIN, P. J. Ultraviolet radiation and cataract: a review of the epidemiological evidence. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 78, p. 478-482, 1994.

DONG, X.; AYALA, M.; LÖFGREN, S.; SÖDERBERG, P. G. Ultraviolet Radiation–Induced Cataract: Age and Maximum Acceptable Dose. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 3, 2003.

DOUGHTY, M. J.; CULLEN, A. P. Long-term effects of a single dose of ultraviolet-B on albino rabbit cornea-I. in vivo analyses. **Photochem Photobiol**, v. 49, p. 185–196, 1989.

FARRELL, R. A.; MCCALLY, R. L. Interaction of Light and the Cornea: Absorption vs. Wavelength. **Cornea**, v. 6, n. 2, p. 149, 1987.

FILIPPELLO, M.; STAGNI, E. Collagen crosslinking without corneal de-epithelialization. **Minerva Oftalmologica**, v. 52, 2010.

FORRESTER, J. V.; DICK, A. D.; MCMENAMIN, P. G.; LEE, W. R. **The eye: basic sciences in practice**, 2002.

FRIS, M.; TESSEM, MB.; CEJKOVÁ, J.; MIDELFART, A. The effect of single and repeated UVB radiation on rabbit cornea. **Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 244, p. 1680-1687, 2006.

GHATAK, A. **Optics**. Tata McGraw-Hill, 4th Ed., 2008.

GORDON, D. B. Spectroscopic Techniques. pp. 324-344 in **Principles and Techniques in Practical Biochemistry**. Wilson, K. & Walker, J. Eds., Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

GRAEME, J. G. **Photodiode Amplifiers: Op Amp Solutions**, New York: McGraw-Hill, 1995.

GROTTONE, G. et al, Alterações biomecânicas da córnea porcina com riboflavina fotossensibilizada por luz não-ultravioleta. **Revista Brasileira Oftalmologia**, v. 67, n. 3, p. 109-113, 2008.

HECHT, E.; ZAJAC, A. **Optics**. Addison-Wesley Publishing Co. 4th Ed., 2009.

HENRIKSSON, J. T.; BERGMANSON, J. P.; WALSH, J. E. Ultraviolet radiation transmittance of the mouse eye and its individual media components. **Experimental Eye Research**, v. 90, p. 382-387, 2010.

HIRAKATA, V. N.; CAMEY, A. S. Bland-Altman analysis of agreement between methods. **Rev HCPA**, v. 29, n. 3, p 261-268, 2009.

HOCHBERG, Y. A sharper Bonferroni's procedure for multiple tests of significance. **Biometrika**, v. 75, p. 800-803, 1988.

HOFFMAN, J. S. et.al. Cataracts and other eye disorders, in **Assessing the risks of trace gases that can modify the stratosphere**, vol. 2, Environmental Protection

Agency, Hoffman, J. S. ed., Washington DC.: Environmental Protection Agency, 1987. Chapter 10, 1987.

HOOVER, H. L. Solar ultraviolet irradiation of human cornea, lens, and retina: equations of ocular irradiation, *Appl. Opt.*, v. 25, p. 359-368, 1986.

KINSEY, V. E. Spectral transmission of the eye to ultraviolet radiations. **Arch Ophthalmol**, v. 39, p. 508-513, 1948.

KOLOZSVÁRI, L. et al. UV Absorbance of the Human Cornea in the 240- to 400-nm Range. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 7, p. 2165-2168, 2002.

KOHLHAAS, M. et.al. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. **J Cataract Refract Surg.**, v. 32, p. 279–283, 2006.

KOPPEN, C.; GOBIN, L.; TASSIGNON, M. The Absorption Characteristics of the Human Cornea in Ultraviolet-A Crosslinking. **Eye & Contact Lens**, v. 36, n. 2, 2010.

LEMBARES, A.; HU, X. H.; KALMUS, G. W. Absorption spectra of corneas in the far ultraviolet region. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 38, p. 1283-1287, 1997.

LINCOLN, V. A. C.; VENTURA, L.; FARIA E SOUSA, J. S. Ultraviolet analysis of donated corneas: a portable prototype. **Applied Optics**, v. 49, p. 4890-4897, 2010a. doi:10.1364/AO.49.004890.

LINCOLN, V. A. C.; VENTURA, L.; FARIA E SOUSA, J. S. Ultraviolet analysis on in vitro corneas following tissue removal. **Proc. SPIE 7550**, 755025, 2010b. <http://dx.doi.org/10.1117/12.840798>.

LINCOLN, V. A. C.; VENTURA, L.; FARIA E SOUSA, J. S. Critical evaluation of the ultrasonic pachymetry for "in vitro" corneas. **Proc. SPIE 7885**, 78851L, 2011. <http://dx.doi.org/10.1117/12.872885>.

LINCOLN, V. A. C.; VENTURA, L.; FARIA E SOUSA, J. S.; MELLO, M. M. Effect of dehydration in the UV transmittance of "in vitro" corneas. **Proc. SPIE 8209**, 82091J, 2012. <http://dx.doi.org/10.1117/12.906205>.

LÖFGREN, S.; MICHAEL, R.; SÖDERBERG, P. G. Impact of Age and Sex in Ultraviolet Radiation Cataract in the Rat. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 4, 2003.

MICHAEL, R., VRENSEN, G.F.J.M., VAN MARLE, J., GAN, L., SODERBERG, P.G. Apoptosis in the rat lens after in vivo threshold dose ultraviolet irradiation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 39, p. 2681-2687, 1998.

MOREL, A.; GENTILI, B.; CLAUSTRE, H.; BABIN, M.; BRICAUD, A.; RAS, J.; TIÈCHE, F. Optical Properties of the "Clearest" Natural Waters. **Limnology and Oceanography**, v. 52, n. 1, p. 217-229, 2007.

PATTON, W. P.; CHAKRAVARTHY, U.; DAVIES, R. J. H.; ARCHER, D. B. Comet assay of UV-induced DNA damage in retinal pigment epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, p. 3268-3275, 1999.

PIRCHER, M.; GÖTZINGER, E.; LEITGEB, R.; FERCHER, A.; HITZENBERGER, C. Measurement and imaging of water concentration in human cornea with differential absorption optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 11, p. 2190-2197, 2003.

PITTS, D. et al. Ocular effects of ultraviolet radiation from 295 to 365nm. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.**, v. 16, p. 932-939, 1977.

PODSKOCHY, A.; GAN, L.; FAGERHOLM, P. Apoptosis in UV-exposed rabbit corneas. **Cornea**, v. 19, p. 99-103, 2000.

PODSKOCHY, A. Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 82, p. 714-717, 2004.
RAISKUP-WOLF, F.; HOYER, A.; SPOERL, E.; PILLUNAT, L. E. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: Long-term results, **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 34, p. 796-801, 2008.

RIFFENBURGH, R. H. **Statistics in medicine**. 2 ed. Elsevier Academic Press, 2005. 672 p.

RINGVOLD, A. Damage of the cornea epithelium caused by ultraviolet radiation. **Acta Ophthalmol**, v. 61, p. 898-907, 1983.

RINGVOLD, A. In vitro evidence for UV-protection of the eye by the corneal epithelium mediated by the cytoplasmic protein, RNA, and ascorbate. **Acta Ophthalmol**, v. 75, p. 496–498, 1997.

RINGVOLD, A. Corneal epithelium and UV-protection of the eye. **Acta Ophthalmol**, v. 76, p. 149-153, 1998.

ROGERS, C. S.; CHAN, L. M.; SIMS, Y. S.; BYRD, K. D.; HINTON, D. L.; TWINING, S. S. The effects of sub-solar levels of UV-A and UV-B on rabbit corneal and lens epithelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 1007-1014, 2004

ROSENTHAL, F. S.; SAFRAN, M.; TAYLOR, H. R. The ocular dose of ultraviolet radiation from sunlight exposure. **Photochemistry and Photobiology**, v. 42, p. 163-171, 1985.

ROSENTHAL, F. S. et al. The ocular dose of ultraviolet radiation in outdoor workers. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.29, p. 649-656, 1988.

ROSENTHAL, F. S. et al. Ocular and facial skin exposure to ultraviolet radiation in sunlight: a personal exposure model with application to a worker population. **Health Phys**, v. 61, p. 77-86, 1991.

ROVATI, L.; DOCCHIO, F. Autofluorescence methods in ophthalmology. **Journal of Biomedical Optics**, v. 9, n. 19, 2004.

SEILER, T.; MCDONNELL, P. J. Excimer laser photorefractive keratectomy. **Surv. Ophthalmol.**, v. 40, p. 89-118, 1995.

SIMES, R. J. An improved Bonferroni procedure for multiple tests of significance. **Biometrika**, v. 73, p. 751-754, 1986.

SLINEY, D. H.; FREASIER, B. Evaluation of Optical Radiation Hazards. **Appl. Opt.**, v. 12, p. 1-24, 1973.

SLINEY, D. H. UV radiation ocular exposure dosimetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 31, p. 69-77, 1995.

SLINEY, D. H. Ultraviolet radiation effects upon the eye: problems of dosimetry. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 72, p. 197-206, 1997.

SLINEY, D. H. Geometrical assessment of ocular exposure to environment UV radiation implications for ophthalmic epidemiology. **J Epidemiol.**, v. 9, p. 22-32, 1999.

SLINEY, D. H. Photoprotection of the eye - UV radiation and sunglasses. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, p. 166-175, 2001.

SLINEY, D. H. Exposure geometry and spectral environment determine photobiological effects on the human eye, **Photochem Photobiol.**, v. 81, n. 3, p. 483-489, 2005.

SNELL, R. S.; LEMP, M. A. **Clinical Anatomy of the eye**, 2nd ed. ed. Blackwell Science, 1998.

SOGANDARES, F. M.; FRY, E. S. Absorption spectrum (340–640nm) of pure water. I. **Photothermal measurements. Applied Optics**, v. 36, n. 33, p. 8699-8709, 1997.

SPOERL, E. et al. Induction of Cross-links in Corneal Tissue. **Exp. Eye Res.**, v. 66, p. 97-103, 1998.

SPÖRL, E.; SCHREIBER, J.; HELLMUND, K.; SEILER, T.; KNUSCHKE, P. Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen, **Ophthalmologe**, v. 97, p. 203–206, 2000.

TAYLOR, H. R.; WEST, S.; MUNOZ B. et al. Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. **N Engl J Med**, v. 319, p. 1429-1433, 1988

TAYLOR, H. R. Ultraviolet radiation and the eye: an epidemiologic study. **Trans Am Ophthalmol Soc.**, v. 87, p. 802-853, 1989a.

TAYLOR, H. R. The biological effects of UV-B on the eye. **Photochem Photobiol.**, v. 50, p. 489-492, 1989b.

TAYLOR, H. R.; WEST, S.; MUNOZ B. et al. Visible light and risk of age-related macular degeneration. **Trans Am Ophthalmol Soc.**, v. 88, p. 163-173, 1990.

TSUBAI, T.; MATSUO, M. Ultraviolet light-induced changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of porcine corneas, **Cornea**, v. 21, p. 495–500, 2002.

VENTURA, L.; FARIA E SOUSA, J. S.; MESSIAS, A. M. V.; BISPO, J. M. System For Measuring The Transmission Spectrum Of In Vitro Corneas. **Physiological Measurements**, v. 21, n. 1, p. 197-207, 2000.

VENTURA, L.; JESUS, G. T.; OLIVEIRA, G. C. D.; SOUSA, FARIA E SOUSA, J. S. Portable light transmission measuring system for preserved corneas. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 4, n. 70, 2005.

VENTURA, L.; LINCOLN, V. A. C.; SCHIABEL, H.; FARIA E SOUSA, J. S. Portable prototype for ultraviolet analysis of donated corneas. **Proc. SPIE 7885**, 78851M, 2011. <http://dx.doi.org/10.1117/12.874797>.

VENTURA, L.; LINCOLN, V. A. C.; MELLO, M. M.; FARIA E SOUSA, J. S. Spectroscopic measurements during the corneal collagen cross-linking procedure for in vitro human corneas. **Proc. SPIE 8209**, 82091L, 2012. <http://dx.doi.org/10.1117/12.906085>.

VERGAZ, R. Efectos oculares de la radiación solar. **Informe del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid**, 2001.

WALD, G. Alleged Effects of the Near Ultraviolet on Human Vision, **JOSA**, Vol. 42, n. 3, p. 171-177, 1952.

WEGENER, A. R. In vivo studies on the effect of UV-radiation on the eye lens in animals, **Documenta Ophthalmologica**, v. 88, p. 221-232, 1995.

WEINREB, O.; DOVRAT, A.; DUNIA, I.; BENEDETTI, E.L.; BLOEMENDAL, H. UV-A-related alterations of young and adult lens water-insoluble alpha-crystallin, plasma membranous and cytoskeletal proteins. **Eur J Biochem.**, v. 268, p. 536-543, 2001.

WENK, J.; BRENNEISEN, P.; MEEWES, C.; WLASCHEK, M.; PETERS, T.; BLAUDSCHUN, R.; MA, W.; KUHR, L.; SCHNEIDER, L.; SCHARFFETTER–

KOCHANЕК, K. UV-induced oxidative stress and photoaging. **Curr Probl Dermatol.**, v. 29, p. 83–94, 2001.

WEST, S. et al. Sunlight Exposure and Risk of Lens Opacities in a Population-Based Study: The Salisbury Eye Evaluation Project. **Jama**, v. 280, n. 8, p. 714-718, 1998.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E.; SEILER, T. Riboflavin/Ultraviolet-A–induced Collagen Crosslinking for the Treatment of Keratoconus. **Am J Ophthalmol.**, v. 135, p. 620–627, 2003a.

WOLLENSAK, G. et al. Endothelial cell damage after riboflavin – ultraviolet-A treatment in the rabbit. **J Cataract Refract Surg.**, v. 29, 2003b.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking. **J Cataract Refract Surg.**, v. 29, p. 1780–1785, 2003c.

WOLLENSAK, G et al. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin / UVA treatment in vitro. **Eye**, v. 18, p. 718–722, 2004a.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera. **J Cataract Refract Surg.**, v. 30, p. 689–695, 2004b.

WOLLENSAK, G.; LONDINA, E.; DITTERT, D.; SALAMATINA, O.; STOLTENBURG, G. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 83, p. 477-482, 2005.

WOLLENSAK, G.; REDL, B. Gel Electrophoretic Analysis of Corneal Collagen After Photodynamic Cross-linking Treatment. **Cornea**, v. 27, n. 3, 2008.

WOLLENSAK, G.; AURICH, H.; WIRBELAUER, C.; SEL, S. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking. **J Cataract Refract Surg.**, v. 36, p. 114–120, 2010.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E.; MAZZOTTA, C.; KALINSKI, T.; SEL, S. Interlamellar cohesion after corneal crosslinking using riboflavin and ultraviolet A light. **Br J Ophthalmol.**, 2011.

ZIGMAN, S. Ocular light damage, **Photochem Photobiol**, v. 57, p. 1060–1068, 1993.

ZUCLICH, J. A. Cumulative effects of near-UV induced corneal damage, **Health Phys**, v. 38, p. 833-838, 1980.

ZUCLICH, J. A. Ultraviolet-induced photochemical damage in ocular tissues, **Health Phys**, v. 56, p. 671-682, 1989.

APÊNDICE

Nos itens seguintes são apresentados todas as informações utilizadas e produzidas durante a execução deste trabalho, com os *softwares* e *firmwares* gerados especificamente para este estudo, as tabelas contendo todos os dados gerados, e a descrição dos métodos estatísticos utilizados.

Apêndice A - Firmware Protótipo 3A (MCU)

O *software* final do sistema embarcado no microcontrolador com *display* de LCD é apresentado a seguir:

```

/*****
* Autor: Eng. Victor A. C. Lincoln
* Projeto: Programa do Ultravioleta para Corneas
* Versão: 03 - DATA: 06/07/2009
* Modificações: Microcontrolador - PIC 18F4550
*****/

#include <18F4550.h> // Microcontrolador
// Configurações Iniciais
#fuses INTHS,NOPUT,NOWDT,NOPROTECT,NOBROWNOUT,NOLVP
#fuses NOSTVREN,NOPBADEN,WDT1,PLL2
#DEVICE ADC=10 // AD de 10 bits
#use delay (clock = 8000000) // MCU clock = 8 MHz
#include <Globais.h>
#include <init.h>
#include <LCD420.c>
#include <ADC2.h>
#include <init_Pot.h>

// Programa Principal
void main()
{

    init(); // Inicializa o Micro
    lcd_init(); // Inicializa o LCD
    pot_init(); // Inicializa o Potenciômetro Digital
    SET_TRIS_B(0x02); // Porta B - IN
    PORT_B_PULLUPS(TRUE); // Porta B Pull Up

    lcd_putc("\f Inicializando..."); // Mensagem Inicial

```

```

lcd_gotoxy(5,2);           // Posiciona a Escrita
lcd_putc("UV TEST v3.1");  // Mensagem Versão 3.1
lcd_gotoxy(1,4);
lcd_putc("ENG. Victor Lincoln"); // Mensagem Copyright
delay_ms(3000);           // Delay de Inicialização

for (;;)
{
    lcd_putc('\f');        // Limpa tela
    lcd_gotoxy(4,1);
    lcd_putc("Transmitancia:"); // Tela Principal – Transmitância em Tempo Real
    ADC();                 // Mede e Calcula a Transmitância
    MSG();                 // Escreve a Transmitância em Tempo Real

    if(input(Enter)==0)    // Botão de Calibração
    {Calibrar();           // Função de Calibração
    delay_ms(1000);
    lcd_putc('\f');
    lcd_gotoxy(4,1);
    lcd_putc("Transmitancia:");} // Volta para Tela Principal

    delay_ms(100);
}
}
/*****/

```

<Globais.h>

```

/*****Variáveis e Definições Globais*****/

// Pinos de controle do PotDigital
#define SI    PIN_E0    // PE.0 - 08
#define CS    PIN_E1    // PE.1 - 09
#define SCK   PIN_E2    // PE.2 – 10

// Pinos de controle do Display
#define Cursor PIN_B0    // PB.0 - 33
#define Enter  PIN_B1    // PB.1 - 34

//Variável global de cálculo da transmitância
float temp1=0;

/*****/

```

<init.h>

```

/***** Inicialização das principais funções do Sistema *****/

```

```

void init()
{
  setup_oscillator(OSC_8MHZ);           // Oscilador interno em 8MHz
  SETUP_ADC(ADC_CLOCK_INTERNAL);       // AD com clock interno
  SETUP_ADC_PORTS(AN0|VSS_VREF);       // Portas do AD em A0(RA0) e A1(RA1)
}                                       // Referencias do AD (VCC e Terra)

```

```

/*****

```

<ADC2.h>

```

/***** ADC e MSG *****/
//Aquisição dos Dados, cálculo da Media e apresentação
//do resultado no display.

#define Nmed 500                       // Número de amostras para a média

void ADC();
void MSG();

void ADC()                             // Aquisição do AD – 500 medidas e cálculo
{                                       // da media final
  float AD_C0=0;
  unsigned int16 i=0;
  temp1=0;
  AD_C0=0;

  for(i=0;i<Nmed;i++){               // 500 medidas
    set_adc_channel(0);
    AD_C0=read_adc();
    temp1=AD_C0+temp1;}
  temp1=temp1/Nmed;                  // Média
}

void MSG(){                           // Escreve na Tela o valor da Transmitância

  float AD_01;

  AD_01=((temp1/0x3FF)*100);
  lcd_gotoxy(8,3);
  printf(lcd_putc,"%3.1f%% ",AD_01);
}

```

```

/*****

```

<init_Pot.h>

```

/***** Potenciômetro Digital *****/

```

```

void pot_init();

```

```

void Calibrar();
float DigitalPot (float DigAmost);
void data0();
void data1();
void RWP();
void DadosP();
int16 Dec2Bin(int16 numero);

//Variáveis Locais
unsigned int16 bin[8], DadosI=50;

void pot_init() // Inicializa o Potenciômetro para 2k
{
    output_low(CS); // CS=0 - Durante todo processo
    RWP(); // Palavra de Comando
    Dec2Bin(DadosI); // Faz conversão Decimal -> Binario
    DadosP(); // Valor do Potenciômetro
    output_high(CS); // CS=1 - Fim do Processo
}

void Calibrar()
{
    lcd_putc('\f');
    lcd_gotoxy(4,2);
    lcd_putc("Calibrando..."); // Msg de Aviso
    ADC();
    DigitalPot(temp1); // Configura o Pot Digital
}

float DigitalPot (float DigAmost) // Ajuste com o Potenciômetro Digital
{
    while ((DigAmost==0x3FF)|| (DigAmost<0x3FE))
    {
        output_low(CS); // CS=0 - Durante todo processo
        RWP(); // Configura o Pot para escrever o dado

        if (DigAmost<0x3FE) // Limiar aceitável de calibração menor
        {
            DadosI++; // Incrementa o valor do Pot
            Dec2Bin(DadosI); // Faz conversão Decimal -> Binário
            DadosP(); // Envia os Dados
        }

        if (DigAmost==0x3FF) // Limiar aceitável de calibração maior
        {
            DadosI--; // Decrementa o valor do Pot
            Dec2Bin(DadosI); // Faz conversão Decimal -> Binário
            DadosP(); // Envia os Dados
        }

        output_high(CS); // CS=1 - Fim do Processo
        ADC(); // Refaz a conversão
        DigAmost=temp1; // Atualiza o valor de Transmitância
    }
    return 0;
}

```

```

// Pot Digital - Comunicação Serial
// Dado deve ser enviado na Subida do Clock SCK
// O num de clocks deve ser múltiplo de 16
// Um clock pra cada bit enviado

void data0()                                // Envia DATA=0
{
    output_low(SI);                          // SI=0 - Bit 0
    delay_us(33);
    output_high(SCK);                        // SCK=1 - Subida do Clock
    output_low(SCK);                         // SCK=0 - Descida do Clock
}

void data1()                                // Envia DATA=1
{
    output_high(SI);                         // SI=1 - Bit 1
    delay_us(33);
    output_high(SCK);                        // SCK=1 - Subida do Clock
    output_low(SCK);                         // SCK=0 - Descida do Clock
}

void RWP()                                  // Envia a Palavra de Comando - Config RW
{
    data0();                                // Palavra de 8 bits enviados 1 a 1 - 11h
    data0();                                // Pot Digital - Palavra (byte) de Comando
    data0();
    data1();
    data0();
    data0();
    data0();
    data1();
    output_low(SI);                          // Seta o duto de dados em 0 para o segundo byte
}

void DadosP()                              // Envia o valor do Potenciômetro
{
    unsigned int n;

    for(n=0;n<=7;n++)                       // Palavra (byte) de Dados
    {
        if (bin[n]==0)                       // Lê o binário armazenado bit a bit
            data0();//2,5k                    // bit=0
        if (bin[n]==1)
            data1();                          // bit=1
    }
}

int16 Dec2Bin(int16 numero)                 // Converte Decimal para Binário
{
    signed int g=7;

```

```
for(g=7;g>=0;g--)          // Armazena o byte - binário
{
    if( (numero % 2) == 0)    // Se resto da divisão = 0
        { bin[g] = 0; }      // bit=0
    else { bin[g] = 1; }      // Se não bit=1

    numero = numero / 2;      // Numero/2
}
return 0;
}
```

/*

*/

Apêndice B - Firmware Protótipo 3B (MCU)

O *software* final do sistema embarcado no microcontrolador com conectividade USB é apresentado a seguir:

```

/*****
* Autor: Eng. Victor A. C. Lincoln
* Projeto: Programa do Ultravioleta para Corneas
* Versão: 01PC - DATA: 15/07/2009
* Modificações: Microcontrolador - PIC 18F4550
* Adaptação do Projeto – Para conectividade USB
*****/

#include <18F4550.h>          // Microcontrolador
// Configurações Iniciais – Ajusta um clock com Cristal de 12MHz para operar em 48MHz
#define HSPLL,NOWDT,NOPROTECT,NOLVP,NODEBUG,USBDIV,PLL3,CPUDIV1,
    VREGEN,NOPBADEN
#define device ADC=10        // AD de 10 bits
#define use delay(clock=48000000) // Clock 48MHz

// Bibliotecas e funções do programa
#include <usb_cdc.h>
#include <Globais4.h>
#include <init4.h>
#include <ADC4.h>
#include <init_Pot4.h>

// Programa Principal
void main()
{
    char str,str2;
    init();                    // Inicializa o Microcontrolador
    pot_init();                // Inicializa o Potenciômetro Digital
    usb_cdc_init();            // Inicializa protocolo USB_Serial
    usb_init();                // Inicializa o USB

    while(!usb_cdc_connected()) {} // Enquanto a conexão é valida

    do {
        usb_task();            // Verifica o estado da conexão
        if(usb_enumerated()) { // Se a conexão é valida e enumerada
            str=' ';           // Limpa a palavra de controle
            str2=' ';
            str=usb_cdc_getc(); // Recebe a palavra de controle

            if(str=='C'){       // Se igual a "C" - Calibrar
                ADC();
                DigitalPot(temp1); // Configura o Pot Digital
            }
        }
    } while(1);
}

```

```

    ADC();
    MSG();
    output_high(PIN_D0);}

    if(str=='T'){                                // Se igual a "T" – Mostra Transmissão
        while(str=='T'){
            ADC();
            MSG();
            str=usb_cdc_getc();
            output_high(PIN_D0);}

        usb_cdc_putc(' ');}

    } while (TRUE);
}
/*****/

```

<Globais4.h>

```

/*****Variáveis e Definições Globais*****/

#define SI    PIN_E0    // PE.0 - 08
#define CS    PIN_E1    // PE.1 - 09
#define SCK   PIN_E2    // PE.2 - 10

float temp1=0, AD_01=0;

/*****/

```

<init4.h>

```

/***** Inicialização das principais funções do Sistema *****/

void init()
{
    setup_oscillator(OSC_8MHZ);           // Oscilador interno em 8MHz
    SETUP_ADC(ADC_CLOCK_INTERNAL);       // AD com clock interno
    SETUP_ADC_PORTS(AN0|VSS_VREF);       // Portas do AD em A0(RA0) e A1(RA1)
}                                         // Referencias do AD (VCC e Terra)

/*****/

```

<ADC4.h>

```

//Aquisição dos Dados, cálculo da Media e apresentação
//do resultado no display.

```

```
#define Nmed 500 // Número de amostras para a média

void ADC();
void MSG();

void ADC() // Aquisição do AD – 500 medidas e cálculo
{ // da media final
    float AD_C0=0;
    unsigned int16 i=0;
    temp1=0;
    AD_C0=0;

    for(i=0;i<Nmed;i++){ // 500 medidas
        set_adc_channel(0);
        AD_C0=read_adc();
        temp1=AD_C0+temp1;}

    temp1=temp1/Nmed; // Média
}

void MSG(){

    AD_01=((temp1/0x3FF)*100);

    printf(usb_cdc_putc,"%3.1f%%",AD_01);
}
```

<init Pot4.h>

```
void pot_init();
void Calibrar();
float DigitalPot (float DigAmost);
void data0();
void data1();
void RWP();
void DadosP();
int16 Dec2Bin(int16 numero);

//Variáveis Locais
unsigned int16 bin[8], DadosI=50;

void pot_init() // Inicializa o Potenciômetro para 2k
{
    output_low(CS); // CS=0 - Durante todo processo
    RWP(); // Palavra de Comando
    Dec2Bin(DadosI); // Faz conversão Decimal -> Binario
    DadosP(); // Valor do Potenciômetro
```

```

    output_high(CS);                // CS=1 - Fim do Processo
}

float DigitalPot (float DigAmost)    // Ajuste com o Potenciômetro Digital
{
    while ((DigAmost==0x3FF)|| (DigAmost<0x3FE))
    {
        output_low(CS);            // CS=0 - Durante todo processo
        RWP();                     // Configura o Pot para escrever o dado

        if (DigAmost<0x3FE)         // Limiar aceitável de calibração menor
        {
            DadosI++;              // Incrementa o valor do Pot
            Dec2Bin(DadosI);        // Faz conversão Decimal -> Binário
            DadosP();               // Envia os Dados
        }

        if (DigAmost==0x3FF)        // Limiar aceitável de calibração maior
        {
            DadosI--;              // Decrementa o valor do Pot
            Dec2Bin(DadosI);        // Faz conversão Decimal -> Binário
            DadosP();               // Envia os Dados
        }

        output_high(CS);            // CS=1 - Fim do Processo
        ADC();                      // Refaz a conversão
        DigAmost=temp1;             // Atualiza o valor de Transmítância
    }
    return 0;
}

// Pot Digital - Comunicação Serial
// Dado deve ser enviado na Subida do Clock SCK
// O num de clocks deve ser múltiplo de 16
// Um clock pra cada bit enviado

void data0()                        // Envia DATA=0
{
    output_low(SI);                 // SI=0 - Bit 0
    delay_us(33);
    output_high(SCK);               // SCK=1 - Subida do Clock
    output_low(SCK);                // SCK=0 - Descida do Clock
}

void data1()                        // Envia DATA=1
{
    output_high(SI);                // SI=1 - Bit 1
    delay_us(33);
    output_high(SCK);               // SCK=1 - Subida do Clock
    output_low(SCK);                // SCK=0 - Descida do Clock
}

void RWP()                          // Envia a Palavra de Comando - Config RW
{
    data0();                        // Palavra de 8 bits enviados 1 a 1 - 11h
    data0();                        // Pot Digital - Palavra (byte) de Comando
}

```

```

data0();
data1();
data0();
data0();
data0();
data1();
output_low(SI);           // Seta o duto de dados em 0 para o segundo byte
}

void DadosP()              // Envia o valor do Potenciômetro
{
    unsigned int n;

    for(n=0;n<=7;n++)      // Palavra (byte) de Dados
    {if (bin[n]==0)         // Lê o binário armazenado bit a bit
        data0();//2,5k      // bit=0
        if (bin[n]==1)
            data1();        // bit=1
    }
}

int16 Dec2Bin(int16 numero) // Converte Decimal para Binário
{
    signed int g=7;

    for(g=7;g>=0;g--)      // Armazena o byte - binário
    {
        if( (numero % 2) == 0) // Se resto da divisão = 0
            { bin[g] = 0; }     // bit=0
        else { bin[g] = 1; }    // Se não bit=1

        numero = numero / 2;    // Numero/2
    }
    return 0;
}
/*****/

```

Apêndice C - Software Protótipo 3B (PC)

O *software* do sistema do computador PC, com banco de dados, é apresentado a seguir em linguagem Delphi 7:

```

unit UV_Cornea2;

interface

uses

    Windows, Messages, SysUtils, Variants, Classes, Graphics, Controls, Forms,
    Dialogs, StdCtrls, CPort, ExtCtrls, Menus, jpeg;

```

type

```

TForm1 = class(TForm)
  Tela1: TPanel;
  ComPort1: TComPort;
  Label1: TLabel;
  Iniciar: TButton;
  Parar1: TButton;
  Sair: TButton;
  Calibrar: TButton;
  Salvar: TButton;
  MainMenu1: TMainMenu;
  Menu1: TMenuItem;
  Sobre1: TMenuItem;
  Sair1: TMenuItem;
  SaveDialog1: TSaveDialog;
  Memo1: TMemo;
  RadioGroup1: TRadioGroup;
  E_Init: TRadioButton;
  S_Ep: TRadioButton;
  Corte_L: TRadioButton;
  Lamela: TRadioButton;
  Calibrar1: TMenuItem;
  Iniciar1: TMenuItem;
  Salvar1: TMenuItem;
  Edit1: TEdit;
  Nova_Cornea: TButton;
  Edit2: TEdit;
  Edit3: TEdit;
  Edit4: TEdit;
  Edit5: TEdit;
  Edit6: TEdit;
  RadioGroup2: TRadioGroup;
  GroupBox1: TGroupBox;
  Label2: TLabel;
  Label3: TLabel;
  Label4: TLabel;
  Novo1: TMenuItem;
  Edit7: TEdit;
  Label5: TLabel;
  procedure SairClick(Sender: TObject);

```

```

    procedure Sobre1Click(Sender: TObject);
    procedure IniciarClick(Sender: TObject);
    procedure CalibrarClick(Sender: TObject);
    procedure Parar1Click(Sender: TObject);
    procedure SalvarClick(Sender: TObject);
    procedure Nova_CorneaClick(Sender: TObject);
    procedure E_InitClick(Sender: TObject);
    procedure S_EpClick(Sender: TObject);
    procedure Corte_LClick(Sender: TObject);
    procedure LamelaClick(Sender: TObject);
private
    { Private declarations }
public
    { Public declarations }
    RxstrT: string;
end;

var
    Form1: TForm1;
    Parar: Boolean;
    Save: Boolean;
    Sair2: Boolean;
    New:integer;

implementation

{$R *.dfm}

procedure Delay(MSec: Cardinal);
var
    Start: Cardinal;
begin
    Start := GetTickCount;
    repeat
        Application.ProcessMessages;
    until (GetTickCount - Start) >= MSec;
end;

procedure TForm1.SairClick(Sender: TObject);

```

```

begin
Sair2:= True;
close;
end;

```

```

procedure TForm1.Sobre1Click(Sender: TObject);
begin
showmessage('UV Córnea v1.0' + #13 + 'Eng. Victor Lincoln' + #13 + 'Contato:
victor.lincoln@usp.br');
end;

```

```

procedure TForm1.IniciarClick(Sender: TObject);
var

```

```

    TxstrT: string;
    //RxstrT: string;
    Count: integer;
    l: integer;

```

```

begin
    TxstrT:='T';
    l:=1;
    Nova_cornea.Enabled:=False;
    Calibrar.Enabled:=False;
    Iniciar.Visible:=False;
    Parar1.Visible:=True;
    ComPort1.Open;
    while l=1 do
        Begin
            ComPort1.WriteStr(TxstrT);
            ComPort1.ReadStr(RxstrT,Count);
            Tela1.Caption:=RXstrT;
            delay(200);
            application.ProcessMessages;
            if Parar OR Save OR Sair2 Then Begin
                Parar:= False;
                l:=0;
            end;
        end;
    end;
    Calibrar.Enabled:=True;
    Nova_cornea.Enabled:=True;
    Parar1.Visible:=False;

```



```

    Iniciar.Visible:=True;
    ComPort1.WriteStr(' ');
    ComPort1.close;
end;

procedure TForm1.CalibrarClick(Sender: TObject);
var
    TxstrC: string;
    RxstrC: string;
    Count: integer;
begin
    TxstrC:='C';
    Calibrar.Caption:='Aguarde...';
    Calibrar.Enabled:=False;
    Salvar.Enabled:=False;
    Iniciar.Enabled:=False;
    Label5.Visible:=False;
    ComPort1.Open;
    ComPort1.WriteStr(TxstrC);
    delay(5);
    ComPort1.ReadStr(RxstrC,Count);
    Tela1.Caption:=RXstrC;
    ComPort1.close;
    Tela1.Caption:='...';
    delay(3000);
    Label5.Visible:=True;
    Tela1.Caption:='100 ';
    Calibrar.Caption:='Calibrar';
    Calibrar.Enabled:=True;
    Salvar.Enabled:=True;
    Iniciar.Enabled:=True;
end;

procedure TForm1.Parar1Click(Sender: TObject);
begin
    Parar:= True;
end;

procedure TForm1.SalvarClick(Sender: TObject);

```

```

var
N_Cornea: string;
C_Endotelial: string;
Data_C: string;
begin
Save:= True;
if New=1 then begin
N_Cornea:=Edit1.Text;
C_Endotelial:=Edit2.Text;
Data_C:=Edit3.Text;
Memo1.Lines.ADD("");
Memo1.Lines.ADD('Data: '+datetostr(now)+' Hora: '+timetostr(now));
Memo1.Lines.ADD("");
Memo1.Lines.ADD('Córnea Número:      '+N_Cornea);
Memo1.Lines.ADD('Cont. Endotelial:    '+C_Endotelial);
Memo1.Lines.ADD('Data da Coleta:      '+Data_C);
Memo1.Lines.ADD("");
Memo1.Lines.ADD('                Trans  Paq');
New:=0;
end;

if E_init.Checked=true then begin
Memo1.Lines.ADD('Estagio Inicial:    '+RXstrT+' '+Edit4.Text);
end;
if S_Ep.Checked=true then begin
Memo1.Lines.ADD('Sem Endotélion:    '+RXstrT+' '+Edit5.Text);
end;
if Corte_L.Checked=true then begin
Memo1.Lines.ADD('Corte de Lamela:    '+RXstrT+' '+Edit6.Text);
end;
if Lamela.Checked=true then begin
Memo1.Lines.ADD('Lamela:            '+RXstrT+' '+Edit7.Text);
end;

if savedialog1.Execute then begin
Memo1.Lines.SaveToFile(savedialog1.filename);
end;
Save:= False;
end;

```

```
procedure TForm1.Nova_CorneaClick(Sender: TObject);
begin
  New:=1;
  Iniciar.Enabled:=True;
  Calibrar.Enabled:=True;
  Salvar.Enabled:=True;
  Edit1.Enabled:=True;
  Edit2.Enabled:=True;
  Edit3.Enabled:=True;
  Edit1.Clear;
  Edit2.Clear;
  Edit3.Clear;
  Edit4.Clear;
  Edit5.Clear;
  Edit6.Clear;
  Edit7.Clear;
end;
```

```
procedure TForm1.E_InitClick(Sender: TObject);
begin
  if E_init.Checked=true then begin
    edit4.Enabled:=True;
    edit5.Enabled:=False;
    edit6.Enabled:=False;
    edit7.Enabled:=False;
  end;
end;
```

```
procedure TForm1.S_EpClick(Sender: TObject);
begin
  if S_Ep.Checked=true then begin
    edit4.Enabled:=False;
    edit5.Enabled:=True;
    edit6.Enabled:=False;
    edit7.Enabled:=False;
  end;
end;
```

```
procedure TForm1.Corte_LClick(Sender: TObject);
```

```

begin
if Corte_L.Checked=true then begin
edit4.Enabled:=False;
edit5.Enabled:=False;
edit6.Enabled:=True;
edit7.Enabled:=False;
end;
end;

procedure TForm1.LamelaClick(Sender: TObject);
begin
if Lamela.Checked=true then begin
edit4.Enabled:=False;
edit5.Enabled:=False;
edit6.Enabled:=False;
edit7.Enabled:=True;
if ((Length(Trim(Edit5.Text)) >0) AND (Length(Trim(Edit6.Text)) >0)) then Begin
edit7.Text:=floattostr(strtfloat(edit5.Text)-strtfloat(edit6.Text));
end;
end;
end;

end.

```

Apêndice D - Comparação entre paquímetros

Dados do estudo dos paquímetros do tipo mecânico e ultrassônico.

Tabela 16: Paquimetria Ultrassom Sonomed.

Usuário	A				B			C		
Córnea	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11108D	946	947	1008	1009	959	995	1011	995	1012	993
11108E	984	941	1007	997	946	925	1006	965	990	1011
11106D	925	935	1009	1005	945	937	1007	956	943	1012
11106E	948	968	971	934	987	939	960	978	908	892
11112D	762	754	751	747	761	713	627	756	690	680
11112E	801	722	820	791	739	763	783	757	723	715
11107E	1003	922	978	1008	1006	974	969	969	966	924
11101E	1006	1000			1007	999			1004	986

Tabela 17: Paquimetria pelo micrômetro digital.

Usuário	A					B					C				
Córnea	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
11108D	876	818	867	822	821	953	916	923	866	918	852	910	845	910	912
11108E	1011	993	962	983	939	985	940	995	901	985	899	959	910	911	901
11106D	916	941	936	909	893	878	897	931	844	933	832	838	846	846	842
11106E	746	756	752	681	701	799	718	748	755	757	706	738	793	755	756
11112D	642	592	583	564	575	642	605	657	634	628	576	597	621	634	606
11112E	653	649	637	638	600	658	620	676	619	659	598	604	616	606	605
11107E	820	828	819	796	791	826	759	812	792	790	793	753	755	756	789
11101E	754	842	829	786	740	886	865	913	905	928	809	826	863	850	846

Tabela 18: Desvio Padrão das paquimetrias.

Desvio Padrão		
Córnea	Ultrassom	Micrômetro
11108D	26,56	39,77
11108E	30,94	39,70
11106D	36,06	41,00
11106E	30,73	31,82
11112D	36,05	28,79
11112E	36,58	25,28
11107E	31,28	26,28
11101E	7,71	54,88

Apêndice E - Métodos de Análises Estatísticas Utilizados

Neste projeto foram utilizados três principais métodos de Análises Estatística. A seguir, para melhor entendimento deste trabalho, estes métodos estão descritos de forma simplificada para a sua utilização imediata e uma breve descrição inicial de cada um deles é feita como introdução para orientar o leitor a identificar em que situações estes métodos foram utilizados.

- **Medidas Repetidas Unifatorial (ANOVA)**

Em nosso trabalho este método foi utilizado para identificar a existência ou não de significância estatística entre os grupos de córneas analisadas em diferentes estágios de certos procedimentos e ao longo do tempo.

O método ANOVA para medidas repetidas (One-way repeated measures ANOVA) trata de uma variável dependente submetida a medidas repetidas. Nesta situação, a hipótese de independência geral como no método de análise de variância simples (One-way ANOVA) não é assumida, já que provavelmente há uma correlação entre os níveis do fator de repetição. Este método pode ser empregue para testar se as médias são iguais ou não. Estas médias incluem a média das medições diferentes (ao longo do tempo) e a média dos indivíduos diferentes (entre as córneas analisadas).

Para se determinar as possíveis diferenças entre as médias, o método ANOVA para medidas repetidas proporciona a comparação múltipla das médias, para a identificação quais médias particularmente são diferentes.

- **Teste de *Bonferroni***

(SIMES, 1986; HOCHBERG, 1988; RIFFENBURGH, 2005)

Este método *post-hoc* foi utilizado para identificar a existência ou não de significância estatística dentro dos grupos de córneas analisadas em diferentes estágios de certos procedimentos e ao longo do tempo. Este teste de comparação de média serve como um complemento para o estudo da análise de variância.

O teste ou procedimento de Bonferroni, consiste na realização de um teste *t* para cada par de médias a uma taxa de erro por comparação (TPC). Usando esse teste, o nível de significância da família é no máximo 95%, para qualquer configuração (formação) das médias da população. Dessa forma, tem-se que o teste de Bonferroni protege a taxa de erro da família dos testes. Isso ilustra a taxa de erro conhecida como taxa de erro por família.

- **Bland-Altman**

(BLAND; ALTMAN, 1983, 1986, 1995, 1999; HIRAKATA et al., 2009)

Muitos estudos utilizam o coeficiente de correlação (*r*) entre os resultados de dois métodos de medição como um indicador de concordância, porém a abordagem estatística mais adequada não é tão óbvia. Assim optou-se por usar uma análise estatística alternativa que foi proposta por Bland-Altman.

Bland e Altman publicaram uma metodologia alternativa ao cálculo do coeficiente de correlação, metodologia mais aplicada até então, porém o coeficiente de correlação não avalia concordância e sim associação. O método de Bland-Altman consiste na implementação de um gráfico de dispersão entre duas medidas junto com a reta da diagonal de concordância. Depois é realizado o gráfico de Bland-Altman propriamente, que é um gráfico de dispersão que relaciona as médias de dois métodos $(X + Y)/2$, no eixo *X*, com o viés (diferença entre as médias de dois métodos), $X - Y$, no eixo *Y*. O gráfico de Bland-Altman possibilita uma avaliação da relação das discordâncias com as medidas avaliadas.

No método deve-se avaliar se as diferenças entre as medidas dependem do tamanho da medida, através de uma correlação entre as diferenças e as médias. Também é realizado um cálculo do viés (d) e do seu desvio-padrão (sd) para se obter os limites de concordância: $d \pm 1,96sd$, que são calculados e incluídos no gráfico. Assim se o viés apresenta uma distribuição normal, estes limites representam a região na qual 95% das diferenças nos casos estudados se encontram.

Apêndice F - Declaração de Comitê de Ética

Todos os experimentos realizados neste trabalho com córneas humanas foram submetidos ao CONEP (*Conselho Nacional de Ética em Pesquisa*) e foi aprovado sob o número de registro: **HCRP 6788/2009**, no Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sob as responsabilidades da **Profa. Dra. Liliane Ventura** e do **Prof. Dr. Sidney Julio de Faria e Sousa**.