AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Desenvolvimento de um algoritmo otimizado para caracterização de fluxos
microfluídicos utilizando padrões de speckle presentes no sinal de Tomografia por
Coerência Óptica**

Lucas Ramos De Pretto

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

São Paulo

2015

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Desenvolvimento de um algoritmo otimizado para caracterização de fluxos
microfluídicos utilizando padrões de speckle presentes no sinal de Tomografia por
Coerência Óptica**

Lucas Ramos De Pretto

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

Dedico este trabalho, por mais humilde que seja, a todas as pessoas que, através de suas ações, palavras, gestos ou arte, tentam fazer o mundo um pouco melhor.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, que sempre acreditaram em mim, me apoiaram, incentivaram e possibilitaram essa jornada. Sem vocês eu não existiria. Sem seus ensinamentos eu nada seria. Vocês são minha base, hoje e sempre. Amo vocês.

A toda a minha família e minha namorada, pessoas que nunca deixaram de me dar suporte, amor, carinho, sugestões, opiniões, incentivo e, acima de tudo, nunca deixaram de me aturar, e nunca me deixaram desanimar. Vocês são meu porto seguro.

A todos os amigos que fiz durante minha história, que não ousou nomear aqui, sob o risco de esquecer alguém. Amigos que vieram dos mais variados lugares, como a sala de aula (inclusive ministrando a aula), a vizinhança da minha casa, os serviços de segurança e limpeza, a sala de bolsistas, o dojo, um jogo de computador. Há amigos que conheço há mais de metade da minha vida, e nem lembro como era sem eles. Há amigos que conheço há menos tempo, mas são tão importantes que nem quero imaginar como seria sem eles. Vocês são, também, minha família.

Ao professor Msc. André Luiz Vazine Pereira, ao professor Alexandre Fernando Stucchi, ao Sensei Adriano Pereira da Silva e a Newton Antonio Arantes, pessoas que mudaram minha maneira de ver o mundo e mudaram minha concepção sobre o que é ensinar e aprender. Sem vocês pelo meu caminho, eu não seria quem sou hoje.

À Dra. Martha Simões Ribeiro, ao Dr. Wagner de Rossi e à Dra. Denise Maria Zezell pelo apoio e presença constantes durante este trabalho. Para mim, vocês foram professores por todo este tempo, me ensinando algo a todo momento, mesmo nos corredores do Centro de Lasers e Aplicações.

Ao Dr. Gesse Eduardo Calvo Nogueira. Não há agradecimentos suficientes para fazer jus às suas contribuições para este trabalho, e para minha formação. Me atendendo mesmo em momentos inoportunos, e tendo paciência para me ensinar. Obrigado.

Ao Dr. Marcus Paulo Raele, ao Dr. Anderson Stevens Leonidas Gomes, ao Dr. Niklaus Ursus Wetter e ao Dr. Adriano Mesquita Alencar por aceitarem ler, avaliar e contribuir para este trabalho. Obrigado por dedicarem um pouco de seu tempo para tornar este estudo melhor.

Ao Dr. Anderson Zanardi de Freitas. Não é possível expressar o quão grato sou por ter acreditado em mim desde o início, mesmo sem ter motivos para tal. E, após isto, ainda me aturar por mais de dois anos, perturbando-o em sua sala, fazendo perguntas às vezes bobas, às vezes adequadas e às vezes demasiadamente complexas. Professor, agradeço-o pela confiança, tempo, dedicação, ensinamentos, orientação e amizade.

Sou uma combinação das contribuições de todas essas pessoas e de tantas outras mais, com suas histórias, lições e expressões. Por isso sou grato a todos vocês.

Agradeço ao IPEN e à Universidade de São Paulo, pela infraestrutura e aulas que possibilitaram a criação deste trabalho.

Agradeço à FAPESP Processo 2013/05492-9, pelo auxílio financeiro ao estudo.

“You’re curious and smart and bored, and all you see is the choice between working hard and slacking off. There are so many adventures that you miss because you’re waiting to think of a plan. To find them, look for tiny interesting choices. And remember that you are always making up the future as you go.”

Randall Munroe, através de sua personagem Megan.

DESENVOLVIMENTO DE UM ALGORITMO OTIMIZADO PARA CARACTERIZAÇÃO DE FLUXOS MICROFLUÍDICOS UTILIZANDO PADRÕES DE SPECKLE PRESENTES NO SINAL DE TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA

Lucas Ramos De Pretto

RESUMO

O presente trabalho abordou o sistema de Tomografia por Coerência Óptica (OCT) e sua aplicação à área de microfluídica. Para tanto, foram realizados testes de caracterização física de circuitos microfluídicos, utilizando modelos 3D (tridimensionais) construídos a partir de imagens de OCT destes circuitos. A técnica foi, assim, avaliada como potencial ferramenta de auxílio na aferição de microcanais. Indo além, este trabalho estuda e desenvolve técnicas de análise para fluxos microfluídicos, em especial técnicas baseadas no padrão de speckle. Em primeiro momento, métodos já existentes foram estudados e aprimorados, como o Speckle Variance – OCT, em que foi obtido um ganho de 31% em tempo de processamento. Outros métodos, como o LASCA (Laser speckle Contrast Analysis), baseados na autocorrelação de speckle, são adaptados às imagens de OCT. Derivado do LASCA, o método de análise desenvolvido baseado na autocorrelação de intensidade motivou o desenvolvimento de um arranjo de OCT próprio e software de aquisição customizado, com taxa de amostragem da ordem de 8 kHz. O método proposto foi, então, capaz de distinguir fluxos volumétricos variados, e seus limites de detecção foram testados, comprovando sua viabilidade de aplicação para análise de movimento browniano e fluxos volumétricos abaixo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

**DEVELOPMENT OF AN OPTIMIZED ALGORITHM FOR THE
CHARACTERIZATION OF MICROFLOW USING SPECKLE PATTERNS
PRESENT IN OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY SIGNAL**

Lucas Ramos De Pretto

ABSTRACT

This work discusses the Optical Coherence Tomography system (OCT) and its application to the microfluidics area. To this end, physical characterization of microfluidic circuits were performed using 3D (three-dimensional) models constructed from OCT images of such circuits. The technique was thus evaluated as a potential tool to aid in the inspection of microchannels. Going further, this workpaper studies and develops analytical techniques for microfluidic flow, in particular techniques based on speckle pattern. In the first instance, existing methods were studied and improved, such as Speckle Variance - OCT, where a gain of 31% was obtained in processing time. Other methods, such as LASCA (Laser Speckle Contrast Analysis), based on speckle autocorrelation, are adapted to OCT images. Derived from LASCA, the developed analysis technique based on intensity autocorrelation motivated the development of a custom OCT system as well as an optimized acquisition software, with a sampling rate of 8 kHz. The proposed method was, then, able to distinguish different flow rates, and limits of detection were tested, proving its feasibility for implementation on Brownian motion analysis and flow rates below 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos Específicos	19
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	20
3.1 Tomografia Por Coerência Óptica - OCT.....	20
3.1.1 Funcionamento da Técnica.....	22
3.1.2 Formalismo Matemático	28
3.2 Speckle.....	31
3.2.1 Estatísticas de Primeira Ordem	32
3.2.2 speckle como fonte de informação	36
3.2.3 Speckle no OCT	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
5. RESULTADOS - SISTEMAS DE OCT COMERCIAIS	45
5.1 OCT Para A Caracterização De Circuitos Microfluídicos.....	45
5.1.1 Materiais e Métodos	46
5.1.2 Resultados e Discussão	49
5.1.3 Conclusões	57
5.2 Speckle Variance OCT	58
5.2.1 Materiais e Métodos / Softwares Desenvolvidos	61
5.2.2 Resultados e Discussão	63
5.2.3 Algoritmo Simplificado - Materiais e Métodos.....	66
5.2.4 Comparação e Discussão.....	69
5.2.5 Conclusões	72
5.3 Técnica LASCA Aplicada A Imagens De OCT	72
5.3.1 Materiais e Métodos / Softwares Desenvolvidos	73
5.3.2 Resultados e Discussão	77

5.3.3 Conclusões	82
5.4 Análise De Autocorrelação Em Imagens De OCT	83
5.4.1 Materiais e Métodos / Softwares Desenvolvidos	84
5.4.2 Resultados e Discussão	85
5.4.3 Conclusões	88
6. AUTOCORRELAÇÃO DO SINAL DE OCT	89
6.1 Sistema de OCT Desenvolvido.....	89
6.2 Ajuste Do Algoritmo	92
6.3 Analisando Diferentes Fluxos	94
6.3.1 Materiais e Métodos	94
6.3.2 Resultados e Discussão	95
6.4 Análise Com Movimento Browniano	102
6.4.1 Materiais e Métodos	103
6.4.2 Resultados e Discussão	104
6.5 Análise Com Diferentes Diluições	106
6.5.1 Materiais e Métodos	107
6.5.2 Resultados e Discussão	107
6.6 Obtendo Um B-Scan.....	109
6.6.1 Materiais e Métodos	109
6.6.2 Resultados e Discussão	109
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	113
8. APÊNDICES	116
Apêndice A – Fluxograma do Software de Aquisição Otimizado.....	116
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de interesse usados na fabricação dos microcanais.....	46
Tabela 2 - Média e Desvio Padrão da profundidade ao longo dos microcanais. Valores Gerais consideram toda a extensão, enquanto Valores Recalculados levam em conta a partir de 445,5µm.....	50
Tabela 3 - Média e Desvio Padrão da largura ao longo dos microcanais, à meia altura e na base. Valores Gerais consideram toda a extensão, enquanto Valores Recalculados levam em conta a partir de 445,5µm.	53
Tabela 4 - Ângulos Internos da parede dos canais em relação à base. D.P. indica o desvio padrão. Valores Gerais consideram toda a extensão, enquanto Valores Recalculados levam em conta a partir de 495 µm.	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico comparativo entre técnicas de diagnóstico por imagem, a partir da relação Profundidade de Penetração X Resolução (adaptado de 11).	16
Figura 2 - Publicações relacionadas à palavra-chave "Optical Coherence Tomography" por ano de publicação. Nota-se o crescimento contínuo e exponencial. Base de dados: Web of Science. Dados de Fevereiro/2015.	17
Figura 3 - Publicações relacionadas à palavra-chave "Optical Coherence Tomography" por país. Destaque para a posição do Brasil. Base de dados: Web of Science. Dados de Fevereiro/2015.	18
Figura 4 - Interferômetro com o espelho do Braço de Teste móvel.	20
Figura 5 - Montagem básica de um OCT.	22
Figura 6 - Aquisição de diversos A-Scans adjacentes.	23
Figura 7 - Imagem da palma da mão gerada pela técnica de OCT.	23
Figura 8 - Técnica de TD-OCT. A) O braço de referência seleciona apenas uma região da amostra e um interferograma é gerado. B) O braço de referência se move, varrendo diversas profundidades da amostra, e os interferogramas são combinados em um único A-Scan.	25
Figura 9 - Montagem básica de um FD-OCT.	26
Figura 10 - Espectros detectados no FD-OCT mostrados como Intensidade (unidade arbitrária) em função do número de onda K (m^{-1}). A) Espectro da fonte luminosa. B) Espectro detectado pelo arranjo quando o caminho ópticos dos espelhos é o mesmo. C) Espectro detectado com uma pequena diferença de caminhos ópticos.	27
Figura 11 - Padrão de speckle típico.	32
Figura 12 - Exemplo da técnica de LASCA. À esquerda está a imagem original; à direita está a imagem em cores falsas codificadas em função do contraste.	41
Figura 13 – Esquerda: Representação no plano complexo das amplitudes imaginária e real do sinal demodulado. Direita: Distribuição de ângulo da fase do sinal demodulado. Adaptado de [22].	43
Figura 14 - Microcanais estudados.	47

Figura 15 - Exemplo de imagem de OCT do grupo 2, com os microcanais 4 (esquerda) e 5 (direita).....	47
Figura 16 - Reconstrução 3D dos canais do grupo 2, sob diferentes ângulos de visualização.....	48
Figura 17 - Gráfico comparativo da profundidade dos 8 microcanais em função do comprimento.	50
Figura 18 - Gráfico comparativo da largura na abertura dos 8 microcanais em função do comprimento.....	51
Figura 19 - Gráfico comparativo da largura à meia altura dos 8 microcanais em função do comprimento.....	52
Figura 20 - Gráfico comparativo da largura na base dos 8 microcanais em função do comprimento.	53
Figura 21 - Detalhe dos microcanais 7 (esquerda) e 8 (direita).....	55
Figura 22 - Medida de perfilometria óptica para a profundidade do microcanal de número 4.....	56
Figura 23 - Medida de perfilometria óptica para a largura do microcanal de número 4.....	56
Figura 24 - Ilustração do método de Speckle Variance.....	60
Figura 25 - Imagem de um embrião de rato com 9,5 dias. A) Imagem estrutural 3D obtida com OCT. B) Imagem correspondente com a técnica de speckle Variance. É notável o mapeamento das regiões vascularizadas. Imagens de Sudheendran <i>et al.</i> , na referência [41].	61
Figura 26 - Exemplo de imagem inicial simulada.	62
Figura 27 - Speckle Variance de partículas simuladas.....	64
Figura 28 - Gráfico da visibilidade (u.a.) em função da velocidade ($\mu\text{m/s}$) para o nível de ruído em 12%.	64
Figura 29 - Gráfico da visibilidade (u.a.) em função de ruído de fundo (u.a.) para a velocidade de 25 $\mu\text{m/s}$	65
Figura 30 - Gráfico de superfície 3D, mostrando a visibilidade (u.a.) em função de velocidade ($\mu\text{m/s}$) e ruído de fundo (u.a.).	66

Figura 31 - Ilustração do algoritmo proposto para análise de flutuações de intensidade.....	68
Figura 32 - Comparação entre speckle Variance e nosso algoritmo. A: Imagem da série original; B: Resultado do speckle Variance; C: Nosso resultado.....	69
Figura 33 - Comparação do tempo de execução dos algoritmos.	71
Figura 34 - Ilustração do método para simular exposição e limiarização. Resultado 1 é obtido após simular exposição. Resultado 2 obtido a partir da limiarização do Resultado 1.	74
Figura 35 - Ilustração da execução do algoritmo de LASCA.	75
Figura 36 - Estrutura utilizada para realizar testes com papel seda.....	77
Figura 37 - Comparação do algoritmo de LASCA implementado em um software comercial (A) e em nosso software (B). Apesar da diferença na escala de cores, percebe-se que as imagens estão em acordo nas regiões de concentração de fluxo (vermelha em ambas).....	77
Figura 38 - Primeiros testes com LASCA, imagem do papel seda sendo deslocado. O ruído de fundo atrapalhou o algoritmo.	78
Figura 39 - Imagem gerada pelo software de LASCA para o deslocamento do papel seda, porém com uma limiarização anterior ao processamento.	79
Figura 40 - Quatro resultados do LASCA com limiarização para o papel seda. A) 10 $\mu\text{m/s}$. B) 50 $\mu\text{m/s}$. C) 100 $\mu\text{m/s}$. D) 150 $\mu\text{m/s}$	80
Figura 41 - Quatro resultados do LASCA com limiarização para o leite.....	81
Figura 42 - Gráfico demonstrando a relação entre o valor para o LASCA (u.a.) e fluxo ($\mu\text{l/min}$).	82
Figura 43 - Ilustração do algoritmo de autocorrelação desenvolvido.	84
Figura 44 - Quatro resultados do software de autocorrelação para o papel seda. A) 10 $\mu\text{m/s}$. B) 50 $\mu\text{m/s}$. C) 100 $\mu\text{m/s}$. D) 150 $\mu\text{m/s}$	86
Figura 45 - Quatro resultados do software de autocorrelação para o leite.....	86
Figura 46 - Gráfico demonstrando a relação entre autocorrelação (u.a.) e fluxo ($\mu\text{l/min}$).	87

Figura 47 - Arranjo de OCT montado para o projeto. A fonte de laser fornece duas saídas para o interferômetro, uma com o laser swept source e outra com o laser guia. LF = Lentes Focalizadoras.	90
Figura 48 - Algoritmo de autocorrelação para o sinal de OCT. A figura demonstra o vetor W sendo montado através de diversas iterações.....	94
Figura 49 - Gráfico mostrando o valor de autocorrelação em função do atraso temporal (τ) para o leite integral sob fluxo volumétrico de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$	95
Figura 50 - Densidade de Espectro de Potência para o fluxo volumétrico de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$	96
Figura 51 - Gráfico mostrando o valor de autocorrelação em função do atraso temporal (τ) para o leite integral sob diversos fluxos volumétricos.	97
Figura 52 - Tempo de decorrelação calculado para diferentes fluxos volumétricos.	98
Figura 53 - Densidade de espectro de potência para o fluxo volumétrico de 12 $\mu\text{l}/\text{min}$	99
Figura 54 - Tempo de decorrelação calculado para os fluxos de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ e 50 $\mu\text{l}/\text{min}$	100
Figura 55 - Densidade de espectro de potência para o fluxo volumétrico de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$	101
Figura 56 - Gráfico mostrando o valor de autocorrelação em função do atraso temporal para a solução de microesferas de poliestireno nas temperaturas de 5°C e 24°C.	105
Figura 57 - Tempo de decorrelação calculado para as microesferas de poliestireno para as temperaturas de 5°C e 24°C.	105
Figura 58 - Tempo de decorrelação calculado para diferentes concentrações. .	108
Figura 59 - Imagem em cores falsas dos tempos de decorrelação calculados ao longo do microcanal para o fluxo volumétrico de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$	110
Figura 60 - Gráfico tridimensional obtido a partir dos tempos de decorrelação calculados para o fluxo volumétrico de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$	111

1. INTRODUÇÃO

A Tomografia por Coerência Óptica, ou OCT (Optical Coherence Tomography), é uma técnica de interferometria de baixa coerência, capaz de produzir imagens de corte transversal de meios espalhadores, desenvolvida por Huang *et al.* em um grupo liderado por James G. Fujimoto¹, no ano de 1991. Tem suas raízes em interferometria de luz branca, estudada desde o começo do século XX², e aplicada em técnicas de detecção remota, como Reflectometria Óptica no Domínio Coerente (OCDR - Optical Coherence-Domain Reflectometry)³, anteriores ao OCT. Estas técnicas são utilizadas em aplicações industriais, em especial para testes e identificação de defeitos em fibras ópticas^{4; 5}, mas aplicações biológicas não demoraram a surgir⁶, tornando-as importantes ferramentas de auxílio.

O OCT, deste modo, também gerou interesse à área biológica, e nesta teve suas primeiras aplicações⁷, caracterizando estruturas do olho humano através das imagens geradas. Sendo uma técnica de alta resolução, sem contato, não-invasiva e sem utilizar radiação ionizante, este interesse é justificado, especialmente porque tais características possibilitam obtenção de imagens *in vivo*, o que não demorou a ocorrer^{8; 9; 10}. A resolução do OCT, aliás, coloca a técnica em uma região muito oportuna em relação às demais modalidades de diagnóstico por imagem, preenchendo uma lacuna existente na relação entre profundidade de penetração e resolução, como demonstrado pela Figura 1.

Figura 1 - Gráfico comparativo entre técnicas de diagnóstico por imagem, a partir da relação Profundidade de Penetração X Resolução (adaptado de 11).

Desde então, as aplicações e estudos sobre OCT vêm crescendo e, assim, aprimoramentos e adaptações da técnica começaram a surgir na literatura. Isto permitiu, além de um avanço para aplicações biológicas, uma presença forte do OCT na área de microfluídica^{12; 13}. Ainda, a Tomografia por Coerência Óptica se difundiu por diversas outras áreas, encontrando aplicações, por exemplo, na indústria alimentícia¹⁴ e de materiais¹⁵ e até em restauração e conservação de pinturas e outras obras de arte¹⁶. É possível ter uma idéia do crescimento da técnica de OCT, e da importância que esta adquiriu, a partir da contagem de publicações relacionadas à palavra-chave "Optical Coherence Tomography" ao decorrer dos anos, como demonstrado na Figura 2, a partir da base de dados *Web of Science*. Utilizando a mesma base de dados, vale também ressaltar a posição do Brasil no cenário mundial de publicações com a mesma palavra chave, figurando entre os 15 primeiros países com maior número de publicações relacionadas a OCT, como pode ser visto na Figura 3.

Algumas das adaptações do OCT são, atualmente, bem estabelecidas e amplamente utilizadas, tais como o Doppler OCT (D-OCT)^{17; 18}, que consegue quantificar fluxos em amostras, e o *Speckle Variance* OCT (SV-OCT)¹⁹, capaz de montar mapas bastante detalhados de áreas com fluxo no interior da amostra. Contudo, o SV-OCT não é capaz de quantificar o fluxo imageado, enquanto o Doppler-OCT, que consegue esta informação, não é sensível a fluxos

perpendiculares ao feixe de varredura. Outras técnicas não baseadas em OCT, como o LASCA (Laser speckle Contrast analysis)²⁰, conseguem quantificar a velocidade de fluxo com base no padrão de speckle, que é a base do SV-OCT. Isto sugere uma possibilidade em extrair informações quantitativas sobre os fluxos presentes em imagens de OCT através deste padrão de speckle, o que cobriria a limitação na técnica de SV-OCT. E o padrão de speckle não apresenta dependência do ângulo de imageamento, o que é uma vantagem sobre a técnica baseada no efeito Doppler. Este contexto é a problematização e motivação do presente trabalho.

Os objetivos do trabalho serão dispostos no capítulo 2, seguidos por uma introdução aos fundamentos teóricos. Nestes fundamentos será abordada a técnica de OCT, que é a essência deste trabalho, e o speckle, base dos estudos e análises realizados. No quarto capítulo serão comentados os materiais e métodos. No quinto capítulo estão descritos os resultados obtidos através dos sistemas de OCT comerciais do laboratório, separados em subseções que abordam os diferentes testes e análises realizados. No capítulo seguinte é abordada a técnica de autocorrelação em sinal de OCT e é comentado o sistema de OCT desenvolvido, com os resultados obtidos sendo discutidos. Por fim, serão feitas as conclusões gerais para o trabalho aqui descrito.

Figura 2 - Publicações relacionadas à palavra-chave "Optical Coherence Tomography" por ano de publicação. Nota-se o crescimento contínuo e exponencial. Base de dados: Web of Science. Dados de Fevereiro/2015.

Figura 3 - Publicações relacionadas à palavra-chave "Optical Coherence Tomography" por país. Destaque para a posição do Brasil. Base de dados: Web of Science. Dados de Fevereiro/2015.

2. OBJETIVOS

O trabalho aqui apresentado visa utilizar o padrão Speckle presente em imagens de Tomografia por Coerência Óptica para identificar e quantificar regiões com fluxos dentro de amostras e, com esta técnica, caracterizar circuitos microfluídicos. O trabalho objetiva, ainda, demonstrar o OCT como uma ferramenta conveniente no estudo de aplicações de microfluídica.

2.1 Objetivos Específicos

- 2.1.1 Estudar a técnica de OCT e entender seu funcionamento;
- 2.1.2 Estudar a origem e estatísticas do padrão de speckle, para elaboração de algoritmos de análise;
- 2.1.3 Caracterizar as dimensões físicas de microcanais, como a largura e a profundidade, importantes parâmetros para diversas aplicações em micro-reatores. Como consequência desta caracterização física dimensional, pode-se verificar a uniformidade dos microcanais gerados pelo processamento a laser. Esta informação é importante como parâmetro de retroalimentação no processo de desenvolvimento desse tipo de dispositivo;
- 2.1.4 Determinar “in silico” a aplicabilidade dos algoritmos de análise de speckle para as imagens de OCT simuladas, e seus limites de detecção;
- 2.1.5 Aplicar os algoritmos desenvolvidos para análise do padrão de speckle nas imagens de OCT reais, para a caracterização da dinâmica dos fluídos em microcanais como, por exemplo, a velocidade e regime de fluxo.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Para melhor entendimento deste trabalho, apresenta-se a seguir uma breve introdução a tópicos essenciais ao desenvolvimento do projeto proposto.

3.1 Tomografia Por Coerência Óptica - OCT

O sistema de OCT geralmente tem sua montagem baseada em um interferômetro de Michelson², e tira proveito da baixa coerência temporal óptica de uma fonte de luz. Pode-se entender esta coerência óptica imaginando um arranjo como na Figura 4. Neste caso utiliza-se uma fonte de luz com baixa coerência temporal, e o caminho óptico percorrido pelo feixe em um dos braços, que é móvel, (doravante chamado Braço de Teste) não é igual ao caminho do braço fixo (Braço de Referência) e a diferença total entre ambos, Δs , é igual a duas vezes o incremento d , na Figura 4, uma vez que a luz o percorre duas vezes - primeiro em direção ao espelho e, depois, de volta ao divisor.

Figura 4 - Interferômetro com o espelho do Braço de Teste móvel.

Seguindo o experimento, conforme Δs aumenta, o padrão de franjas de interferência que pode ser visualizado na tela, resultante da recombinação coerente dos feixes de luz no divisor (áreas escuras e claras intercaladas, originadas por interferências destrutivas e construtivas), se torna menos nítido, até um Δs crítico, doravante denominado lc , em que o padrão desaparece. O que ocorre é que a luz que chega ao divisor oriunda do espelho de Referência interage com o outro feixe que está "atrasado" no tempo, vindo do Braço de Teste. Este "atraso" se deve ao fato do caminho do Braço de Teste ser maior, fazendo com que a luz demore mais a percorrê-lo. A habilidade da luz de produzir padrões de interferência está relacionada com a Coerência Óptica, ou seja, a relação de fase (no tempo ou espaço) entre os campos elétricos das ondas interagindo. Neste contexto, estamos tratando da coerência óptica temporal. Como o experimento visa demonstrar, passado um "atraso" temporal crítico entre os dois feixes no divisor, estes não mais conseguem produzir padrões de interferência entre si. Podemos definir, portanto, um limite temporal, chamado *Tempo de Coerência*, para que a interferência ocorra, e este limite pode ser relacionado com lc como segue:

$$\text{Tempo de Coerência} = \frac{\Delta s}{c} \quad (1)$$

Onde c é a velocidade da luz no meio. O valor de lc , chamado de comprimento de coerência, pode ser obtido por:

$$lc = \frac{2 \ln 2 \lambda_0^2}{\pi n \Delta \lambda} \quad (2)$$

Onde n é o índice de refração do meio, λ_0 é o comprimento de onda central da fonte e $\Delta \lambda$ é a largura espectral da fonte. O Tempo de Coerência de uma onda de luz, então, depende da fonte de luz que a gerou, sendo maior para fontes com banda espectral estreita (mais próximas de uma fonte monocromática) e menor para fontes de luz com larga banda espectral (mais próximas de uma fonte de luz branca).

3.1.1 Funcionamento da Técnica

Tomando o interferômetro de Michelson como base, pode-se descrever o funcionamento da técnica de Tomografia por Coerência Óptica, fazendo algumas alterações nos elementos de tal interferômetro, como ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Montagem esquemática de um OCT.

Notavelmente, a fonte de luz agora é especificada como uma fonte de grande banda espectral; o espelho móvel foi, novamente, fixado e substituído pela amostra a ser estudada, e é chamado de Braço de Amostra; e, por fim, a tela de visualização foi substituída por um detector, para que os sinais possam ser capturados e, posteriormente, processados para gerar uma imagem.

Assim como no interferômetro, o feixe de luz passa pelo divisor e uma parte é direcionada ao Braço de Referência, onde o feixe é refletido pelo espelho e retorna ao divisor. No Braço de Amostra a luz incide sobre o objeto de estudo em um determinado ponto P, e parte dela é retroespalhada, voltando pelo caminho original até o divisor. Os feixes são, então, recombinados e direcionados ao detector.

O OCT é baseado na ocorrência de interferência entre estes dois feixes, coletando esta informação através do detector do sistema, gerando um interferograma, que é relacionado ao ponto P que foi iluminado na amostra. O feixe do Braço de Amostra é deslocado para um ponto imediatamente vizinho a P, e mais um interferograma é coletado. Este processo é repetido para um número designado de pontos adjacentes. Cada interferograma é chamado de *A-scan*. A Figura 6 ilustra o processo. Ao final, todos os *A-Scans* são combinados, analisados e convertidos para uma imagem de cores falsas, com cada *A-Scan* representando uma coluna da imagem. A imagem final é denominada *B-Scan*. Estas são imagens típicas de corte transversal do OCT, e um exemplo está na Figura 7.

Figura 6 - Aquisição de diversos A-Scans adjacentes.

Figura 7 - Imagem da palma da mão gerada pela técnica de OCT.

Contudo, existem duas abordagens principais distintas de OCT, que obtêm estes *A-scans* de maneiras diferentes. Uma destas técnicas se baseia no domínio temporal, e é conhecida por TD-OCT (Time Domain Optical Coherence Tomography), enquanto a outra tem base no domínio de frequências e é denominada de FD-OCT (Frequency Domain Optical Coherence Tomography).

Considere-se a primeira destas modalidades, o TD-OCT. No caso, o tempo de coerência será menor quanto maior for a largura de banda da fonte de luz, o que, de acordo com a equação (1) e considerando que c é constante no meio, implica que Δs também será pequeno. Isso significa que, para ocorrer interferência, os caminhos ópticos percorridos pela luz nos Braços de Amostra e Referência devem ter praticamente o mesmo comprimento, ou seja a diferença entre eles deve ser menor que o comprimento de coerência.

Tendo em mente que a luz que retorna do Braço de Amostra é retroespalhada por alguma região na superfície ou dentro do objeto de estudo, dependendo da profundidade em que tal retroespalhamento ocorreu, o caminho óptico resultante poderá ser maior ou menor. Neste contexto, somente a região (profundidade) em que a distância de caminho óptico coincida com aquela do Braço de Referência produzirá padrões de interferência significativos. Consequentemente, o interferograma resultante dependerá apenas da contribuição desta região. Deste modo, obtém-se o perfil de espalhamento de uma determinada profundidade sob um determinado ponto da amostra, como exemplificado na Figura 8 – (A). É interessante, portanto, realizar o mesmo procedimento para outras regiões, tornando-se possível combinar os dados em um único interferograma, que mostrará o perfil de espalhamento em diversas profundidades sob aquele determinado ponto.

Uma vez que a região que produz interferência é determinada pela distância de caminho óptico do Braço de Referência, caso esta distância seja alterada, também é alterada a profundidade da amostra que contribui para o interferograma. Assim, utilizando-se um espelho móvel no Braço de Referência, é possível alterar sua distância ao divisor de feixes de forma conhecida, fazendo uma varredura controlada por diversas profundidades da amostra estudada. Combina-se os dados em um único *A-scan*, que alcançará o objetivo de conter a informação de várias profundidades sob um ponto, como é demonstrado na Figura 8 – (B). Repetindo o procedimento para os pontos adjacentes, pode-se

reconstruir o perfil de espalhamento para um corte transversal da amostra, que posteriormente é convertido para uma imagem de cores falsas como a da Figura 7. De maneira simplificada, é este o procedimento de formação de imagens de um TD-OCT.

Figura 8 - Técnica de TD-OCT. A) O braço de referência seleciona apenas uma região da amostra e um interferograma é gerado. B) O braço de referência se move, varrendo diversas profundidades da amostra, e os interferogramas são combinados em um único A-Scan.

Aborda-se agora a outra modalidade, FD-OCT, que faz uso da fonte de larga banda espectral de uma maneira diferente. Utiliza-se novamente o interferômetro de Michelson. Porém, ao invés da tela de visualização, é colocada uma grade de difração, um componente óptico que consegue separar a luz em suas componentes espectrais. Como a fonte é de grande banda espectral, é composta por diversos comprimentos de onda diferentes e é, consequentemente, decomposta em diversas faixas espectrais pela grade de difração. Esta grade de difração direciona os feixes resultantes para um arranjo de detectores, onde cada detector no arranjo é sensibilizado por uma componente espectral diferente. Esta montagem pode ser visualizada na Figura 9.

Figura 9 - Montagem básica de um FD-OCT.

Neste caso, o caminho óptico para ambos os espelhos é o mesmo. Quando os feixes se recombinaem no divisor, ocorrem interferências construtivas e destrutivas em todos os comprimentos de onda. Todos os detectores do arranjo, portanto, serão sensibilizados por estas interferências. Podemos montar um espectro das intensidades detectadas por todos os detectores, em função do comprimento de onda, como na Figura 10 - B). É possível notar que o resultado é semelhante ao espectro da fonte luminosa, Figura 10 - A), uma vez que a intensidade registrada por cada detector depende apenas da intensidade do comprimento de onda correspondente no espectro da fonte.

Agora, considera-se que o espelho de Teste tem um caminho óptico maior que o de Referência. O espectro das intensidades dos detectores, neste caso, possui variações, causando franjas espectrais, como na Figura 10 - C). A explicação é que, com a diferença de caminho óptico, alguns comprimentos de onda interferem apenas parcialmente. Como pode ser percebido pela figura, as flutuações na intensidade apresentam uma variação periódica - uma frequência - bem definida. Esta frequência aumenta com o aumento da diferença de caminhos ópticos. Isso sugere que esta frequência apresentada ao longo dos comprimentos

de onda carrega informação sobre o caminho óptico do Braço de Teste. Caso o espelho seja substituído por uma amostra, esta informação indica a profundidade em que ocorreu o retroespalhamento. Esta é a ideia por trás do FD-OCT.

Figura 10 - Espectros detectados no FD-OCT mostrados como Intensidade (unidade arbitrária) em função do número de onda K (m^{-1}). A) Espectro da fonte luminosa. B) Espectro detectado pelo arranjo quando o caminho óptico dos espelhos é o mesmo. C) Espectro detectado com uma pequena diferença de caminhos ópticos.

Para finalizar, ressalta-se que as diferentes profundidades e camadas da amostra retroespalham parte da luz, enquanto outra parte é transmitida para regiões mais profundas. Assim, a luz que retorna ao divisor de feixes é resultado da contribuição das diversas profundidades da amostra, e o espectro final do arranjo de detectores é a soma de todas as frequências resultantes das interferências. Portanto, este espectro carrega informação de perfil de espalhamento de todas as camadas da amostra, não sendo necessária uma varredura por diversas profundidades, e os Braços de Referência e de Amostra podem ser fixos. Um único *A-Scan* é obtido para cada ponto na amostra. Contudo, ainda é necessária a varredura por pontos adjacentes para gerar uma imagem de corte transversal.

3.1.2 Formalismo Matemático

Para posterior processamento dos sinais e formação de uma imagem tomográfica, é necessário ter conhecimento dos fatores que afetam a intensidade registrada pelo detector. Para tanto, podemos definir os campos elétricos do Braço de Referência, E_r , e do Braço de Amostra, E_s , como segue:

$$E_r(k) = \left(\frac{1}{2}\right) E_{fo}(k) R_r e^{i(2kx_0)} \quad (3)$$

$$E_s(k) = \left(\frac{1}{2}\right) E_{fo}(k) \int_0^{\infty} R_s(x_s) e^{i(2k n(x_s) x_s)} dx_s \quad (4)$$

E_{fo} é o campo elétrico inicial da fonte de luz; ambos fatores R são coeficientes relacionados à capacidade refletiva do material, sendo 0 para total transmissão e 1 para total reflexão; k é o número de onda, que é inversamente proporcional ao comprimento de onda λ ($k = \frac{2\pi}{\lambda}$); x_0 é a posição do espelho de referência e x_s é a posição da região de retroespalhamento da amostra; n é o índice de refração em função de x_s . Como pode ser visto pela equação de E_s , o campo resultante deste Braço do interferômetro é composto pela soma de infinitesimais campos de diferentes profundidades (diferentes x_s) da amostra. O fator dois no expoente se deve à ida e volta percorrida no caminho óptico, enquanto o fator meio aplicado a E_{fo} está associado ao fato de que o divisor 50:50 divide o feixe inicial em dois, cada qual com metade do campo elétrico inicial.

O campo elétrico no detector E_d será resultado da soma do campo destes dois Braços, e temos:

$$\begin{aligned} E_d(k) &= E_r(k) + E_s(k) \\ E_d(k) &= \left(\frac{1}{2}\right) E_{fo}(k) R_r e^{i(2kx_0)} \\ &\quad + \left(\frac{1}{2}\right) E_{fo}(k) \int_0^{\infty} R_s(x_s) e^{i(2k n(x_s) x_s)} dx_s \end{aligned} \quad (5)$$

Sabendo, ainda, que a intensidade no detector I_d é proporcional ao módulo do campo elétrico E_d ao quadrado, define-se:

$$I_d \propto |E_d(k)|^2 = \left| \left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) R_r e^{i(2kx_0)} + \left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \int_0^\infty R_s(x_s) e^{i(2kn(x_s)x_s)} dx_s \right|^2 \quad (6)$$

Tendo em mente que:

$$\begin{aligned} |E_d(k)|^2 &= E_d(k) \cdot E_d(k)^* = \\ &= \left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) R_r e^{i(2kx_0)} + \left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \int_0^\infty R_s(x_s) e^{i(2kn(x_s)x_s)} dx_s \right) \cdot \\ &\quad \left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) R_r e^{-i(2kx_0)} + \left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \int_0^\infty R_s(x_s) e^{-i(2kn(x_s)x_s)} dx_s \right) \end{aligned} \quad (7)$$

É possível interpretar a equação (7) de maneira simplificada:

$$(\alpha + \beta) \cdot (\alpha^* + \beta^*) \quad (8)$$

E então deduzir:

$$\alpha \cdot \alpha^* = \left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) R_r \right)^2 \quad (9)$$

$$\alpha \cdot \beta^* = \left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \right)^2 R_r \int_0^\infty R_s(x_s) e^{-i(2kn(x_s)x_s - 2kx_0)} dx_s \quad (10)$$

$$\beta \cdot \alpha^* = \left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \right)^2 R_r \int_0^\infty R_s(x_s) e^{i(2kn(x_s)x_s - 2kx_0)} dx_s \quad (11)$$

$$\beta \cdot \beta^* = \left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \right)^2 \int_0^\infty \int_0^\infty R_s(x_s) R_s(x'_s) e^{i(2kn(x_s)x_s - 2kn(x'_s)x'_s)} dx_s dx'_s \quad (12)$$

Nota-se que as Equações (10) e (11) são idênticas, exceto pelo sinal do expoente. É possível combiná-las em uma única equação:

$$\left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \right)^2 R_r \int_0^\infty R_s(x_s) (e^{i(2kn(x_s)x_s - 2kx_0)} + e^{-i(2kn(x_s)x_s - 2kx_0)}) dx_s \quad (13)$$

A partir da fórmula de Euler:

$$\cos x = \frac{e^{ix} + e^{-ix}}{2} \quad (14)$$

Simplifica-se a equação (13) ainda mais, obtendo:

$$\begin{aligned} & \left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \right)^2 R_r \int_0^\infty R_s(x_s) 2 \left(\frac{e^{i(2kn(x_s)x_s - 2kx_0)} + e^{-i(2kn(x_s)x_s - 2kx_0)}}{2} \right) dx_s \\ &= \\ &= \left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \right)^2 2 R_r \int_0^\infty R_s(x_s) \cos(2kn(x_s)x_s - 2kx_0) dx_s \end{aligned} \quad (15)$$

Finalmente, combinando as equações (9), (12) e (15), obtém-se a equação para a intensidade no detector:

$$I_d(k) \propto \left(\left(\frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \right)^2 \left[R_r^2 + \int_0^\infty \int_0^\infty R_s(x_s) R_s(x'_s) e^{i(2kn(x_s)x_s - 2kn(x'_s)x'_s)} dx_s dx'_s + 2 R_r \int_0^\infty R_s(x_s) \cos(2k n(x_s) x_s - 2kx_0) dx_s \right] \quad (16)$$

Vale ressaltar que este modelo para a intensidade no detector é dado em função do espaço de número de onda k (1/m). Se for desejado obter a

informação de distâncias (m), se faz necessária a transformada de Fourier do modelo, para correlacionar ambos os espaços.

O primeiro termo dentro dos colchetes na (16) é uma constante dependente do braço de referência, e apresenta-se como uma corrente contínua no sinal obtido pelo OCT. O segundo termo apresenta a correlação mútua entre os diversos feixes retroespalhados por diferentes profundidades da amostra. O terceiro termo é o responsável pelas oscilações de frequências bem definidas, como observado na Figura 10 - C), e representa o retroespalhamento em função da profundidade da amostra. Usualmente, é deste termo que se obtém as informações necessárias para a geração de um A-Scan. Contudo, a utilização do segundo termo, com as interferências mútuas entre os retroespalhamentos, para a aquisição de imagens de OCT já foi demonstrada²¹.

3.2 Speckle

Speckle é um fenômeno óptico observado a partir de diversas superfícies quando iluminadas por luz coerente. O speckle se apresenta como um padrão granular de alto contraste percebido por um observador nas áreas iluminadas e qualquer deslocamento desta superfícier resulta em uma mudança no padrão deste ruído²². Um exemplo do padrão de speckle está na Figura 11.

Estudos específicos para este fenômeno começaram pouco após as primeiras aplicações com laser e, a princípio, o padrão de speckle era tratado apenas como um fator deletério, uma vez que degradava a resolução e qualidade de experimentos. Tais estudos permitiram descobrir que o ruído era oriundo da interferência da luz espalhada de diversos locais da superfície iluminada, contanto que esta superfície seja rugosa. No entanto, como boa parte das superfícies, na escala de um comprimento de onda óptica, são rugosas²³, o speckle não é uma ocorrência rara.

Figura 11 - Padrão de speckle típico.

Consideremos um alvo rugoso iluminado por radiação coerente. O padrão speckle ocorre em todo espaço entre o alvo iluminado e um plano de observação. Assim existem muitas formas diferentes de observar o speckle. Duas são mais comuns. Uma, conhecida como Speckle objetivo ou de campo-distante, consiste em observar a radiação espalhada pelo alvo em uma tela (ou sensor). Outra, conhecida como speckle subjetivo ou speckle de imagem, ocorre quando o alvo iluminado é observado por imagens formadas por lentes²⁴. Em ambos os casos o brilho de cada speckle é resultante da interferência da radiação espalhada pelo alvo. Mas a região do alvo que influencia o brilho de cada grão de speckle depende do modo de observação.

3.2.1 Estatísticas de Primeira Ordem

Não obstante estes fatos, o speckle é ainda um fenômeno aleatório, mas pode ser descrito estatisticamente. Nota-se, porém, que independente em qual dos cenários se observa o speckle, a intensidade final em qualquer ponto do padrão consiste da contribuição de diversos espalhamentos em diferentes pontos da superfície sendo iluminada. É um processo, portanto, constituído por diversas partes individuais aleatórias, e pode ser comparado ao problema clássico de

caminho aleatório^{25; 26}, como indicado por Goodman, que desenvolveu uma modelagem estatística para o speckle²⁷. Nesta modelagem, a amplitude A do fasor do campo elétrico resultante para um determinado ponto no padrão de speckle é uma função do espaço (x,y,z) com valor complexo, e é representada pela somatória das contribuições de N fasores individuais $(\sqrt{N})^{-1} a_k(x, y, z)$, $k = 1, 2, \dots, N$ como segue:

$$A(x, y, z) = \sum_{k=1}^N \frac{1}{\sqrt{N}} a_k(x, y, z) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| e^{i\phi_k} \quad (17)$$

Assumindo que estes fasores tenham: (I) amplitudes e fases estatisticamente independentes entre si e independentes das amplitudes e fases dos demais fasores; e (II) as fases são uniformemente distribuídas no intervalo $(-\pi, \pi)$; é possível demonstrar que as partes real $A^{(r)}$ e imaginária $A^{(i)}$ da amplitude A não são correlacionadas, possuem média zero e variâncias idênticas. Então, se o número N de fasores individuais for grande, $A^{(r)}$ e $A^{(i)}$ podem ser expressas como somas de um grande número de variáveis aleatórias independentes. Segue que, pelo teorema do limite central, quando $N \rightarrow \infty$, $A^{(r)}$ e $A^{(i)}$ são assintoticamente Gaussianas e sua função densidade de probabilidade conjunta se aproxima de:

$$P_{r,i}(A^{(r)}, A^{(i)}) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left\{-\frac{[A^{(r)}]^2 + [A^{(i)}]^2}{2\sigma^2}\right\} \quad (18)$$

Onde:

$$\sigma^2 = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |a_k|^2 \rangle}{2} \quad (19)$$

Este tipo de função é conhecida como função de densidade Gaussiana circular. Contudo, para o presente trabalho, a estatística que se refere à intensidade do speckle é de maior importância. A relação entre a intensidade I e fase θ resultantes das contribuições com as partes imaginária e real da amplitude complexa do fasor é, então, expressa:

$$\begin{aligned} A^{(r)} &= \sqrt{I} \cos \theta \\ A^{(i)} &= \sqrt{I} \sin \theta \end{aligned} \quad (20)$$

O que equivale:

$$\begin{aligned} I &= [A^{(r)}]^2 + [A^{(i)}]^2 \\ \theta &= \tan^{-1} \frac{A^{(i)}}{A^{(r)}} \end{aligned} \quad (21)$$

A probabilidade conjunta de I e θ em um ponto é dada em função da probabilidade de $A^{(r)}$ e $A^{(i)}$:

$$P_{I,\theta}(I, \theta) = P_{r,i}(\sqrt{I} \cos \theta, \sqrt{I} \sin \theta) \|J\| \quad (22)$$

Sendo $\|J\|$ o módulo matriz Jacobiana para transformação de variáveis:

$$\begin{aligned} \|J\| &= \left\| \begin{bmatrix} \frac{\partial A^{(r)}}{\partial I} & \frac{\partial A^{(r)}}{\partial \theta} \\ \frac{\partial A^{(i)}}{\partial I} & \frac{\partial A^{(i)}}{\partial \theta} \end{bmatrix} \right\| = \left\| \begin{bmatrix} \frac{\cos \theta}{2\sqrt{I}} & -\sqrt{I} \sin \theta \\ \frac{\sin \theta}{2\sqrt{I}} & \sqrt{I} \cos \theta \end{bmatrix} \right\| = \\ &= \left(\frac{\cos \theta}{2\sqrt{I}} \cdot \sqrt{I} \cos \theta \right) - \left(\frac{\sin \theta}{2\sqrt{I}} \cdot -\sqrt{I} \sin \theta \right) = \\ &= \frac{\cos^2 \theta}{2} - \left(-\frac{\sin^2 \theta}{2} \right) = \frac{1}{2} (\cos^2 \theta + \sin^2 \theta) = \frac{1}{2} \\ \therefore \|J\| &= \frac{1}{2} \end{aligned} \quad (23)$$

Substituindo as equações (18) e (23) em (22), obtemos a probabilidade de I e θ expressa de outra forma:

$$P_{I,\theta}(I, \theta) = \begin{cases} \frac{1}{4\pi\sigma^2} \exp\left(-\frac{I}{2\sigma^2}\right), & I \geq 0 \\ & -\pi \leq \theta < \pi \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (24)$$

Isto possibilita obter a função densidade de probabilidade marginal para cada uma das duas variáveis em questão:

$$P_I(I) = \int_{-\pi}^{\pi} P_{I,\theta}(I, \theta) d\theta =$$

$$P_I(I) = \begin{cases} \frac{1}{2\sigma^2} \exp\left(-\frac{I}{2\sigma^2}\right), & I \geq 0 \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (25)$$

$$P_I(\theta) = \int_0^{\infty} P_{I,\theta}(I, \theta) dI =$$

$$P_I(\theta) = \begin{cases} \frac{1}{2\pi}, & -\pi \leq \theta < \pi \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (26)$$

Percebe-se que as fases são distribuídas de maneira uniforme por todo o intervalo de $-\pi$ a π . A intensidade, no entanto, segue uma probabilidade exponencial negativa. É possível, agora, avaliar mais a fundo as propriedades da Intensidade. Seu enésimo momento $\langle I^n \rangle$ é dado por:

$$\langle I^n \rangle = n! (2\sigma^2)^n = n! \langle I \rangle^n \quad (27)$$

Com isto, e observando-se que o desvio padrão da intensidade $\sigma_i = 2\sigma^2$, demonstra-se a relação existente entre σ_i e $\langle I \rangle$:

$$\langle I^2 \rangle = 8\sigma^4 = 2\langle I \rangle^2$$

$$\sigma_i^2 = 4\sigma^4 = \frac{\langle I^2 \rangle}{2} = \langle I \rangle^2$$

$$\sigma_i = \langle I \rangle \quad (28)$$

Ou seja, o desvio padrão da intensidade é igual ao seu valor médio, o que é uma propriedade de distribuições exponenciais. Isto torna a razão entre σ_i e $\langle I \rangle$ uma medida interessante para o contraste do speckle, visto que o valor desta

razão varia de 0 a 1: é igual a um quando o alvo é estático e tende a zero quando o alvo está em movimento (detalhes deste último caso mais adiante). E, de fato, este é um valor amplamente utilizado para cálculo do contraste do speckle^{20; 28; 29;}

³⁰. Assim, define-se o contraste K do speckle:

$$K = \frac{\sigma_i}{\langle I \rangle} \quad (29)$$

3.2.2 Speckle como fonte de informação

Com o avanço nos estudos de speckle, foi possível que várias aplicações se adaptassem para eliminar este tipo de ruído. Contudo, outras possibilidades foram abertas, para que o speckle se tornasse fonte de informação, e não mais um deletério.

Como comentado anteriormente, o padrão de speckle muda quando deslocamos a superfície que o produz. Mais notável ainda é o fato de que para pequenos deslocamentos de objetos sólidos, os speckles se movem juntamente com o objeto, e ambos são correlacionados³¹. Contudo, se houver um grande deslocamento, ou se este deslocamento for causado por vários espalhadores individuais, há uma decorrelação, e a intensidade observada para o speckle sofre variações no tempo. Esta é a causa do chamado *time-varying* speckle (speckle variante no tempo). Essas flutuações na intensidade estão, normalmente, associadas com a velocidade de movimento destes espalhadores que produzem o speckle. Por esta razão, são as estatísticas temporais do *time-varying* speckle que, por muitas vezes, são utilizadas em aplicações que tiram proveito do speckle como informação, principalmente quando são associadas a dinâmica de fluxos^{32; 33; 34; 35}.

No entanto, as estatísticas espaciais de um padrão de speckle integrado no tempo também possuem utilidade. Este padrão carrega consigo as informações temporais presentes no speckle durante seu tempo de integração. Algumas técnicas exploraram este potencial, em especial a técnica apresentada, em 1981, por Fercher e Briers chamada *Single-Exposure Speckle Photography* (Fotografia de Speckle de Exposição Simples)³⁶.

Esta abordagem tem base em um sistema com uma câmera que fotografa o objeto de estudo iluminado sob uma luz laser. A câmera possui um tempo de exposição (integração) determinado e controlado. No resultado final da fotografia, é notado o padrão de speckle resultante da iluminação por uma fonte coerente. Contudo, regiões do objeto que contenham movimento (em especial de fluxo), fazem com que o padrão observado pareça "borrado", graças às flutuações na intensidade do *time-varying* speckle. O quão "borradas" estas regiões aparentam depende do tempo de exposição da câmera e, mais importante, da velocidade do movimento dos espalhadores. Contudo, para conseguir obter esta informação de velocidade, é necessário quantificar o "borrado" na imagem. Tendo em mente que uma imagem borrada nada mais é do que uma imagem com baixo contraste, e que a imagem em questão é composta por speckles, é possível utilizar a equação (29) como base para quantificar o contraste em diferentes pontos da fotografia.

Para relacionar o valor de contraste obtido com a flutuação dos speckles ao longo do tempo de integração Fercher e Briers fazem algumas suposições. A primeira delas assume que o movimento dos centros espalhadores nas regiões de fluxo é aleatório. Para deslocamentos aleatórios, o padrão Speckle descorrelaciona com o tempo, mas não é deslocado pelo movimento. Segundo os autores, esta assunção habilita usar resultados anteriores (estatística de segunda-ordem de um padrão de speckle estático) tais que a variância espacial em um padrão speckle integrado no tempo é dada por³⁶:

$$\sigma_s^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T C_t^{(2)}(\tau) d\tau \quad (30)$$

Onde T é o tempo de integração da câmera.

Neste caso, $C_t^{(2)}$ é a autocovariância da flutuação de intensidade de um speckle isolado:

$$C_t^{(2)}(\tau) = \langle (I(t) - \langle I \rangle_t)(I(t + \tau) - \langle I \rangle_t) \rangle_t \quad (31)$$

Em que $I(t)$ é a intensidade no tempo t ; τ é um intervalo temporal; e $\langle \rangle_t$ representa a média temporal.

Define-se, agora, a autocovariância normalizada:

$$c_t^{(2)}(\tau) = C_t^{(2)}(\tau) / \langle I \rangle_t^2 \quad (32)$$

E é possível relacioná-la com a autocorrelação normalizada de intensidades, $g_t^{(2)}(\tau)$:

$$g_t^{(2)}(\tau) = 1 + c_t^{(2)}(\tau) \quad (33)$$

Sendo $g_t^{(2)}(\tau)$ definida como:

$$g_t^{(2)}(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle_t / \langle I \rangle_t^2 \quad (34)$$

Note-se que a autocorrelação de intensidades é, na verdade, a autocorrelação de segunda ordem do campo elétrico na câmera. Fercher e Briers assumem que a relação de Siegert é verdadeira para a flutuação dos speckles, ou seja:

$$g_t^{(2)}(\tau) = 1 + \left| g_t^{(1)}(\tau) \right|^2 \quad (35)$$

Sendo $g_t^{(1)}(\tau)$ autocorrelação normalizada de primeira ordem do campo elétrico. A próxima suposição dos dois autores é a de que esta autocorrelação pode ser aproximada por uma exponencial negativa como segue:

$$g_t^{(1)}(\tau) = e^{\left(-\frac{\tau}{\tau_c}\right)} \quad (36)$$

Onde τ_c representa o tempo de decorrelação das flutuações de intensidade.

Com estas definições, é possível reanalisar as equações, começando com as equações (35) e (33), que podem ser relacionadas:

$$\begin{aligned}
1 + \left| g_t^{(1)}(\tau) \right|^2 &= 1 + c_t^{(2)}(\tau) \\
\therefore \left| g_t^{(1)}(\tau) \right|^2 &= c_t^{(2)}(\tau)
\end{aligned} \tag{37}$$

Substituindo, agora, a equação (37) em (32) obtém-se:

$$\begin{aligned}
c_t^{(2)}(\tau) &= C_t^{(2)}(\tau) / \langle I \rangle_t^2 = \\
C_t^{(2)}(\tau) &= \langle I \rangle_t^2 \cdot c_t^{(2)}(\tau) = \\
C_t^{(2)}(\tau) &= \langle I \rangle_t^2 \left| g_t^{(1)}(\tau) \right|^2
\end{aligned} \tag{38}$$

Substitui-se (36) em (38):

$$C_t^{(2)}(\tau) = \langle I \rangle_t^2 \cdot e^{\left(-\frac{2\tau}{\tau_c}\right)} \tag{39}$$

Voltando à equação (30), relaciona-se com (39):

$$\begin{aligned}
\sigma_s^2(T) &= \frac{1}{T} \int_0^T \langle I \rangle_t^2 \cdot e^{\left(-\frac{2\tau}{\tau_c}\right)} d\tau = \\
\sigma_s^2(T) &= \frac{\langle I \rangle_t^2}{T} \int_0^T e^{\left(-\frac{2\tau}{\tau_c}\right)} d\tau
\end{aligned} \tag{40}$$

E resolve-se a integral definida:

$$\sigma_s^2(T) = \left(\frac{\langle I \rangle_t^2 \cdot \tau_c}{2T} \right) \left[1 - e^{\left(-\frac{2T}{\tau_c}\right)} \right] \tag{41}$$

Por fim, os autores da técnica assumem ergodicidade, ou seja, o sistema se comporta da mesma maneira quando mediado pelo espaço como quando mediado pelo tempo. Assim, substituem a intensidade média temporal pela intensidade média espacial e rearranjam a equação (41), lembrando da equação formalizada em (29):

$$\begin{aligned}
\sigma_s^2(T) &= \left(\frac{\langle I \rangle^2 \cdot \tau_c}{2T} \right) \left[1 - e^{\left(-\frac{2T}{\tau_c} \right)} \right] = \\
\frac{\sigma_s^2(T)}{\langle I \rangle^2} &= \left(\frac{\tau_c}{2T} \right) \left[1 - e^{\left(-\frac{2T}{\tau_c} \right)} \right] = \\
\frac{\sigma_s(T)}{\langle I \rangle} &= \left[\left(\frac{\tau_c}{2T} \right) \left\{ 1 - e^{\left(-\frac{2T}{\tau_c} \right)} \right\} \right]^{1/2} \\
\therefore K &= \left[\left(\frac{\tau_c}{2T} \right) \left\{ 1 - e^{\left(-\frac{2T}{\tau_c} \right)} \right\} \right]^{1/2}
\end{aligned} \tag{42}$$

Como τ_c é dependente da velocidade do fluxo no objeto estudado, isto ocasiona diferentes valores de contraste para diferentes velocidades. Deste modo, os pesquisadores argumentam ser possível diferenciar fluxos na fotografia de speckle final, com a velocidade codificada no contraste, porém ainda sem um modelo para quantificá-la.

Foi em 1996, que Briers, agora em colaboração com Webster, apresentou uma versão digital desta técnica, chamada LASCA - *Laser Speckle Contrast Analysis* (Análise de Contraste de Laser speckle)²⁰. A câmera fotográfica foi substituída por uma CCD - *Charged-Coupled Device* (Dispositivo de Carga Acoplada), a imagem resultante é digital, e o contraste de speckle é calculado, com base na equação (29), em uma "janela" de 7x7 (largura x profundidade) pixels*, com o resultado sendo atribuído ao pixel central. Assim, pela equação (42) é possível diferenciar as áreas com fluxo na imagem.

Contudo, os autores foram além, e modelaram uma fórmula para relacionar o τ_c a uma velocidade média, como a seguir:

$$v = \frac{\lambda}{2\pi\tau_c} \tag{43}$$

Onde λ é o comprimento de onda da luz laser utilizada para iluminar o objeto de estudo.

Deste modo, a técnica é capaz de, após processar os valores de contraste e calcular τ_c , gerar imagens de cores falsas em função da velocidade calculada em cada pixel, resultando em um mapa de distribuição de velocidades de fluxo por toda a região amostrada, como exemplificado na Figura 12.

* Pixel é o menor elemento de uma imagem ao qual é possível atribuir uma cor.

Figura 12 - Exemplo da técnica de LASCA. À esquerda está a imagem original; à direita está a imagem em cores falsas codificadas em função do contraste.

3.2.3 Speckle no OCT

Como descrito, o speckle possui uma grande dependência da superfície que o origina, e uma alteração na superfície resulta em uma alteração do padrão. No entanto, para o caso do OCT, o speckle não se limita e nem se origina apenas na superfície da amostra. Em verdade, é justamente o speckle observado no interior da amostra que tem maior importância para o presente trabalho.

De maneira prática, é possível imaginar a amostra sendo estudada no sistema de OCT como uma coleção de espalhadores individuais, cujo tamanho e densidade variam de acordo com o material da amostra. O feixe de luz que incide na amostra sofre um primeiro retroespalhamento na superfície, retornando ao divisor, porém parte dos fótons continua o caminho no interior da amostra. Estes fótons podem interagir com os espalhadores, dispersos em diversas profundidades e sofrer retroespalhamento, também retornando ao divisor. Esta é a origem do sinal de OCT como explicado na seção anterior. Contudo, a interação dos fótons com estes espalhadores não se resume à reflexão no mesmo sentido do feixe, tampouco é um processo determinístico.

Na realidade, a luz incidente nos espalhadores individuais sofre espalhamentos e reflexões em diversos sentidos. Estes espalhamentos alteram a frente de onda que retorna ao detector, e são essas deformações que são percebidas como speckle. Os espalhamentos que ocorrem no sentido de incidência do feixe causam atrasos aleatórios na frente de onda que ainda se propaga pelo interior da amostra. Os retroespalhamentos que fazem a frente de

onda retornar pelo mesmo caminho de incidência são os casos desejáveis para o sinal de OCT. No entanto, espalhamentos em diferentes direções podem fazer com que os fótons interajam com outros espalhadores, dentro e fora do volume de interesse da amostra, dando a origem a frentes de onda que sofreram múltiplos retroespalhamentos. Mesmo com a baixa coerência da fonte de luz do OCT, estas frentes de onda deformadas por múltiplos espalhadores podem chegar ao detector dentro do tempo de coerência, e contribuir para o sinal.

Assim, para que haja speckle no OCT, basta que mais de um espalhador retroespalhe a mesma frente de onda, de tal forma que ela chegue ao detector fora de fase – mas ainda dentro do tempo de coerência. Isto é análogo ao que acontece com o speckle de superfície, onde uma frente de onda é deformada por dois pontos distintos da mesma superfície, desde que estejam em uma área menor do que a resolução do detector que registra a cena.

Contudo, isto não significa que o tipo de speckle tratado por Goodman, conhecido como *fully developed* speckle (speckle totalmente desenvolvido) seja análogo ao speckle em OCT, o que é necessário para que a estatística desenvolvida nesta seção seja aplicável ao OCT. De fato, analisando-se a derivação estatística, destaca-se as exigências que são feitas para que o *fully developed* speckle ocorra:

- Superfície rugosa;

Diferenças de altura (caminho óptico) maiores que um comprimento de onda, para que ocorram interferências na frente de onda.

- Fator tem sua amplitude independente de sua fase, bem como é independente dos demais;
- Variação de fases dos fatores uniformemente distribuídas entre $-\pi$ e π ;

Para considerar as partes real e imaginária da amplitude da frente de onda resultante como não correlacionadas e com média zero.

- Número de fatores extremamente grande, para aplicação do teorema do limite central

A demonstração da viabilidade do speckle de OCT em atender estas exigências foi feita por Schmitt, Xiang e Yung, em 1999²². Através da

demodulação em quadratura do sinal, eles obtiveram informações de fase e amplitude da fotocorrente no detector. Os resultados obtidos por eles são explicitados na Figura 13 adaptada da referência [22].

Figura 13 – Esquerda: Representação no plano complexo das amplitudes imaginária e real do sinal demodulado. Direita: Distribuição de ângulo da fase do sinal demodulado. Adaptado de [22].

Os sinais obtidos foram oriundos de uma região altamente espalhadora da pele. É possível perceber na imagem da esquerda da Figura 13 que as partes real e imaginária da amplitude não possuem correlação, e fazem um Caminho Aleatório pelo plano complexo, como esperado. Quanto à imagem da direita, pode-se perceber que a fase dos sinais é distribuída de maneira uniforme no intervalo exigido pelas equações de Goodman, por ser um fenômeno aleatório.

Desta maneira, duas exigências são cumpridas. A restrição para superfícies rugosas também é facilmente cumprida, bastando que os espalhadores que constituem a amostra estejam separados por mais de um comprimento de onda, o que, na escala de comprimento de onda utilizado pelo OCT, normalmente no infravermelho, não é ocorrência rara. Da mesma maneira, o número grande de fasores também é cumprido por diversos tipos de amostra com alta densidade de espalhadores, como a pele.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos neste trabalho foram realizados no laboratório de Tomografia por Coerência Óptica do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do IPEN/CNEN-SP. Nosso laboratório conta com dois sistemas de OCT, sendo eles: OCT (I) OCP930SR (Thorlabs Inc.), com comprimento de onda central de 930 nm, e resolução espacial de 6 μm (lateral e axial) no ar; e OCT (II) SS1300 (Thorlabs Inc.) com 16 kHz de varredura A-scan, operando em 1325 nm, com resolução 25 μm e 12 μm (lateral e axial respectivamente) no ar, sistema esse que conta com um módulo que permite análise de deslocamento Doppler e outro módulo, com análise de alterações na polarização de luz incidente. Nas seções seguintes, em cada experimento é indicado qual dos sistemas foi utilizado para a aquisição de imagens. Para os dois sistemas foi utilizado o software de aquisição de dados comercial fornecido com o equipamento.

Nosso laboratório possui, ainda, infraestrutura computacional ampla, e licença para utilizar o ambiente de programação LabVIEW, da National Instruments. Todos os softwares para aquisição de dados e processamento paralelo ora desenvolvidos são baseados neste ambiente de programação. A interface do LabVIEW proporciona, ainda, fácil integração com equipamentos de Hardware, como é o caso da placa de aquisição National Instruments PCI 5122, também utilizada durante a execução deste trabalho. Ainda, o laboratório possui licença para o software de análise, reconstrução e modelagem 3D (tridimensional) VGStudioMax, da Volume Graphics. Este software fornece ferramentas de medidas em dados 3D essenciais para a execução do presente trabalho.

As imagens de microcanais, utilizadas para teste de caracterização e dimensionamento, foram geradas utilizando microcanais já existentes desenvolvidos pelo CLA, cedidos pelo Dr. Wagner de Rossi.

Para cada experimento o tipo de análise e o algoritmo empregado variam amplamente. Assim, os métodos de análise e aquisição são descritos individualmente para os diversos experimentos na seção a seguir. Todos eles, entretanto, têm base nos conceitos desenvolvidos na Seção 3 deste documento, envolvendo speckle, suas estatísticas e algoritmos já existentes.

5. RESULTADOS - SISTEMAS DE OCT COMERCIAIS

Neste capítulo abordaremos os diversos testes e análises realizadas durante a execução do presente trabalho enquanto eram utilizados os sistemas de OCT(I) e OCT(II). Cada subseção apresenta o trabalho abordado, demonstra e discute os resultados obtidos e comenta as conclusões obtidas. Desta maneira, é fácil visualizar o formato essencialmente iterativo com o qual este trabalho foi desenvolvido, para que uma análise pudesse favorecer a seguinte.

5.1 OCT para a caracterização de Circuitos Microfluídicos

A microfluídica é, atualmente, uma área de grande crescimento em pesquisas. Tal interesse é justificado pela variedade de aplicações que a técnica possibilita em áreas como óptica, biologia, química e eletrônica. Se caracteriza, então, como uma poderosa ferramenta que ainda explora seus limites, com os avanços na fabricação de componentes microfluídicos.

Desde sua origem, derivada de outras técnicas como a eletroforese capilar³⁷, estes dispositivos microfluídicos já presenciaram diversas técnicas de fabricação, com variados materiais como base e rápidos avanços tecnológicos, motivados, inclusive, para aplicações militares³⁷. A complexidade dos sistemas microfluídicos também cresce, acompanhando, por um lado, as novas possibilidades de maquinação e, por outro, as exigências de novos experimentos que por vezes necessitam de diversas reações químicas em um mesmo componente. Esta é a tendência do chamado "lab-on-a-chip" (laboratório em um único circuito integrado) ou LOC³⁸. Estes dispositivos dão margem à miniaturização e automação de diversos tipos de processos e reações químicas, agregando um enorme potencial, comprovado pela existência de periódicos voltados exclusivamente a LOC's. Desde microreatores para sínteses químicas, até ferramentas portáteis para diagnóstico óptico, como para fazer citometria e verificar a densidade de leucócitos no sangue³⁹, aplicações dependentes deste tipo de sistema se tornam mais frequentes.

Contudo, para que os componentes microfluídicos possam atender à demanda de maneira satisfatória, é essencial que a fabricação, em especial dos

microcanais, seja feita de forma adequada. Neste sentido, é importante que existam métodos para verificar e caracterizar as estruturas fabricadas, para que seja possível se certificar da qualidade do microcanal produzido. Diversas técnicas são empregadas para este fim, dentre as quais a SEM, acrônimo em inglês para Scanning Electron Microscopy (Microscopia Eletrônica de Varredura), se destaca. Contudo técnicas interferométricas também são aplicadas, entre elas o OCT⁴⁰.

Nosso grupo já demonstrou a capacidade não só de produzir microcanais a partir de ablação a laser de femtosegundo, mas também de analisá-los através dos nossos sistemas de OCT. Isto abre um leque de opções de estudos sobre microfluídica, alguns dos quais foram explorados no presente trabalho e serão abordados em outra seção. No entanto, o conhecimento já existente no grupo foi aproveitado e levado além, para a caracterização dos microcanais produzidos com a tomografia por coerência óptica. Esta caracterização é importante como feedback para a produção dos microcanais, além de assegurar a qualidade para uso em experimentos e reunir dados concernentes aos mesmos.

5.1.1 Materiais e Métodos

Para o primeiro estudo, oito microcanais foram fabricados em uma mesma placa de vidro BK7, sob diferentes condições de ablação, como segue, na Tabela 1, onde E é a energia por pulso do laser, e V a velocidade de deslocamento do substrato.

Tabela 1 - Parâmetros de interesse usados na fabricação dos microcanais.

#	E (μJ)	V (mm/min.)
1	30	1176
2	30	588
3	60	1176
4	60	1176
5	60	588
6	60	1176
7	60	588
8	60	349

Uma foto destes microcanais pode ser encontrada na Figura 14.

Figura 14 - Microcanais estudados.

Para realizar as medidas, foi utilizado o sistema de OCT (I), por sua melhor resolução, tanto axial quanto lateral. Imagens com tamanho de 512 pixels (axial) x 500 pixels (lateral) foram obtidas, de modo a cobrir uma área de 1,58 mm (axial) x 2 mm (lateral). Com esta abrangência lateral não foi possível amostrar todos os microcanais em uma mesma imagem, por este motivo, os microcanais foram divididos em grupos, de modo que todos os canais de um dado grupo coubessem em uma única imagem. O primeiro grupo abrange os canais de número 1 a 3, o segundo conta com os microcanais 4 e 5, deixando de 6 a 8 para o terceiro e último grupo. Um exemplo da imagem do grupo 2 está na Figura 15. As imagens para os demais grupos são semelhantes.

Figura 15 - Exemplo de imagem de OCT do grupo 2, com os microcanais 4 (esquerda) e 5 (direita).

Para avaliar a uniformidade e obter dados mais precisos sobre os microcanais, foi realizada uma análise em diversas localidades dos microcanais, ao longo de sua extensão longitudinal. Para tal, a amostra foi posicionada em um translador automatizado MT3-Z8 (Thorlabs Inc.). Controlando a velocidade e distância do deslocamento via software, foi realizada uma varredura ao longo de 3 mm em cada canal, adquirindo, simultaneamente, imagens de OCT com as mesmas características da Figura 15, a uma taxa de 8,6 fps (frames por segundo), o que permitiu gerar, posteriormente, uma reconstrução tridimensional dos canais, com uma resolução longitudinal (ao longo do microcanal) de, aproximadamente, 5 μm .

As medidas físicas foram feitas em quinze localizações diferentes de cada microcanal, com a primeira sendo sempre no início destes. Após esta, cada medida foi separada por 148,5 μm (ou 30 frames), cobrindo uma área de, aproximadamente, 2,08 mm.

A reconstrução tridimensional foi feita com o software VGStudioMax, e a Figura 16 contém um exemplo dos resultados obtidos.

Figura 16 - Reconstrução 3D dos canais do grupo 2, sob diferentes ângulos de visualização.

O software VGStudioMax possui, ainda, ferramentas de medidas para analisar os dados do volume tridimensional. Através destas ferramentas, e

calibrando o software com os parâmetros de aquisição, caracterizou-se as dimensões físicas dos microcanais.

5.1.2 Resultados e Discussão

A primeira característica a ser notada é a deformação nas extremidades das estruturas fabricadas. Como pode ser observado na Figura 16, há uma enorme depressão nos canais, quando se aproximam da borda. Isto é verdade para todos os oito microcanais, e se deve ao processo de fabricação através do laser pulsado.

Na usinagem destes circuitos, o substrato utilizado para ablação é deslocado em um sentido longitudinal, enquanto o feixe de laser fica fixo, o que permite que o mesmo faça uma varredura pela superfície do substrato. Quando atinge um comprimento determinado, a amostra sofre um pequeno deslocamento lateral, e uma nova varredura se inicia no sentido longitudinal contrário. Este deslocamento lateral é necessário para controlar a largura do microcanal, e é repetido até que se atinja a extensão necessária, concatenando um deslocamento longitudinal com um lateral, completando um movimento chamado de raster. O próximo raster se inicia, fazendo com que o feixe de laser passe, novamente, pelo mesmo caminho traçado anteriormente. Este ciclo se repete por um número controlado de vezes, sendo que a cada iteração mais material é retirado da estrutura, e mais profundo ficam os canais. Contudo, toda vez que a varredura se aproxima de um fim de curso longitudinal, há uma redução na velocidade de deslocamento do substrato, o que faz com que mais pulsos do laser se concentrem nestas regiões, e mais material seja ablacionado. Por este motivo, as extremidades dos canais se tornam mais profundas e irregulares do que o restante.

Assim, uma das análises realizadas foi a avaliação da profundidade dos canais, em cujos resultados se percebe nitidamente a aberração na extremidade avaliada. Estes resultados estão contidos no gráfico da Figura 17.

Figura 17 - Gráfico comparativo da profundidade dos 8 microcanais em função do comprimento.

A média e desvio padrão gerais, apresentados na Tabela 2, consideram todas as medidas, inclusive aquelas realizadas nas extremidades, o que influencia no cálculo destes valores, podendo fazer com que não sejam bons indicadores da qualidade dos circuitos microfluídicos.

Para comparação, o cálculo de média e desvio padrão foi refeito, levando em conta apenas as medidas fora da zona de depressão, a partir de 445,5 μm de distância da ponta. Estes novos resultados estão, também na Tabela 2.

Tabela 2 - Média e Desvio Padrão da profundidade ao longo dos microcanais. Valores Gerais consideram toda a extensão, enquanto Valores Recalculados levam em conta a partir de 445,5μm.

Microcanais	Média Geral	Desvio Padrão Geral	Média Recalculada	Desvio Padrão Recalculado
1	34,56	26,49	24,27	6,01
2	64,2	31,28	52,29	3,56
3	93,37	55,54	70,78	18,55
4	101,34	55,80	78,39	17,99
5	138,06	42,90	121,73	2,14
6	197,04	83,57	161,80	33,86
7	250,26	39,47	233,99	3,07
8	305,81	38,60	292,34	10,47

Os valores obtidos sem a zona de depressão são mais condizentes com o que foi observado dos microcanais durante as medidas, em questão de uniformidade.

Contudo, pode-se observar na Figura 17 que em metade dos canais - números 1, 3, 4 e 6 - houve constante diminuição da profundidade ao longo do microcanal. Especialmente notável no microcanal de número 1, que já apresentava profundidade menor que os demais, e se torna ainda mais raso, ficando a, apenas, 15 μm da superfície. Ao analisar os parâmetros de configuração, verifica-se que são justamente os canais usinados com uma maior velocidade de deslocamento do feixe, indicando que uma varredura muito rápida pode gerar estruturas menos uniformes. Além disso, o canal de número 1, fabricado com uma potência menor, sofreu mais com este fator.

Uma análise similar foi feita para a largura dos canais. As medidas foram realizadas também em quinze locais diferentes dos canais. A largura foi mensurada na abertura dos microcanais, na superfície. Como pode ser observado pelos valores da Figura 18, os problemas de fabricação não se repetem nesta análise, e as pequenas variações dos valores ocorrem de forma semelhante durante todo o comprimento. Como o resultado é semelhante para todos os canais, os parâmetros utilizados para a maquinação não têm grande influência nas variações apresentadas ao longo do canal.

Figura 18- Gráfico comparativo da largura na abertura dos 8 microcanais em função do comprimento.

Verificam-se diferenças entre os valores médios de largura entre os canais, porém não apresentam relação aparente com os parâmetros de fabricação estudados.

A maior influência da flutuação dos valores ao longo de um mesmo microcanal pode resultar do fato que o feixe, em um raster a uma determinada profundidade, ainda ablaçione material de profundidades menores, o que torna a estrutura menos uniforme. Este fator também contribui para que os canais não apresentem um perfil regular ao longo de toda a sua profundidade. Os ângulos internos de suas paredes não são perfeitamente retos, fazendo com que a largura se altere de acordo com a profundidade, e uma análise apenas da abertura na superfície não caracterizaria as estruturas de forma apropriada.

Foram realizadas, portanto, análises também da largura na metade da profundidade e na base de cada canal. Estes dois novos procedimentos também foram repetidos em quinze locais diferentes. Os resultados são apontados na Figura 19 e na Figura 20. Novamente, foram calculadas a média e desvio padrão, incluindo e excluindo a região de depressão, como mostrado na Tabela 3.

Figura 19 - Gráfico comparativo da largura à meia altura dos 8 microcanais em função do comprimento.

Figura 20 - Gráfico comparativo da largura na base dos 8 microcanais em função do comprimento.

Tabela 3 - Média e Desvio Padrão da largura ao longo dos microcanais, à meia altura e na base. Valores Gerais consideram toda a extensão, enquanto Valores Recalculados levam em conta a partir de 445,5µm.

Microcanais	Largura à meia altura			
	Média Geral	Desvio Padrão Geral	Média Recalculada	Desvio Padrão Recalculado
1	204,31	11,09	207,93	9,17
2	161,81	6,45	163,19	6,42
3	168,99	10,70	172,97	5,73
4	162,52	7,68	165,65	4,21
5	145,48	8,72	149,23	3,02
6	155,33	9,60	157,95	8,83
7	125,33	4,90	126,37	3,72
8	64,94	2,72	65,25	2,89
	Largura na base			
	Média Geral	Desvio Padrão Geral	Média Recalculada	Desvio Padrão Recalculado
1	189,99	13,82	194,90	10,19
2	121,85	10,33	126,12	3,68
3	149,99	19,51	158,56	3,56
4	146,71	19,39	154,88	5,62
5	117,12	12,37	121,73	6,56
6	111,18	26,25	122,28	14,06
7	90,82	5,06	91,44	3,79
8	22,69	4,49	21,89	4,19

Desta vez, os efeitos do maior número de pulsos nas extremidades são visíveis, em especial nas medidas da base dos microcanais. As medidas realizadas na altura média mostram resultados ligeiramente mais estreitos na extremidade do microcanal, e uma tendência de alargamento ao se afastar da extremidade, ao passo que as medidas realizadas na base dos microcanais apresentam valores notavelmente menores neste local. Isto confirma o que podia ser atestado visualmente na reconstrução tridimensional da Figura 16: nas regiões de depressão, o canal adquire um perfil mais triangular, de modo que a base da estrutura se torna muito menor do que sua abertura na superfície. Este resultado indica que a aberração nos finais de curso da fabricação não apenas deforma a profundidade do microcanal, mas também seu perfil.

Exceções ao caso mencionado são os canais 7 e 8. Como é possível perceber pelos resultados na Figura 20, as diferenças de largura no início e ao longo destas estruturas não são expressivas como nos demais casos. No caso do microcanal 7, a explicação é um defeito de fabricação. Uma das paredes internas do canal possui uma protuberância, e acaba por estreitar a passagem interna, como é possível observar na Figura 21 à esquerda. Para o canal 8, os resultados obtidos decorrem do fato de que o canal, como um todo, possui um perfil mais triangular, também mostrado à direita na Figura 21, o que indica que os parâmetros de fabricação, combinando uma potência alta e baixa velocidade de varredura, podem não ser apropriados para alguns experimentos que exijam canais com perfil quadrado. Isso corrobora também para a explicação das aberrações nas pontas das microestruturas, onde ocorre a mesma situação: menor velocidade (fim de curso) e maior energia depositada (mais pulsos).

Figura 21 - Detalhe dos microcanais 7 (esquerda) e 8 (direita).

Tal perfil triangular, diferente dos demais, é resultado da combinação de ângulos acentuados das paredes internas e grande profundidade. Para confirmar isto, foram realizadas medidas dos ângulos das paredes internas em relação à base dos microcanais. Para cada um destes, os ângulos foram mensurados em cinco locais diferentes, afastados 0,495 mm, sendo a primeira medida realizada na extremidade do microcanal. Resultados são apresentados na Tabela 4.

Fica claro que os ângulos internos do canal 8 são mais acentuados do que os demais, o que o torna um caso particular, e explica a diferença dele para os microcanais restantes. Além disso, é possível averiguar que no primeiro local de medida (no começo dos canais) os ângulos medidos em todos os casos também se tornam mais acentuados. Isto, aliado às informações de profundidade da Figura 17, justifica a diferença notada no perfil dos microcanais nas regiões de depressão.

Vale notar, ainda, o comportamento dos ângulos da parede esquerda do canal 7. Estes diminuem ao se afastarem da extremidade, contrariamente ao observado para os casos restantes. Novamente, isto é causado pela protuberância existente nesta parede interna.

Os resultados obtidos com OCT foram comparados com outros resultados, mensurados através de perfilometria óptica, técnica de resolução maior. O perfilômetro utilizado foi ZeGage Profiler (Zygo Corporation), disponível

no Centro de Lasers e Aplicações. Foi verificado que os valores obtidos com ambas as técnicas eram compatíveis, a exemplo do que é demonstrado na Figura 22 e Figura 23, análises do microcanal de número 4, medindo, respectivamente, profundidade e largura na base. Na Figura 22 está destacado o parâmetro Rdz, que indica a diferença de altura entre as linhas horizontais pontilhadas. Na Figura 23, o parâmetro destacado é o Rdx, indicando a distância entre as linhas verticais sólidas. Esta comprovação das medidas viabiliza o OCT como ferramenta potencial para análise da qualidade dos microcanais.

Figura 22 - Medida de perfilometria óptica para a profundidade do microcanal de número 4.

Figura 23 - Medida de perfilometria óptica para a largura do microcanal de número 4.

Tabela 4 - Ângulos Internos da parede dos canais em relação à base. D.P. indica o desvio padrão. Valores Gerais consideram toda a extensão, enquanto Valores Recalculados levam em conta a partir de 495 μm .

#	Parede	Início	495 μm	990 μm	1485 μm	1980 μm	Média	D.P.	Média Rec.	D.P. Rec.
1	esq (°)	108,44	127,69	122,28	123,02	126,87	121,66	7,75	124,97	2,71
	dir (°)	109,9	127,87	132,27	146,98	143,75	132,15	14,73	137,72	9,11
2	esq (°)	115,96	140,01	141,58	143,75	144,9	137,24	12,05	142,56	2,19
	dir (°)	112,22	142,35	143,5	146,69	146,93	138,34	14,73	144,87	2,29
3	esq (°)	102,86	108,85	111,45	117,65	115,35	111,23	5,79	113,33	3,93
	dir (°)	101,71	113,38	120,65	118,44	126,87	116,21	9,44	119,84	5,59
4	esq (°)	100,47	106,56	103,45	105,95	109,55	105,20	3,42	106,38	2,51
	dir (°)	101,12	107,45	113,61	113,43	114,23	109,97	5,66	112,18	3,17
5	esq (°)	101,16	109,65	110,41	108,36	110,56	108,03	3,94	109,75	1,01
	dir (°)	101,92	109,89	109,8	109,01	110,88	108,30	3,63	109,90	0,77
6	esq (°)	102,09	103,85	104,53	105,83	107,59	104,78	2,07	105,45	1,65
	dir (°)	102,99	108,23	109,66	109,3	111,63	108,36	3,25	109,71	1,42
7	esq (°)	102,99	102,53	101,31	95,71	96,23	99,75	3,51	98,95	3,48
	dir (°)	101,85	104,21	104,71	105,75	107,63	104,83	2,12	105,58	1,51
8	esq (°)	96,14	99,27	99,37	98,29	98,93	98,40	1,33	98,97	0,49
	dir (°)	98,5	99,65	98,75	98,05	98,51	98,69	0,59	98,74	0,67

5.1.3 Conclusões

Neste trabalho ficou comprovada a capacidade e aplicabilidade do OCT para realizar avaliações das dimensões físicas de circuitos microfluídicos.

Foi possibilitada, desta maneira, a análise de aspectos importantes dos microcanais em diversas condições de fabricação. Estas medidas servem como retroalimentação ao processo de ablação, e permitem ganhar certa intuição sobre o resultado a ser esperado para parâmetros de interesse na usinagem destas

estruturas. Além disto, o conhecimento das dimensões físicas dos canais é essencial para o cálculo de diversas outras propriedades destes dispositivos microfluídicos, como vazão, por exemplo.

Para o presente trabalho, o resultado de maior importância é a demonstração do OCT como uma ferramenta adequada para controle da qualidade destes dispositivos microfluídicos. Além disto, estes testes serviram como aprendizado de operação dos sistemas comerciais de OCT, e proporcionaram uma base sólida para a realização dos demais testes.

5.2 Speckle Variance OCT

O OCT conta, como comentado no início deste trabalho, com técnicas voltadas a obter informações a partir de speckle presente em suas imagens, tal qual a speckle Variance-OCT (SV-OCT).

Basicamente, o SV-OCT tira proveito do fato de que, em regiões de fluxo, os espalhadores que ocasionam o speckle estão em movimento. Como a imagem do OCT é um corte transversal, uma imagem representando o perfil abaixo de uma única linha lateral da amostra, quando um B-Scan é adquirido, um determinado grupo de espalhadores estava abaixo desta linha e contribuiu para o padrão de speckle existente neste B-Scan. Contudo, quando a varredura é feita novamente, e um novo B-Scan é adquirido na mesma linha, o grupo de espalhadores existente abaixo dela não é mais o mesmo, ou não está na mesma posição, e o padrão de speckle é alterado. Nas regiões sem fluxo, o padrão permanece inalterado, pois não há movimento dos espalhadores.

Se diversos B-Scans forem adquiridos sequencialmente para uma mesma linha, cada um conterá um padrão de speckle ligeiramente diferente nas áreas de fluxo, enquanto nas demais áreas este padrão permanece correlacionado. É possível, então, combinando os dados destas imagens, obter informações sobre as regiões de fluxo existentes em uma amostra.

Uma maneira de avaliar estes dados para mapear a localização das áreas de fluxo é calcular a variância da intensidade em um determinado ponto - um pixel - através de uma coleção de imagens adquiridas sequencialmente.

A variância indica o quão espalhado um conjunto de valores está ao redor de sua média. Como as regiões sem fluxo possuem poucas flutuações de

intensidade, a intensidade de um pixel em uma determinada imagem será próxima do valor da média desse pixel entre toda a coleção de imagens, e a variância será pequena. De modo contrário, nas regiões de fluxo, como mencionado, ocorrem flutuações de intensidade, e a intensidade média deixa de ser uma boa representativa para qualquer imagem em particular, fazendo com que os valores estejam bastante dispersos, com uma grande variância. Este método de análise foi proposto por Mariampillai *et al.* em 2008, quando apresentaram a técnica de Speckle Variance OCT¹⁹. Se N B-Scans, ou frames, forem obtidos em diferentes tempos t (t varia de 0 a $N-1$), a variância em um determinado pixel i, j (i = posição lateral, j = profundidade) pode ser obtida através da seguinte equação:

$$SV_{i,j} = \frac{1}{N} \sum_{t=0}^{N-1} (I_{i,j,t} - \langle I_{i,j} \rangle)^2 \quad (44)$$

Onde $I_{i,j,t}$ representa a intensidade do pixel i, j no tempo t ; e $\langle I_{i,j} \rangle$ é a média de intensidades do pixel i, j em todos os N frames.

Os resultados de variância para cada pixel obtidos através destes N B-Scans geram uma única nova imagem, em cores falsas codificadas em função do valor da variância.

Este algoritmo é demonstrado na Figura 24, onde o pixel i, j , que possui grandes flutuações de intensidade, resulta em um pixel mais claro (valor mais alto) na imagem resultante, enquanto pixels com pouca ou nenhuma flutuação geram pixels mais escuros (valores menores).

Figura 24 - Ilustração do método de Speckle Variance.

Uma imagem de SV-OCT, adaptada da referência [41], pode ser visualizada na Figura 25. Percebe-se que a técnica gera um mapa de regiões de fluxo, e não depende do ângulo de imageamento, o que é uma séria limitação nas técnicas de fluxometria baseadas em deslocamento Doppler. Assim, o SV-OCT consegue identificar fluxos em diversas profundidades, e mesmo fluxos perpendiculares ao feixe de varredura. Contudo, esta técnica não permite a obtenção de velocidades destes fluxos. Fica, então, uma lacuna para técnicas de OCT que sejam embasadas em speckle (como o SV-OCT) e que consigam quantificar os fluxos detectados (como o LASCA).

Figura 25 - Imagem de um embrião de rato com 9,5 dias. A) Imagem estrutural 3D obtida com OCT. B) Imagem correspondente com a técnica de speckle Variance. É notável o mapeamento das regiões vascularizadas. Imagens de Sudheendran *et al.*, na referência [41].

5.2.1 Materiais e Métodos / Softwares Desenvolvidos

Para estudar o comportamento dos algoritmo de speckle Variance a partir de entradas conhecidas, além da implementação do algoritmo em um software próprio, seguindo a Equação (44), também foi criado um simulador capaz de gerar imagens parecidas com aquelas obtidas através de OCT, onde era simulado o deslocamento lateral de determinados pixels em meio a ruído de fundo.

Neste software, uma imagem, em escala de cinza, de 500 x 500 pixels é criada. A região central horizontal da imagem é programada como a área de sinal, onde os deslocamentos ocorrem. Esta área tem 50 pixels de altura e abrange todo o comprimento lateral da imagem. O restante da imagem é

considerado *background noise* (ruído de fundo). Esta imagem é tratada internamente ao programa como um *array*[†] de duas dimensões.

Dentro da área de sinal, diversos pixels são aleatoriamente escolhidos como partículas. Somente estes pixels são deslocados lateralmente à direita, em uma linha reta. Os demais pixels, dentro ou fora da área de sinal, ficam sujeitos a serem selecionados como ruído aleatório uniforme.

Os pixels selecionados como partículas recebem intensidade máxima[‡] no primeiro momento, enquanto os pixels de ruído têm sua intensidade determinada aleatoriamente, dentro de um intervalo determinado manualmente, e que pode ser alterado na interface gráfica do programa. A seleção dos pixels de partícula, bem como a seleção dos pixels de ruído juntamente com suas intensidades é feita através de uma ferramenta de geração de sinais da biblioteca de *Signal Generation* do LabVIEW, chamada *Uniform Random Signal* (Sinal Aleatório Uniforme).

Após as etapas de seleção e de atribuição de intensidade, a primeira imagem é gerada, onde todas as partículas estão com intensidade máxima nas posições iniciais, como demonstrado na Figura 26.

Figura 26 - Exemplo de imagem inicial simulada.

[†] Estrutura de dados que armazena uma coleção de valores, cada qual possui um índice único que o identifica.

[‡] Para as imagens em escala de cinza utilizadas, os valores dos pixels variam entre 0 (preto) e 255 (branco), sendo este último considerado como intensidade máxima.

A seguir, novas imagens são geradas, simulando o deslocamento das partículas. A velocidade de deslocamento pode ser controlada através da interface gráfica do programa. O algoritmo que faz o deslocamento calcula quantos (se houver) pixels a partícula vai “pular” a cada imagem. Isto depende diretamente de dois fatores: taxa de aquisição simulada – quantas imagens por segundo são obtidas pelo detector imaginário; e resolução lateral – quantos μm cada pixel na imagem representa. Ambos os fatores são determinados através da interface gráfica. O algoritmo ainda leva em consideração se alguma partícula estaria em transição entre dois pixels, e distribui a intensidade entre eles de maneira apropriada. As imagens são salvas com extensão “.raw” e codificação “Little-Endian” – mesmas especificações utilizadas nas imagens geradas pelo sistema de OCT (I).

Foram realizadas simulações com combinações de 15 velocidades diferentes e 11 intensidades de ruído de fundo para cada velocidade (variando de 10% a 20% da intensidade máxima). A taxa de aquisição foi mantida fixa em 25 frames por segundos, e a resolução fixada em 6 μm . Foram gerados aproximadamente 12 gigabytes de dados simulados.

5.2.2 Resultados e Discussão

A variância foi calculada para todos os casos, gerando imagens como exemplificado pela Figura 27.

As diversas variâncias foram então analisadas, para determinar o comportamento do algoritmo. Para fazer isso foi utilizado um parâmetro de visibilidade do sinal pretendido (o movimento das partículas) em relação ao ruído de fundo residual nas imagens de variância. Esta visibilidade é calculada como a diferença entre o total das intensidades na área de sinal (área retangular central das imagens) e o total das intensidades no resto da imagem. Gráficos mostrando esta visibilidade em função da velocidade simulada e em função do nível de ruído de fundo foram criados para auxiliar na análise, e exemplos podem ser vistos na Figura 28 e na Figura 29, respectivamente.

Figura 27 - Speckle Variance de partículas simuladas.

Figura 28 - Gráfico da visibilidade (u.a.) em função da velocidade (μm/s) para o nível de ruído em 12%.

Figura 29 - Gráfico da visibilidade (u.a.) em função de ruído de fundo (u.a.) para a velocidade de 25 $\mu\text{m/s}$.

No gráfico em função das velocidades para um nível de ruído específico da Figura 28 percebe-se uma variação grande da visibilidade por entre as velocidades simuladas, porém é notável a queda de visibilidade para a velocidade de 1 $\mu\text{m/s}$. Isto sugere que para velocidades baixas o sistema pode não responder de forma precisa ao movimento de espalhadores. Contudo, uma maior resolução espacial pode melhorar a visibilidade nestes casos. É válido notar, ainda, que a relação entre velocidade e visibilidade não apresenta um padrão nítido.

O gráfico da Figura 29, que mostra a visibilidade em função do nível de ruído para uma dada velocidade, evidencia uma influência prejudicial do *background noise* para a visibilidade do Speckle Variance. A relação quase linear entre os parâmetros demonstra a sensibilidade da técnica a este tipo de ruído.

Com um gráfico tridimensional é possível observar a influência conjunta dos dois parâmetros estudados sobre a visibilidade. Tal gráfico é apresentado na Figura 30. O decréscimo quase linear da visibilidade em respeito ao ruído torna-se mais proeminente, com a inclinação da superfície do gráfico em direção a valores mais baixos de visibilidade, conforme o valor de ruído aumenta, independente do valor de velocidade. Com respeito a esta última, verifica-se que o gráfico assume valores significativamente menores de visibilidade quando a velocidade é de 1 $\mu\text{m/s}$, em todos os valores de ruído, criando uma depressão na

ponta direita do gráfico. Novamente, vale notar que a visibilidade não apresenta relação bem definida com a velocidade.

Figura 30 - Gráfico de superfície 3D, mostrando a visibilidade (u.a.) em função de velocidade ($\mu\text{m/s}$) e ruído de fundo (u.a.).

A literatura reporta que a técnica de Speckle Variance, da maneira como é implementada, é insensível a velocidade de fluxo⁴² - conhecido fator limitante da técnica. Estes resultados sugerem que, ainda que o speckle permaneça correlacionado espacialmente na imagem - como no caso de um movimento de corpo sólido - o algoritmo continua insensível ao nível de deslocamento ou velocidade. Estes dados, contudo, estão relacionados à taxa de aquisição e resolução impostas ao sistema, valores que foram baseados nas limitações do sistema de OCT (I). Além disso, argumenta-se que um fator crucial para o bom desempenho do algoritmo é o nível de ruído de fundo, que deve ser minimizado para melhor sensibilidade.

5.2.3 Algoritmo Simplificado - Materiais e Métodos

Pode-se argumentar que, uma vez que a técnica de SV não fornece qualquer tipo de informação sobre a velocidade para os cenários propostos,

sendo apenas qualitativa, o algoritmo utilizado é excessivamente caro em questão computacional, exigindo elevado processamento.

Com o intuito de agilizar a geração de mapas de fluxo, e simplificar o tipo de cálculo utilizado, é proposto um novo algoritmo para separar alvos fixos de móveis. Este algoritmo tira proveito do mesmo fator que influencia o SV – nas áreas de fluxo o speckle apresenta, no tempo, uma variação maior do que as áreas estáticas.

Assim, argumenta-se ser possível discernir entre os dois regimes observando apenas a variação da intensidade entre duas imagens consecutivas no tempo. É esperado que esta variação entre pares de imagens seja mais evidente onde há flutuação do *time-varying speckle* e, portanto, sua somatória deve ser substancialmente diferente nas regiões estáticas e dinâmicas.

O cálculo é realizado seguindo a Equação (45):

$$Result_{i,j} = \sum_{t=1}^N |(I_{i,j,t} * I_{i,j,t-1}) - (I_{i,j,t})^2| \quad (45)$$

O $Result_{i,j}$ é o valor final calculado para um pixel de índice i,j ; t é o índice que representa o tempo em que uma imagem foi adquirida e, para um conjunto de N imagens, varia de 1 a N ; $I_{i,j,t}$ é a intensidade de um pixel i,j no tempo t .

A Equação (45), portanto, multiplica os valores de intensidade de um determinado pixel nos instantes t e $t-1$, consecutivos, e subtrai deste valor a intensidade quadrática no momento t . O resultante é um valor representativo da variação ocorrida para o pixel entre os tempos t e $t-1$. Considera-se apenas o valor absoluto, pois o importante é a variação, sendo ela positiva ou negativa. Fica mais fácil visualizar a importância da variação para o cálculo se expandirmos a Equação (45):

$$Result_{i,j} = \sum_{t=1}^{N-1} |I_{i,j,t} (I_{i,j,t-1} - I_{i,j,t})| \quad (46)$$

O termo entre parênteses na Equação (46) é justamente a diferença entre as intensidades, enquanto que o termo multiplicativo em evidência auxilia na separação entre ruído de fundo (normalmente com intensidades baixas) e sinal (intensidades maiores).

O algoritmo proposto é, então, repetido para todos os pixels de uma determinada imagem. Os valores são, por fim, normalizados para o intervalo 0-255 para apresentação gráfica.

O algoritmo é ilustrado na Figura 31, onde pares de imagens sequenciais são analisados, para dar origem a uma única imagem resultante. Pixels com maiores flutuações resultam em valores mais altos (cores mais claras) no resultado final.

Figura 31 - Ilustração do algoritmo proposto para análise de flutuações de intensidade.

Para verificar a viabilidade do algoritmo, foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos com o SV e método proposto, utilizando como entrada uma sequência de imagens reais de OCT, com *time-varying* speckle de fluxo. As imagens consistem de um corte transversal da ponta de um dedo indicador, e o speckle flutuante no tempo tem sua origem na microvascularização desta região. A série de imagens foi obtida com o sistema de OCT (II), conta com um total de 50 imagens (512x512 pixels), obtidas a uma taxa de 20 imagens por segundo, com média de 2 A-Scans, para auxiliar na eliminação de ruído de fundo.

5.2.4 Comparação e Discussão

Uma imagem da coleção utilizada como entrada para os algoritmos, sem tratamento, é apresentada na Figura 32, seguida dos resultados obtidos com os métodos testados.

Figura 32 - Comparação entre speckle Variance e nosso algoritmo. A: Imagem da série original; B: Resultado do speckle Variance; C: Nosso resultado.

Nota-se, primeiramente, que na imagem da Figura 32 – (A), exemplo de imagem sem tratamento, não é possível distinguir qualquer informação de fluxo. Isto é verdade para todas as imagens da série. Figura 32 – (B) demonstra o resultado obtido com Speckle Variance, e fica clara a distinção de pontos específicos mais claros, identificados como seções transversais de microvasos. A superfície do dedo fica bastante escurecida, o que é esperado, já que representa uma região estática. Ainda assim, uma pequena região de “borda” é notada.

Por último, na Figura 32 – (C), está o resultado do novo algoritmo. De maneira geral, as regiões claras (com grande variação e, portanto, representando speckle flutuante no tempo) são destacadas com maior nitidez que na análise por SV, indicando boa sensibilidade. Além disso, regiões identificadas estão de bom acordo com aquelas apontadas pelo SV, algoritmo já consolidado na literatura. Novamente a superfície do dedo apresenta intensidade bem menor do que as demais áreas. Porém a “borda” é mais visível do que no resultado da Figura 32 – (B).

A causa desta “borda” é atribuída a movimentos involuntários do dedo durante a aquisição, ocasionando pequenas variações de intensidade na superfície.

A correspondência entre os pontos identificados pelo novo algoritmo e o SV, aqui utilizado como padrão de referência, comprova a capacidade do método proposto em discernir fluxo, viabilizando seu uso. Mesmo que as demais regiões sejam, ainda, visíveis, o contraste obtido é suficiente para segregar as áreas de fluxo, tornando viável o uso de técnicas de limiarização, por exemplo, para facilitar ainda mais a visualização.

Vale ressaltar que nos dois resultados é possível observar um “rastros” de alta intensidade abaixo das áreas claras. Este fenômeno é conhecido *Shadowing Effect* ou *Shadowing Artifact*^{42; 43} e está relacionado com a forma como o OCT obtém as imagens⁴⁴, não sendo dependente das análises posteriormente realizadas.

Relevante para esta comparação é o tempo de execução dos algoritmos, cuja otimização é o objetivo final da técnica proposta. Com o objetivo de análise de tal parâmetro, foi realizado, para cada método, um conjunto de 20 testes com a mesma série de 50 imagens, e registrados os tempos de execução. Destaca-se, que ambos os algoritmos foram implementados no mesmo ambiente de desenvolvimento, utilizando a mesma linguagem de programação, mesma metodologia de acesso a disco (as imagens são carregadas para a memória do programa de acordo com a iteração), sem nenhum tipo de otimização e executados na mesma máquina. Os tempos médios de execução registrados são apresentados na Figura 33.

Figura 33 - Comparação do tempo de execução dos algoritmos.

O novo algoritmo obteve resultados melhores (menor tempo de execução) em todos os testes, conseguindo, em média, um ganho de desempenho de 31%, o que resulta em mais de 1,5 segundo por análise, na máquina utilizada.

O ganho é atribuído, em grande parte, ao fato de que o algoritmo proposto calcula o valor final sem depender de cálculo de média das intensidades no tempo. A dependência deste valor, que ocorre no SV como é possível observar na Equação (44), implica na necessidade de o algoritmo “visitar” cada pixel de cada imagem duas vezes: a primeira para obter o valor médio e, na seguinte, para calcular o valor final. Os cálculos deste tipo são conhecidos como algoritmos de duas passagens. Nosso algoritmo dispensa a primeira “visita”, sendo de passagem única.

Outro ponto importante é a utilização de memória. Neste quesito, os dois algoritmos possuem performance parecida, uma vez que, em cada instante no tempo, exigem três matrizes (imagens) carregadas na memória. No SV estas são: (1) a média calculada, (2) a imagem atualmente na iteração e (3) o valor de variância calculado até o momento. No novo algoritmo, são: (1) a imagem atualmente na iteração, (2) a imagem do tempo imediatamente anterior e (3) o valor resultante calculado até o momento.

5.2.5 Conclusões

Nesta parte do trabalho foi testado o algoritmo de Speckle Variance. Foi possível aplicá-lo e testar seu funcionamento em casos reais e simulados.

Apesar de destacado na literatura que a técnica era insensível a variações de fluxo, a técnica foi aplicada ao deslocamento lateral pela imagem, que permanece correlacionado por mais tempo. Objetivou-se ganhar intuição sobre o comportamento do algoritmo através de entradas com flutuações de intensidade controladas. Os resultados obtidos indicam que, mesmo nestes casos, apesar do bom mapeamento apresentado, não houve qualquer relação aparente entre a velocidade simulada e a saída do algoritmo. Além disto, foi possível perceber a grande sensibilidade do algoritmo ao ruído de fundo. Conclui-se que, da maneira como é implementado, não é possível obter informações quantitativas através do SV.

Frente a estes resultados, foi possível argumentar que a técnica era demasiadamente complexa para fazer algo simples: analisar a flutuação de intensidade. Foi desenvolvido e analisado, portanto, um novo algoritmo que suprisse esta necessidade com melhor tempo de processamento. Comprovou-se a viabilidade desta técnica, comparando-a com o SV. O ganho em tempo de processamento foi expressivo, com mais de 30% de redução. Vale ressaltar que existem algoritmos para cálculo de variância com apenas uma passagem. Estes algoritmos tentam fazer estimativas da média, o que os torna suscetíveis a grandes erros. Este novo algoritmo não necessita de conhecimento de média, obtém resultados compatíveis e exige a mesma quantidade de memória alocada.

5.3 Técnica LASCA Aplicada A Imagens De OCT

Diante da problemática exposta neste trabalho, a motivação para o estudo das relações entre speckle no OCT e velocidades de fluxo é evidente, especialmente porque representa a oportunidade de suprir a necessidade de uma técnica deste tipo, tanto para aplicações biológicas quanto para a microfluídica. Alguns grupos de pesquisa já abordam o assunto, e os primeiros resultados começam a surgir na literatura^{45; 46; 47; 48}. Nosso grupo também se interessou pela pesquisa na área, e o presente trabalho é resultado dos primeiros estudos.

A primeira abordagem utilizada foi uma tentativa de aplicação de um algoritmo conhecidamente funcional, o LASCA, para as imagens obtidas através de OCT. Ao analisar a técnica de LASCA, percebe-se que é semelhante ao Speckle Variance, consistindo na análise das flutuações de intensidade do speckle nas imagens, e, enquanto a primeira tem seu cálculo baseado no desvio padrão destas flutuações, a segunda utiliza a variância, ou seja, o quadrado do desvio padrão. Contudo, uma diferença fundamental entre as técnicas é que uma faz a avaliação das flutuações no espaço, enquanto a outra o faz no tempo. Porém a oportunidade de poder adaptar as técnicas não poderia ser desprezada.

Outra dificuldade de adaptação, menos óbvia, é o fato de que as imagens de OCT não possuem um tempo de exposição definido. Como são adquiridas linha-a-linha, diferem de uma fotografia comum, onde todos os pixels são adquiridos simultaneamente, excitando o detector (ou CCD), durante um tempo específico. A técnica de LASCA, como demonstrado, é dependente deste tempo de exposição para o cálculo da velocidade, já que é a integração durante este tempo que causa a decorrelação espacial.

5.3.1 Materiais e Métodos / Softwares Desenvolvidos

Para contornar este problema, um novo software foi desenvolvido, um simulador de exposição, com um algoritmo bastante simples. Dada uma coleção de imagens sequenciais, o software gera uma nova imagem onde a intensidade de cada pixel é a média das intensidades deste pixel através de N imagens desta coleção. N neste caso é dependente do tempo de exposição que se deseja simular, bem como da taxa de aquisição das imagens da coleção, parâmetros que são informados manualmente através da interface gráfica. O número de imagens N é calculado como o quociente da divisão do tempo de exposição desejado pelo tempo de aquisição de uma única imagem (obtido através da taxa de aquisição). Uma vez que N é um número inteiro, caso o tempo de exposição informado não seja múltiplo (ou próximo de um múltiplo) do tempo de aquisição de uma imagem, a exposição simulada pode ser diferente da desejada.

Adicionalmente, este software pode fazer uma limiarização sobre a imagem simulada, gerando uma nova imagem. Nesta limiarização, dado um valor α , para qualquer pixel com um valor abaixo ou igual a α , seu novo valor será 0.

Caso o pixel tenha um valor maior que α , seu antigo valor será mantido. Este processo é bastante útil para suprimir o ruído de fundo, contudo a escolha de α deve ser feita com cuidado, uma vez que um valor muito alto pode resultar em perda de informações úteis, enquanto um valor muito baixo deixará resíduos de ruído indesejado. O simulador permite, portanto, que o usuário escolha, avaliando visualmente, uma área da imagem simulada que ele considere como ruído de fundo. A seleção da área é feita com o *mouse*, sobre a própria imagem. O software, então, calcula a intensidade média desta área indicada, e atribui o resultado a α .

O processo de simulação de exposição e limiarização são exemplificados na Figura 34.

Figura 34 - Ilustração do método para simular exposição e limiarização. Resultado 1 é obtido após simular exposição. Resultado 2 obtido a partir da limiarização do Resultado 1.

Também foi desenvolvido um programa com o algoritmo básico descrito por Briers e Webster para o LASCA. As velocidades finais não são computadas neste software, sendo a imagem final codificada apenas em função do contraste de speckle calculado.

Como indicado pelos autores da técnica de LASCA, o desvio padrão e média são calculados em pequenas janelas de pixels, o valor do contraste é atribuído ao pixel central, e a janela é deslocada para o pixel adjacente, sendo repetida de modo que cada pixel da imagem seja central à janela em uma iteração. O tamanho da janela pode ser controlado por interface gráfica.

O funcionamento deste algoritmo é ilustrado na Figura 35, onde uma janela de 3x3 pixels é utilizada.

Figura 35 - Ilustração da execução do algoritmo de LASCA.

Uma vez que a técnica exige um alto tempo de processamento, visto a quantidade de cálculos necessários para gerar uma única imagem, o software foi programado de modo a realizar parte destes cálculos em paralelo. O LabVIEW tem seu fluxo de dados, por padrão, paralelizado. Tirando proveito disso, a imagem é, internamente, dividida em cinco *arrays* bidimensionais, de modo que o contraste seja calculado de modo paralelo para cinco pixels diferentes a cada iteração do programa, agilizando o fluxo e diminuindo o tempo de processamento.

Por fim, uma imagem de LASCA é gerada a partir de uma escala de cinco cores falsas, cujos limiares são definidos manualmente, e podem ser

ajustados de imagem a imagem. As cores representam níveis de contraste e são: vermelha (contraste mais baixo), laranja, verde, azul e preta (contraste mais alto).

É possível, ainda, através de ferramenta programada no software, calcular o valor médio de contraste em qualquer região da imagem, através de seleção manual de tal região. A região é aproximada por uma área retangular, e o valor médio é calculado dentro desta área.

Com isto, foram realizados testes com imagens obtidas através do OCT (I). A primeira série de imagens consiste em uma tira de papel seda sendo puxada por entre outras duas folhas do mesmo papel, em direção longitudinal, em uma estrutura simples de alumínio, feita para evitar que os papéis superior e inferior tivessem contato com a tira central. Esta estrutura está na Figura 36. Esta tira era deslocada a uma velocidade constante e controlada por um translador micrométrico. Esta série de imagens foi utilizada para observar deslocamento de corpo sólido, sendo condizente com os experimentos realizados pelo simulador. Coleções de imagens sequenciais foram adquiridas para diversas velocidades diferentes de deslocamento da tira, a exemplo do que havia sido feito com as imagens simuladas.

A segunda série de imagens consiste em um fluxo de leite integral UHT passando por um microcanal com 400 μm de largura e 100 μm de altura. O fluxo foi controlado através de uma bomba microfluídica ExiGo (Cellix Ltd.). Este fluxo foi alterado de maneira conhecida, e coleções de imagens sequenciais foram adquiridas para estes diversos regimes. As coleções consistem de 50 imagens sequenciais obtidas através do sistema de OCT (I).

Figura 36 - Estrutura utilizada para realizar testes com papel seda.

5.3.2 Resultados e Discussão

O funcionamento do software foi testado utilizando-se como entrada para cálculo a mesma imagem da Figura 12, e o resultado obtido foi comparado com o resultado conhecido, obtido por um software proprietário (também presente na Figura 12). Ambos podem ser observados na Figura 37.

Figura 37 - Comparação do algoritmo de LASCA implementado em um software comercial (A) e em nosso software (B). Apesar da diferença na escala de cores, percebe-se que as imagens estão em acordo nas regiões de concentração de fluxo (vermelha em ambas).

É possível observar que os resultados são compatíveis, em especial ao analisar as áreas com baixo contraste (indicadas em vermelho em ambas as figuras), notavelmente as pontas dos dedos e a região adjacente ao polegar. Próxima a esta última, uma região de alto contraste também está em bom acordo entre as imagens (em preto na gerada pelo nosso software e em verde no software comercial).

Comprovada a funcionalidade do software, seguiu-se a análise das amostras obtidas com o sistema de OCT (I). Com o auxílio do software simulador de exposição, foram geradas imagens com exposição controlada para as diversas velocidades e fluxos amostrados. Deste modo, foi possível verificar se a flutuação de speckle nas imagens de OCT também dão origem a diferenças de contraste detectáveis pelo LASCA.

Foi descoberto que o ruído de fundo, com a simulação de exposição, acaba influenciando nos resultados. Este é um fator que torna inviável a aplicação do software LASCA nas imagens geradas, como o resultado na Figura 38 demonstra.

Figura 38 - Primeiros testes com LASCA, imagem do papel seda sendo deslocado. O ruído de fundo atrapalhou o algoritmo.

O que ocorre é que o ruído de fundo torna-se tão borrado quanto qualquer movimento amostrado na imagem, e o LASCA não é capaz diferenciá-lo. Foi decidido, portanto, aplicar uma limiarização adaptativa às imagens com

exposição simulada, a partir da ferramenta desenvolvida para esta finalidade no software. Como, em média, todo o ruído de fundo tem um valor de intensidade parecido, ao selecionarmos a média de qualquer região deste ruído podemos utilizá-la como limiar, e eliminar parte considerável de tal ruído. De fato, isto causa uma enorme diferença para o LASCA, como percebe-se na Figura 39, da mesma região, com a mesma simulação de exposição, e com os mesmos valores utilizados para gerar a escala de cores falsas da Figura 38, porém onde foi feita, antes da aplicação do LASCA, uma limiarização.

Figura 39 - Imagem gerada pelo software de LASCA para o deslocamento do papel seda, porém com uma limiarização anterior ao processamento.

Contornado este problema, foi possível prosseguir com os testes. Ressalta-se que, uma vez que todas as coleções de imagens foram adquiridas com a mesma taxa de aquisição, foi fixado um valor comum de tempo de exposição simulado. É possível ver resultados para quatro diferentes velocidades de deslocamento do papel seda na Figura 40. Foi utilizada uma janela de 7 X 7 pixels e os mesmos limiares para cores falsas em todas as análises.

Figura 40 - Quatro resultados do LASCA com limiarização para o papel seda. A) 10 $\mu\text{m/s}$. B) 50 $\mu\text{m/s}$. C) 100 $\mu\text{m/s}$. D) 150 $\mu\text{m/s}$.

Há um ruído grande na folha superior, que supõe-se ser decorrente de ruído de fundo que não pôde ser removido por limiarização. Contudo, excetuando esta região, o algoritmo realiza uma boa segregação entre áreas de movimento e áreas estáticas. No entanto, não é possível distinguir entre as diversas velocidades.

Percebe-se que a velocidade mais alta testada, 150 $\mu\text{m/s}$ (Figura 40 – (D)), apresenta, na região de movimento, diversas áreas com valor de contraste alto, em verde, em contraposição a velocidades mais baixas, como em 100 $\mu\text{m/s}$ (Figura 40 – (C)), onde quase a totalidade da área é apresentada em valores baixos de contraste, em vermelho. Este é um resultado contrário ao esperado, em que velocidades crescentes apresentariam níveis de contraste cada vez menores.

Figura 41 - Quatro resultados do LASCA com limiarização para o leite.

Na Figura 41 são apresentados os resultados para o fluxo de leite em um microcanal, variando-se a velocidade de fluxo.

Há ruído na região superior, proveniente da superfície do dispositivo com o microcanal, que supõe-se ser decorrente de pequenas vibrações, ruído este que não pôde ser removido por limiarização. Contudo, excetuando esta região, o algoritmo, novamente, realiza uma boa segregação entre áreas de movimento e áreas estáticas.

Percebe-se que o algoritmo faz uma boa discriminação de movimento de espalhadores, apresentando valores de menor contraste (vermelho) na região central do microcanal, e valores ligeiramente maiores, em laranja, verde e azul nas bordas do mesmo, o que é esperado, visto que fluxo é maior no centro do microcanal. Não é possível, no entanto, distinguir entre os diferentes fluxos amostrados.

Foi utilizado, então, o software para cálculo de valor médio de contraste na região do microcanal. Este cálculo foi realizado para os diversos fluxos volumétricos testados. Os resultados são apresentados na Figura 42. É possível perceber que os valores para todas as amostras são próximos, e não possuem relação aparente com os valores de fluxo.

Figura 42 - Gráfico demonstrando a relação entre o valor para o LASCA (u.a.) e fluxo (µl/min).

Argumenta-se que tal resultado, ocorrido nos dois experimentos, é proveniente do fato que a taxa de aquisição utilizada era demasiadamente baixa, deixando de manter qualquer correlação entre as imagens sequenciais que pudesse estar relacionada à velocidade de deslocamento do papel seda ou ao fluxo do leite. Deste modo, as sequências de imagens obtidas para quaisquer das velocidades seriam pontos isolados no tempo. E a média de intensidade de pontos isolados no tempo geraria um padrão de contraste parecido para todas as coleções de imagens obtidas.

5.3.3 Conclusões

Com este teste, foi possível avaliar uma importante técnica do campo do speckle – o LASCA – e tentar adaptar seu comportamento às imagens de OCT. Mesmo com o tratamento utilizado pelo software desenvolvido, tentando tornar as imagens de OCT mais próximas de uma imagem convencional adquirida via CCD, o algoritmo não apresenta o funcionamento adequado. Desta vez, não foram utilizadas simulações de movimento, para poder aplicar o tratamento de exposição em imagens reais adquiridas pelo sistema de OCT (I). Mesmo conseguindo distinguir regiões estáticas de regiões dinâmicas, o algoritmo não demonstra qualquer informação quantitativa de velocidade.

Foi percebida, no entanto, uma limitação fundamental na aquisição das imagens. Enquanto o sistema OCT (I) adquire as imagens a uma taxa de aquisição em torno de 20 frames por segundo (ou 20 Hz), uma CCD registrando a cena adquire todas as variações de intensidade ocorridas durante o tempo de exposição, integrando-as em seus pixels. A amostragem baixa aqui utilizada faz com que qualquer correlação existente nas variações de flutuação de intensidade seja perdida entre uma imagem e outra e, portanto, simular uma exposição a partir destas imagens “isoladas” torna-se improdutivo. Depois desta conclusão, fica evidente o motivo do LASCA não conseguir distinguir os diferentes regimes dos testes realizados.

5.4 Análise de Autocorrelação em imagens de OCT

Decorrente do estudo sobre LASCA em OCT, foram realizados experimentos sobre a autocorrelação do speckle nas imagens de OCT para tentar discernir movimentos internos à amostra. O argumento para esta abordagem provém do fato de que o LASCA utiliza o contraste de speckle integrado no tempo, pois conta com uma fotografia com exposição controlada. No entanto, é justamente esta integração no tempo que transforma uma estatística temporal, a autocorrelação das intensidades, que é onde a informação de velocidade está codificada, em uma estatística espacial, o contraste. Isto pode ser facilmente visto da Equação (30) à Equação (40).

Como o OCT possibilita obter diversas imagens sequenciais, sem tempo de exposição claramente definido, isto torna viável o cálculo da estatística diretamente no domínio temporal, como é feito, por exemplo, com Speckle Variance. Deste modo, é possível ter acesso direto à autocorrelação de intensidades, o que não é possível com uma imagem tradicional do LASCA, e transforma-se um empecilho em vantagem. É plausível, enfim, obter o valor de interesse para quantificação de velocidade, o tempo de decorrelação τ_c , através das Equações (35) e (36), sem ser necessário passar pela integração no tempo.

5.4.1 Materiais e Métodos / Softwares Desenvolvidos

O cálculo de autocorrelação tenta demonstrar o quanto um sinal está relacionado a ele próprio em outro momento no tempo. Para o cenário aqui explorado, o sinal é a intensidade de um pixel da imagem, e foi desenvolvido um software para analisar suas flutuações através do tempo.

O algoritmo foi baseado na relação clássica para cálculo de autocorrelação, já expressa na Equação (34), mas que pode ser escrita de forma mais clara para as imagens como:

$$Autocorr_{i,j} = \frac{\langle I_{i,j,x} I_{i,j,x+1} \rangle}{\langle I_{i,j} \rangle^2} \quad (47)$$

Onde i e j são os índices do pixel; x é o número sequencial de uma determinada imagem; e $\langle \rangle$ é a média através de todas as imagens em questão.

A nova imagem é gerada normalizando-se os valores de autocorrelação para apresentação. Este algoritmo é ilustrado na Figura 43.

Figura 43 - Ilustração do algoritmo de autocorrelação desenvolvido.

A exemplo do que foi feito no software simulador de exposição, o novo software também conta com a funcionalidade de limiarização para um valor

específico e que pode ser alterado manualmente, a fim de facilitar a visualização. Os valores reais de autocorrelação são preservados, entretanto, no *array* interno - este *array* não sofre limiarização nem normalização.

Adicionalmente, o software oferece a possibilidade de calcular a média dos valores de autocorrelação em uma determinada região da imagem, que o usuário pode selecionar, como no caso do software para LASCA.

Novamente, utilizamos a coleção de imagens com diversas velocidades de deslocamento de uma tira de papel seda, montado sob a estrutura da Figura 36, bem como leite UHT integral bombeado por um microcanal com 400 μm de largura e 100 μm de altura sob diversos fluxos volumétricos. Tais coleções haviam sido previamente adquiridas para testes com o LASCA, como indicado na Seção 5.3.

5.4.2 Resultados e Discussão

Os resultados para quatro diferentes velocidades, para a tira de papel seda, após uma limiarização manual das imagens, podem ser vistos na Figura 44. Imagens foram obtidas com a autocorrelação através de 50 imagens sequenciais.

Figura 44 - Quatro resultados do software de autocorrelação para o papel seda. A) 10 $\mu\text{m/s}$. B) 50 $\mu\text{m/s}$. C) 100 $\mu\text{m/s}$. D) 150 $\mu\text{m/s}$.

É nítida a capacidade de identificação de movimentos existentes nas imagens, sendo possível isolar apenas as áreas onde há deslocamento, com pouco ruído das folhas de papel superior ou inferior. Isto demonstra que a autocorrelação calculada diretamente é uma alternativa mais atraente quando comparada à exposição simulada. Há ainda um pouco de ruído esparsos de fundo, resultado das flutuações aleatórias do *background noise*. Novamente, entretanto, não é identificável nenhuma relação entre as diferentes velocidades e os valores de autocorrelação.

Figura 45 - Quatro resultados do software de autocorrelação para o leite.

Na Figura 45, onde é possível ver os resultados da autocorrelação para as imagens com fluxo de leite, há também uma boa distinção entre regiões com fluxo e regiões estáticas, com algum ruído da parte superior do dispositivo microfluídico, a exemplo do que havia sido observado com o LASCA.

Novamente, entretanto, não é identificável nenhuma relação entre os diferentes fluxos e os valores de autocorrelação. As imagens são visualmente parecidas, e os valores de limiarização utilizados foram os mesmos, o que sugere que a técnica não possibilita diferenciar entre os regimes.

Para confirmar isto, foi utilizada a ferramenta desenvolvida com o software para cálculo de média em uma região da imagem, e os valores médios de autocorrelação nas regiões de movimento identificadas nas imagens com fluxo

de leite foram calculados. O gráfico da Figura 46 mostra este valor médio em função do fluxo. Como pode ser percebido, a função resultante dos pontos do gráfico não é injetora, como seria de se esperar, já que cada valor de autocorrelação deveria identificar uma velocidade específica. Tampouco o gráfico demonstra qualquer correlação entre os diferentes fluxos volumétricos e os valores calculados.

Figura 46 - Gráfico demonstrando a relação entre autocorrelação (u.a.) e fluxo (µl/min).

Novamente, a exemplo do ocorrido com o LASCA, a taxa de aquisição foi o fator limitante para a técnica. Como comentado anteriormente, após análise do sinal amostrado nas imagens, é plausível depreender que o atraso de aquisição entre uma imagem e a seguinte é demasiado grande para que estas estejam correlacionadas, e se tornam amostras independentes. Argumenta-se, portanto, que variações de frequências mais altas do que metade da taxa de aquisição utilizada (segundo o teorema de Nyquist) não têm amostras significativas, e o espectro de intensidades do sinal não é corretamente adquirido. As informações de velocidade que deveriam estar contidas em tal espectro são perdidas, e pós-processamento não é capaz de restaurá-las.

O tempo de decorrelação varia com o tamanho do feixe e coeficiente de espalhamento da amostra, portanto não é trivial saber exatamente qual o tempo de decorrelação para as amostras, mas pode-se observar na literatura

cálculos demonstrando que, para suspensões de microesferas de poliestireno, este tempo é da ordem de poucos milissegundos⁴⁹. Outros estudos sugerem a necessidade de taxas de aquisição na ordem de kilohertz para acompanhar as flutuações temporais do speckle de superfície⁵⁰. Tais exigências não conseguem ser atendidas pela taxa de aquisição até então utilizada.

Assim sendo, conhecido este fato, não causa espanto que ambas as técnicas - LASCA e Autocorrelação - tenham falhado em distinguir os diferentes movimentos neste cenário. Contudo, continuam sendo capazes, como o speckle Variance, de diferenciar as regiões estáticas de dinâmicas.

5.4.3 Conclusões

Novamente, o teste realizado forneceu informações importantes para o presente trabalho, bem como permitiu ganhar certa intuição sobre a evolução das intensidades nas imagens de OCT. A exemplo do realizado com o LASCA, foi objetivada a adaptação de uma técnica já conhecida a um alvo novo – imagens de OCT. Este trabalho foi realizado paralelamente aos experimentos com LASCA, para permitir a comparação de resultados entre as duas abordagens: temporal e espacial. Por tal motivo, as amostras analisadas foram as mesmas, e com a mesma motivação. No entanto, ainda que a abordagem seja aplicável para segregar regiões dinâmicas de estáticas, novamente a técnica falhou em obter qualquer tipo de distinção para diferentes regimes de amostra. Foi por causa da análise de intensidades feita neste trabalho, e da pouca coerência dos resultados de autocorrelação obtidos, que a falha com a taxa de amostragem do sistema utilizado foi percebida. Supõe-se o tempo de decorrelação de sinal do speckle ser menor do que o intervalo entre a aquisição de imagens, de maneira que estas se tornam decorrelacionadas. Assim, a tentativa de análise de autocorrelação nestas amostras torna-se improdutiva, o que motivou a melhora do sistema de aquisição de sinais de OCT aplicado ao decorrer deste trabalho.

6. AUTOCORRELAÇÃO DO SINAL DE OCT

Evidenciada pelos testes realizados com autocorrelação e aplicação do LASCA em imagens de OCT, uma limitação importante na abordagem até então utilizada neste trabalho é a baixa taxa de aquisição obtida pelos softwares comerciais disponíveis juntamente aos sistemas OCT (I) e (II). Conforme a análise anteriormente exposta, o estudo sobre as propriedades de autocorrelação do sinal de OCT foi continuado, objetivando-se, ainda, obter as informações referentes ao tempo de decorrelação do speckle e, deste modo, informações de velocidade de fluxo. Para tanto, uma taxa de aquisição mais elevada se fez necessária, de modo que nos permitisse uma amostragem adequada das flutuações de intensidade.

Os softwares comerciais desenvolvidos para operar juntamente com os sistemas de OCT presentes no laboratório não forneciam a possibilidade de taxas de aquisição significativamente maiores. Visando resolver este problema, foi montado um sistema de OCT próprio no laboratório, para que fosse possível ter controle sobre todo o equipamento, e adaptá-lo a quaisquer necessidades.

6.1 Sistema de OCT Desenvolvido

Como fonte de luz, foi utilizado o mesmo laser swept-source presente no sistema OCT (II), juntamente com o interferômetro do tipo Michelson Thorlabs INT-MSI-1300, operável nos comprimentos de onda de 1250-1350 nm. A saída foi acoplada a uma placa de aquisição National Instruments PCI 5122. A Figura 47 demonstra o arranjo montado.

Foi desenvolvido, ainda, um software dedicado à aquisição de sinais, em ambiente LabVIEW, otimizado para que fosse possível adquirir amostras do sinal de OCT com taxa maior que aquela apresentada pelos sistemas comerciais. Tal software permitiu obter o sinal de interferência a uma taxa de 8 kHz, limitada apenas pela varredura do laser, a 16 kHz. O número de aquisições pode ser controlado via software.

Figura 47 - Arranjo de OCT montado para o projeto. A fonte de laser fornece duas saídas para o interferômetro, uma com o laser swept source e outra com o laser guia. LF = Lentes Focalizadoras.

Este software controla a placa de aquisição PCI 5122 através dos *drivers*[§] disponíveis para a plataforma LabVIEW. O software gerencia três entradas da placa: uma entrada para o *trigger* do laser, uma entrada para o sinal do Interferômetro Mach-Zehnder (MZI), acoplado à fonte laser, e uma última entrada para o sinal de OCT.

A aquisição é controlada pelo *trigger*, tanto para o sinal do MZI quanto para o sinal do OCT. O software primeiro lida com o MZI, no entanto. Como comentado na Seção 3.1.1 deste trabalho, para um sistema de FD-OCT a variável independente de interesse é k , o número de onda, pois em função dele é possível perceber as variações periódicas do sinal de OCT, relacionadas à profundidade de retroespalhamento do sinal. A varredura por diversos comprimentos de onda (e, portanto, diversos k) feita pelo laser não é uniforme no tempo. Contudo, a aquisição do sinal de OCT é uniforme no tempo, o que a torna não-uniforme no domínio k . Para que seja possível realizar a Transformada Rápida de Fourier no

[§] Um *driver* de dispositivo é um programa de computador que se comunica diretamente com um hardware, e fornece uma interface de acesso ao mesmo.

signal, é necessário que ele seja igualmente espaçado em k ⁵¹. Diversas técnicas são propostas para ajustar o sinal de OCT, baseadas em informações da varredura do laser extraídas por Interferômetros Fabry-Perot (FPI) ou MZI⁵². A abordagem utilizada neste projeto tem base no sinal de MZI, como feito em outros trabalhos do nosso grupo⁵³.

No sinal interferométrico do MZI do laser, as passagens pelo valor zero são igualmente espaçadas no espaço k . Encontrando as posições no tempo em que estes pontos ocorrem, e tendo conhecimento do espectro da fonte laser, é possível fazer uma interpolação (neste trabalho foi utilizada uma interpolação Spline) e obter uma nova escala, no domínio k e igualmente espaçada. Com esta nova escala, pode-se ajustar o interferograma do OCT através de uma nova interpolação Spline.

O procedimento para gerar esta escala é feito uma única vez, logo ao iniciar o software, e a mesma é salva em memória, para que possa ser utilizada durante todo o decorrer do programa. A escala também é salva em disco, caso o sinal de MZI não esteja disponível ou a calibração não seja necessária. Desta maneira, o programa pula a etapa de gerar a escala, e apenas lê e carrega na memória aquela já existente.

Após este primeiro passo, o software fornece a possibilidade de ajustar quantas aquisições devem ser feitas, e qual o tamanho de cada aquisição. Uma vez ajustadas as configurações, o software começa as aquisições e exibe uma tela de confirmação. Esta tela pode ser exibida de duas maneiras, dependendo da escolha do usuário.

A primeira opção para a confirmação é a exibição, em tempo real, de A-Scans sendo adquiridos da amostra. Através desta tela é possível ajustar a posição da amostra sendo estudada, e garantir que os A-Scans estão sendo obtidos da região de interesse.

A segunda opção é a exibição de um conjunto de 100 A-Scans adquiridos sequencialmente, com a maior taxa de aquisição possível. Nestes A-Scans o usuário pode selecionar um ponto de interesse e observar o comportamento de sua intensidade no tempo, ao longo das 100 aquisições, podendo avaliar se há algum tipo de perturbação externa à amostra no sinal. Estes conjuntos de 100 A-Scans são adquiridos e exibidos continuamente.

Em qualquer um dos casos, quando o usuário clica no botão confirmar, a tela é encerrada, e o programa se dedica exclusivamente à aquisição dos interferogramas do OCT, até alcançar o número de aquisições desejado.

Os sinais interferométricos só são processados em A-Scans após todas as aquisições terem sido completadas, para que a taxa de amostragem não seja afetada. O sistema não permite de maneira automática, no entanto, a obtenção de B-Scans, visto que não é feita uma varredura lateral do feixe. Para obter um B-Scan, assim, é necessário acoplar a amostra a um translador, e movimentá-la enquanto a aquisição é realizada.

O fluxograma deste software pode ser encontrado no Apêndice A.

6.2 Ajuste Do Algoritmo

Com a taxa de amostragem significativamente superior, foi possível desenvolver um novo software de análise. Derivado do que foi descoberto através dos testes anteriores, a análise tem por base a autocorrelação do sinal de OCT. Como disposto na Seção 3.2.3, o speckle presente no OCT se comporta como descrito por Goodman²³. Portanto, argumenta-se ser possível diferenciar velocidades de fluxo através do speckle de OCT, baseado no que é conhecido de outras técnicas que empregam análise speckle. Essa análise consiste em verificar as flutuações de intensidade do padrão de speckle de um determinado ponto em intervalos bem curtos, de modo que esta intensidade ainda esteja correlacionada nas amostras sequenciais, e não seja um ponto independente no tempo (que dependa de um espalhador completamente diferente, por exemplo). A exemplo do que foi desenvolvido anteriormente, estas flutuações serão analisadas através da autocorrelação do sinal.

O usuário escolhe um pixel p do A-Scan, e o algoritmo o observa em janelas de N A-Scans consecutivos no tempo - assumindo que os A-Scans são da mesma região da amostra, ou seja, não houve varredura do feixe nem da amostra. Para entender o cálculo realizado, reescreve-se o cálculo de autocorrelação, já conhecido da Equação (47), como segue:

$$Autocorr_{p,\tau} = \frac{\langle I_{p,t} I_{p,t+\tau} \rangle}{\langle I_p \rangle^2} \quad (48)$$

Notavelmente, a intensidade agora depende de um único índice p , pois se trata de um A-Scan (um *array* unidimensional), não mais uma imagem. Além disso, acrescenta-se um novo parâmetro τ , que representa o atraso sobre o qual a autocorrelação está sendo calculada. Na Equação (47) este valor era fixado em 1, enquanto na Equação (48) este valor é parâmetro de entrada para a função, podendo variar. Ressalta-se que $\langle \rangle$ é a média através de todos os A-Scans em questão. Considerando-se um conjunto de N A-Scans, obtém-se:

$$Autocorr_{p,\tau} = \frac{\sum_{t=0}^{N-1} I_{p,t} I_{p,t+\tau} / N}{\sum_{t=0}^{N-1} I_p^2 / N} \quad (49)$$

Subtrai-se para cada valor de I_p seu valor médio temporal de intensidade, $\langle I_p \rangle$, para que sejam consideradas apenas as flutuações de intensidade. Além disso, não mais interessa a média dos valores, apenas em sua somatória. Resulta, então:

$$Autocorr_{p,\tau} = \frac{\sum_{t=0}^{N-1} (I_{p,t} - \langle I_p \rangle) (I_{p,t+\tau} - \langle I_p \rangle)}{\sum_{t=0}^{N-1} (I_{p,t} - \langle I_p \rangle)^2} \quad (50)$$

Deste modo, a partir da Equação (50), é possível obter o valor de autocorrelação para um ponto p , e um determinado atraso τ em uma janela de N amostras. Ao variar este atraso, viabiliza-se montar um vetor de valores de autocorrelação. Chamamos $Autocorr_{p,\tau}$ de $g(p, \tau)$ e descreve-se:

$$W = [g(p, 0), g(p, 1), \dots, g(p, N - 1)] \quad (51)$$

Onde W é o um vetor de autocorrelações de atrasos crescentes. É esperado que, para um atraso de $\tau = 0$, a correlação seja total, de modo que o valor resultante é $g(p, 0) = 1$. Conforme este atraso aumenta, quanto mais flutuações tiver o sinal, menor será o valor de $g(p, \tau)$. O algoritmo calcula este vetor W .

Este algoritmo é ilustrado pela Figura 48.

Figura 48 - Algoritmo de autocorrelação para o sinal de OCT. A figura demonstra o vetor W sendo montado através de diversas iterações.

Como anteriormente, espera-se que as flutuações decorrentes do *time-varying speckle* influenciem a autocorrelação do sinal. Deste modo, quanto maiores as flutuações, mais rapidamente o valor de autocorrelação irá diminuir ao longo do vetor W .

Este algoritmo foi implementado na linguagem de programação Java, pela melhor performance de acesso a arquivos quando comparada ao LabVIEW.

6.3 Analisando Diferentes Fluxos

6.3.1 Materiais e Métodos

Foram utilizados microcanais de 400 μm de largura e 100 μm de altura, como utilizados anteriormente, juntamente com a bomba microfluídica ExiGo para gerar fluxos controlados. Para a amostra a ser bombeada utilizou-se leite integral UHT, por ser um meio altamente espalhador.

O leite foi submetido a diversos regimes de fluxo, sendo bombeado através do microcanal. Um ponto no centro do microcanal era amostrado com o sistema de OCT acima descrito, coletando-se A-Scans deste ponto a 8 kHz.

Os A-Scans foram, então, submetidos ao algoritmo para calcular o vetor de autocorrelação. Cada vetor de autocorrelação foi calculado com um N de 1024.

6.3.2 Resultados e Discussão

O gráfico mostrando a média de cinco vetores de autocorrelação para o fluxo volumétrico de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ pode ser observado na Figura 49.

Figura 49 - Gráfico mostrando o valor de autocorrelação em função do atraso temporal (τ) para o leite integral sob fluxo volumétrico de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Vale ressaltar, em primeiro momento, que o gráfico apresenta o vetor de autocorrelação apenas até o atraso temporal de $\tau = 3,11 \times 10^{-2}$ segundos (250 A-Scans). Isto se deve ao fato de, após o valor de autocorrelação cair para zero (aproximadamente em $3,63 \times 10^{-3}$ segundos ou 30 A-Scans), ele permanece em torno deste valor apenas com pequenas flutuações. Ou seja, as amostras não são

mais correlacionadas. Deste modo, para melhorar a visualização do gráfico, apresenta-se aqui apenas parte do vetor, que contém informações relevantes.

O comportamento dos valores de autocorrelação seguiu o esperado, diminuindo com o aumento do atraso temporal, até tornar-se decorrelacionado. Percebe-se, através das barras de erro, que a variação entre os cinco vetores calculados foi baixa, o que é um bom indicativo para a confiabilidade da técnica. Outra análise feita sobre estes dados foi a verificação do seu espectro de potência. O espectro de potência pode ser calculado com a transformada de Fourier do vetor de autocorrelação, e indica a intensidade com que cada uma das frequências amostradas contribui para o sinal. É possível, portanto, verificar se as frequências com maior contribuição foram amostradas corretamente, ou se há frequências com intensidade significativa sendo perdidas. Assim, pode-se avaliar se a taxa de amostragem é suficiente para o sinal estudado. O espectro de potências para o fluxo volumétrico de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ é apresentado na Figura 50.

Figura 50 - Densidade de Espectro de Potência para o fluxo volumétrico de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Um ponto a ser notado na Figura 50 é que a extensão de frequências chega até 4 kHz. Isto decorre do teorema de Nyquist, uma vez que a taxa de aquisição utilizada foi de 8 kHz. Observando-se, agora, o decaimento de potência, percebe-se que a curva cai para valores bem próximos de zero ainda antes de 1,5 kHz e, a partir daí, as frequências não mais contribuem de maneira significativa para o sinal amostrado. Como 1,5 kHz está dentro da variedade de frequências corretamente amostradas pelo sistema, argumenta-se que a taxa de aquisição é adequada.

Com a amostragem do novo sistema sendo suficiente, pode-se voltar a analisar a Figura 49 e perceber que as amostras se tornam decorrelacionadas após um atraso de aproximadamente $3,63 \times 10^{-3}$ segundos, o que exige uma taxa de amostragem, para esta velocidade de fluxo, em torno de 276 Hz - apenas para obter amostras minimamente correlacionadas, sem levar em consideração o espectro de potência. Isto corrobora para a argumentação sobre as técnicas previamente abordadas (LASCA e Autocorrelação de imagens do OCT), visto que esta taxa de aquisição é muito maior do que a taxa máxima obtida com os softwares comerciais, em torno de 30 Hz.

Após a análise do espectro de potência para o fluxo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, outros fluxos volumétricos foram amostrados e analisados. A Figura 51 contém um gráfico com a curva de decaimento da autocorrelação para diferentes fluxos testados. Todas as curvas representam a média de 5 vetores de autocorrelação.

Figura 51 - Gráfico mostrando o valor de autocorrelação em função do atraso temporal (τ) para o leite integral sob diversos fluxos volumétricos.

Como é possível notar, as curvas têm decaimentos diferentes, entre os diferentes fluxos. Este comportamento era esperado, e é um resultado importante para o presente trabalho. A Figura 51 demonstra que a autocorrelação do sinal está se comportando de maneira distinta entre os fluxos, se decorrelacionando

mais rapidamente (curva mais acentuada) para fluxos maiores, com maiores flutuações do sinal no tempo. Para fluxos menores, esta decorrelação acontece de forma mais lenta. Desta maneira, é possível distinguir entre os diferentes fluxos através da análise do vetor de autocorrelação. As curvas se confundem após diminuírem para valores próximos a zero, quando não há mais correlação nos sinais. Isto ocorre para todos os fluxos, o que faz com que as curvas se sobreponham.

Para tornar mais visível a diferença entre os fluxos, e criar um parâmetro quantitativo, assim definiu-se um tempo de decorrelação, que indica a partir de qual atraso temporal as amostras deixam de estar correlacionadas. Este tempo de decorrelação é aqui definido como o tempo que leva para que o valor de autocorrelação caia para $1/e$ de seu valor inicial, onde e é o número de Euler. O gráfico da Figura 52 apresenta estes novos resultados.

Figura 52 - Tempo de decorrelação calculado para diferentes fluxos volumétricos.

Fluxos que são apresentados na Figura 52, e não constam da Figura 51 foram propositalmente omitidos, para que a visualização das curvas de decaimento fosse facilitada. É possível, nesta nova análise, observar nitidamente a tendência de decréscimo para o tempo de decorrelação, conforme o aumento do fluxo, explicitando a capacidade desta abordagem em diferenciar os fluxos.

Apesar de não apresentar diferença estatística entre regimes de fluxos próximos, especialmente com fluxos mais altos (como 10 $\mu\text{l/min}$ e 12 $\mu\text{l/min}$), ainda é possível diferenciá-los em intervalos maiores (7 $\mu\text{l/min}$ e 12 $\mu\text{l/min}$).

A tendência de decréscimo dos valores de decorrelação apresenta um comportamento próximo a um decaimento exponencial, no entanto não é possível afirmar que este seja um modelo adequado. Não foi encontrado na literatura um modelo relacionando a decorrelação de speckle em OCT a valores de fluxo volumétrico. O desenvolvimento de um modelo para esta finalidade está além do escopo do presente trabalho, e fica como trabalho futuro a ser desenvolvido.

O valor de decorrelação para o fluxo de 2 $\mu\text{l/min}$ não segue a tendência exponencial dos demais valores, o que pode ser oriundo de uma falha do experimento, mas pode, em contrapartida, estar relacionado a uma mudança de regime predominante na amostra, discussão que será abordada na seção 6.4.

Foi realizada a análise de espectro de potência para o maior fluxo desta série de experimentos (12 $\mu\text{l/min}$) e o resultado é apresentado abaixo, na Figura 53.

Figura 53 - Densidade de espectro de potência para o fluxo volumétrico de 12 $\mu\text{l/min}$.

É possível notar diferenças significativas entre o espectro de potência de 12 $\mu\text{l/min}$ e 5 $\mu\text{l/min}$ (Figura 50), em especial na contribuição das frequências abaixo de 500 Hz, que se torna menos significativa para o fluxo maior. Há, conseqüentemente, um alargamento do espectro, com o decaimento de potência para valores próximos a zero ocorrendo apenas em frequências após 2 kHz. No entanto, pode-se perceber que as frequências com maior contribuição para o sinal estão, novamente, no início do espectro, e são corretamente amostradas pelo

sistema. As frequências mais altas, que poderiam sofrer subamostragem, não são significativas. Portanto, mesmo para o regime mais alto imposto ao sistema, a taxa de aquisição permaneceu adequada.

Visto isto, foram realizadas novas medidas para testar dos limites do sistema e o algoritmo proposto, amostrando regimes de fluxos maiores e repetindo a análise feita anteriormente, para avaliar se ainda é possível diferenciá-los. Resultados para dois destes fluxos são expostos na Figura 54.

Figura 54 - Tempo de decorrelação calculado para os fluxos de 30 µl/min e 50 µl/min.

A ausência de barra de erros na Figura 54 deve-se ao fato de que, para as cinco medidas realizadas, tanto para 50 µl/min quanto para 30 µl/min, os tempos de decorrelação calculados foram os mesmos, assim o desvio da média foi zero. Como esperado, contudo, os valores de decorrelação são menores do que os fluxos previamente amostrados, comprovando a proporção inversa entre fluxo volumétrico e tempo de decorrelação. Mesmo apresentando fluxos muito maiores aos anteriormente testados, ainda é possível diferenciá-los. No entanto, os dois regimes amostrados apresentam uma diferença de fluxo de 20 µl/min, enquanto a diferença entre os tempos de decorrelação calculados para estes é de apenas $1,25 \times 10^{-4}$ segundos, o que, com a taxa de amostragem utilizada, equivale à resolução temporal do sistema, ou seja, a menor diferença temporal que o

sistema é capaz de detectar. Isto significa que quaisquer regimes de fluxo entre estes dois valores não poderiam ser discriminados.

Fato parecido ocorre quando se leva em consideração os regimes de 12 $\mu\text{l/min}$ e 30 $\mu\text{l/min}$. A diferença entre os tempos de decorrelação calculados para estes dois fluxos é de apenas $2,8 \times 10^{-4}$ segundos, pouco mais de duas vezes a resolução temporal do sistema, mesmo com a diferença de fluxo volumétrico entre ambos sendo 18 $\mu\text{l/min}$. Esta diferença no tempo de decorrelação é próxima à calculada para 5 $\mu\text{l/min}$ e 7 $\mu\text{l/min}$, $2,63 \times 10^{-4}$ segundos, fluxos separados por apenas 2 $\mu\text{l/min}$. Isto demonstra que o sistema ainda possui um limitante imposto pela taxa de aquisição, o que o torna apropriado para regimes de fluxos menores, principalmente abaixo de 10 $\mu\text{l/min}$. O sistema ainda é capaz de diferenciar fluxos maiores, porém com baixa resolução.

Como realizado nos testes anteriores, foi calculado o espectro de potência para a velocidade de 50 $\mu\text{l/min}$, para analisar a resposta do sistema em relação ao maior fluxo imposto ao sistema. Este espectro está contido na Figura 55.

Figura 55 - Densidade de espectro de potência para o fluxo volumétrico de 50 $\mu\text{l/min}$.

Notavelmente, a contribuição de frequências abaixo de 500 Hz torna-se menos significativa quando comparada aos casos de 5 $\mu\text{l/min}$ ou 12 $\mu\text{l/min}$. A curva possui um decaimento lento ao longo das frequências, o que não ocorria com os fluxos testados anteriormente. Ainda mais relevante é a constatação de que o valor da curva não mais diminui a 0. A curva se estabiliza após 3 kHz, e mesmo as frequências mais altas, como 4 kHz, continuam significativas para o

sinal. Isto indica que o sinal deste fluxo pode possuir frequências mais altas do que o sistema é capaz de amostrar e, portanto a taxa de aquisição utilizada deixa de ser apropriada.

Os limites de detecção experimentados são oriundos do sistema de aquisição, e não do método utilizado.

É possível, ainda, avaliar os resultados obtidos em função da velocidade de fluxo, calculada a partir do fluxo volumétrico através da seguinte relação:

$$Q = A \cdot v \cdot \cos \theta \quad (52)$$

Q é o fluxo volumétrico, A é a área sobre a qual o fluído flui, e θ é o ângulo em relação à direção perpendicular a A em que o fluído flui. Se for considerada a área perpendicular ao fluído, em que $\theta = 0$, é possível simplificar:

$$Q = A \cdot v \quad (53)$$

E, portanto:

$$v = \frac{Q}{A} \quad (54)$$

Para o caso estudado, a área perpendicular ao fluído é calculada através da altura e largura do microcanal, e o valor obtido é de $4 \times 10^{-8} \text{ m}^2$. Considerando a gama de fluxos volumétricos até $10 \text{ } \mu\text{l/min}$, em que o sistema apresentou melhor desempenho, as velocidades amostradas variam de, aproximadamente, $0,42 \text{ mm/s}$ até $4,17 \text{ mm/s}$. Estes valores estão dentro da gama de velocidades apresentadas pelo fluxo sanguíneo capilar da pele humana⁵⁴, importante área de aplicações biológicas para o OCT, bem como fluxo capilar do cérebro e músculos de ratos⁵⁵.

6.4 Análise Com Movimento Browniano

Com as análises realizadas, portanto, é possível ter uma estimativa sobre os limites superiores, para a detecção de fluxo volumétrico, da técnica aplicada juntamente ao sistema de OCT desenvolvido. Para determinar os limites inferiores, entretanto, uma nova abordagem foi utilizada, com amostras sem fluxo,

e sim com movimento Browniano – movimento que é observado em partículas nanométricas ou micrométricas quando suspensas em um fluido, em decorrência de interações com as moléculas deste último, que apresentam agitação térmica⁵⁶. A função de autocorrelação para movimento Browniano no OCT, dada uma solução monodispersa de partículas esféricas, como modelada por Farhat *et al.*⁵⁷, apresenta-se como uma exponencial negativa. Mais interessante é o seu tempo de decorrelação, τ_d , que pode ser expresso⁵⁷:

$$\tau_d = \frac{1}{2 \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right)^2 D} \quad (55)$$

Onde λ é o comprimento de onda central da luz incidente, e D é o coeficiente de Difusão, descrito como:

$$D = \frac{K_b T}{6\pi\eta R} \quad (56)$$

Sendo K_b a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do fluido e R o raio das partículas. O tempo de decorrelação é, portanto, inversamente proporcional à temperatura do fluido. Assim, quanto maior a temperatura, mais rapidamente diminuem os valores de autocorrelação em função do atraso.

No novo teste, com isto exposto, tentou-se verificar diferenças nos vetores de autocorrelação, utilizando uma mesma amostra com movimento browniano, variando apenas a sua temperatura, para testar os limites inferiores do sistema.

6.4.1 Materiais e Métodos

Como amostras, foram utilizadas micropartículas de poliestireno de 500 nm de diâmetro, diluídas em água deionizada. A amostra é um padrão desenvolvido pela empresa Moor Instruments, utilizada para calibração de sistemas de imageamento speckle.

Para variar a temperatura, as amostras foram colocadas em um tubo de alumínio com diâmetro interno de 75 mm e altura de 230 mm, e refrigeradas em banho-maria com gelo. A temperatura das amostras foi acompanhada através de um termômetro infravermelho, e as medidas só foram realizadas após a

estabilização desta temperatura, o que ocorreu a 5°C. As demais medidas foram realizadas em temperatura ambiente, 24°C.

O método de análise utilizado para fluxo foi repetido, obtendo amostras a uma taxa de 8 kHz, utilizando-se um N de 1024 e calculando a média de 5 vetores de autocorrelação.

6.4.2 Resultados e Discussão

As curvas de decaimento da autocorrelação são exibidas na Figura 56. Novamente, o resultado obtido é um indicador positivo para a técnica, seguindo o valor esperado pelo modelo expresso na Equação (56), já que a curva de decaimento para a amostra refrigerada (5°C) sofre uma decorrelação mais lenta quando comparada à curva para a temperatura ambiente (24°C), indicando menos movimento dos espalhadores amostrados. Assim, mesmo para movimento browniano, é possível discernir o comportamento de uma mesma amostra em diferentes temperaturas. Isto possibilita uma variedade de aplicações para o OCT, uma vez que é possível, pelo coeficiente de difusão e um modelo teórico como o proposto por Farhat⁵⁷, identificar diversos aspectos de uma solução monodispersa, tal como o tamanho das partículas.

Foram calculados, ainda, os tempos de decorrelação para as duas amostras de movimento browniano, mostrados na Figura 57.

Figura 56 - Gráfico mostrando o valor de autocorrelação em função do atraso temporal para a solução de microesferas de poliestireno nas temperaturas de 5°C e 24°C.

Figura 57 - Tempo de decorrelação calculado para as microesferas de poliestireno para as temperaturas de 5°C e 24°C.

Como esperado pelas curvas de autocorrelação, os tempos de decorrelação variam para as duas temperaturas amostradas, sendo que o maior tempo foi resultante da medida à temperatura de 5°C. Tal resultado indica que as variações no movimento browniano, dependentes da temperatura, podem ser discriminadas pelo OCT.

Contudo, outra observação é válida para estes resultados. O tempo de decorrelação médio calculado para o movimento browniano das microesferas à temperatura ambiente é de $2,53 \times 10^{-3}$ segundos, enquanto aquele calculado para o fluxo de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ é de $2,64 \times 10^{-3}$ segundos. Com os desvios padrões, entretanto, os dois valores não são estatisticamente diferentes. Uma justificativa para tal resultado é de que a 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ o fluxo é muito baixo, de maneira que o movimento browniano ainda é o regime predominante. Assim, os valores se referem ao mesmo comportamento. O valor de decorrelação para o fluxo de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, que não segue o comportamento dos demais valores, pode ser oriundo da mudança de regime predominante na amostra, em que o fluxo imposto pelas bombas microfluídicas passa a prevalecer.

O algoritmo proposto, portanto, é válido para fluxos baixos, incluindo movimento browniano. No presente trabalho, porém, não foram testadas outras temperaturas para este regime, visto que o foco era caracterizar os diferentes fluxos. Mas foi possível demonstrar que para uma diferença grande de temperatura (aproximadamente 20°C) o sistema se mostrou capaz de diferenciar o comportamento da amostra.

6.5 Análise Com Diferentes Diluições

Para compreender melhor o comportamento do algoritmo proposto, ainda outro teste foi realizado, visando a sensibilidade à concentração de espalhadores.

Como foi descrito na Seção 3.1.1, o sinal de OCT é baseado no retroespalhamento de fótons por espalhadores internos à amostra. Além disso, o comportamento de speckle é inteiramente dependente do movimento destes espalhadores, bem como a formação do *fully developed* speckle depende da quantidade destes espalhadores. No entanto, as flutuações de intensidade derivam, principalmente, do tempo de trânsito dos espalhadores pelo volume de

interesse, portanto não é esperado que haja influência da concentração de espalhadores para o tempo de decorrelação. Objetivou-se, desta maneira, verificar se a diluição de uma amostra pode influenciar a autocorrelação do speckle e, por consequência, influenciar o resultado do algoritmo proposto.

Foi feito um teste para diferentes concentrações de espalhadores submetidos a um mesmo fluxo volumétrico, e observadas suas curvas de autocorrelação.

6.5.1 Materiais e Métodos

Para as amostras foi utilizado, novamente, o leite integral UHT. Para variar a concentração, o leite foi diluído em água em diferentes proporções, e cada uma delas foi avaliada através do sistema de OCT. O leite foi bombeado por um microcanal com 400 μm de largura e 100 μm de altura, e o fluxo controlado através de microbomba ExiGo. O fluxo escolhido foi de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, por estar dentro dos limites testados para o sistema e por ser corretamente amostrado, como citado anteriormente. A aquisição continuou a uma taxa de 8 kHz, e o N utilizado foi 1024.

6.5.2 Resultados e Discussão

Os tempos de decorrelação calculados para diferentes diluições em água são apresentados na Figura 58. A quantidade de água acrescentada ao leite é indicada em porcentagem do volume total. As diluições são: 0%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75% e 90%. Os resultados são obtidos pela média de três medidas realizadas para cada concentração.

Figura 58 - Tempo de decorrelação calculado para diferentes concentrações.

Os resultados para as diluições até 60% condizem com o esperado, uma vez que os valores de decorrelação não são estatisticamente diferentes, indicando que a concentração de espalhadores, até este ponto, não influi nas flutuações de intensidade em decorrência do speckle.

Contudo, para diluições grandes, como 75% e 90%, há diferença estatística no tempo de decorrelação. A tendência de decréscimo pode estar relacionada a alterações nas propriedades reológicas do leite, com a grande porcentagem de água no volume total. Contudo, não é possível descartar a possibilidade de que a menor concentração de espalhadores nestas diluições esteja alterando o comportamento do padrão de speckle.

A possível sensibilidade do sistema à concentração que, por um lado, abre novas possibilidades de aplicação, por outro, dificulta uma modelagem mais precisa da resposta do sistema para diferentes tipos de amostra. Mas o comportamento do sistema até a diluições de mais da metade do volume total são indicativos positivos para o comportamento esperado do sistema, independente da diluição.

6.6 Obtendo Um B-Scan

Por fim, com um melhor conhecimento do sistema e algoritmo propostos, foi realizada uma série de aquisições utilizando a mesma metodologia, mas agora avaliando-se diferentes localidades do microcanal, tanto em profundidade (no mesmo A-Scan), quanto lateralmente (deslocando-se a amostra e adquirindo outros A-Scans). Desta maneira, é possível realizar uma reconstrução bidimensional da dinâmica de fluxo no microcanal, ou seja, montar uma imagem, ou B-Scan, do fluxo no microcanal.

6.6.1 Materiais e Métodos

Novamente foi utilizado leite integral UHT, visto que já havia conhecimento empírico da resposta do sistema a este tipo de amostra. O leite não foi diluído em água, e foi bombeado pelo mesmo microcanal de 400 μm de largura e 100 μm de altura, com o fluxo controlado pela microbomba ExiGo. O fluxo escolhido, novamente, foi de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. As aquisições foram realizadas, para cada A-Scan, a uma taxa de 8 kHz com um N de 1024. Desta maneira, após completadas as aquisições necessárias em um determinado ponto do microcanal, a amostra era transladada 25 μm lateralmente, e novas aquisições eram feitas. Este procedimento foi repetido 15 vezes, o que implica que a imagem final possuirá 15 colunas e uma resolução lateral imposta de 25 μm . Os 100 μm de profundidade do microcanal correspondiam a 15 diferentes pontos do A-Scan no nosso sistema, o que fornece uma resolução axial de, aproximadamente, 6,6 μm .

O mesmo algoritmo anteriormente utilizado foi novamente aplicado aos 225 pontos de interesse e, para cada um, o tempo de decorrelação foi calculado.

6.6.2 Resultados e Discussão

A imagem foi gerada em cores falsas em função do tempo de decorrelação, e está presente na Figura 59.

Figura 59 - Imagem em cores falsas dos tempos de decorrelação calculados ao longo do microcanal para o fluxo volumétrico de 5 µl/min.

Vale lembrar que, como os tempos de decorrelação são inversamente proporcionais ao fluxo, valores menores na imagem (próximos do vermelho) representam um fluxo mais alto, enquanto valores mais altos (próximos do azul) representam fluxos mais baixos. O que se percebe pela reconstrução é uma concentração de fluxo mais alto em uma região específica do microcanal, entre 200 - 300 µm de largura e 30-60 µm de profundidade. Ao redor desta região, o fluxo cai para valores cada vez mais baixos em direção às bordas da imagem. Este resultado condiz com o esperado do experimento, visto que o fluido sofre arrasto nas paredes do microcanal, e há a diminuição de velocidade de fluxo.

Deste modo, podemos observar uma região com o fluxo mais alto em uma região central da imagem, próxima ao centro do microcanal, enquanto nas regiões mais afastadas, próximas às paredes do microcanal, há grande influência de arrasto, o que reduz o fluxo e gera tempos de decorrelação maiores. A região aqui apresentada, no entanto, não está exatamente no centro da imagem. Considera-se como causa um possível erro durante a aquisição de imagens, com a primeira aquisição sendo feita muito próxima de uma das paredes do microcanal (como indicado pela primeira coluna com valores bem maiores de tempo de decorrelação), de modo que a varredura não cobriu de forma uniforme por toda a

largura do microcanal. Assim, o centro do microcanal estaria deslocado na reconstrução da Figura 59.

Ainda outro fator que pode contribuir para este resultado é o fato de que, o arrasto causado em um fluido pelas paredes de um duto ocasiona uma distribuição de velocidades conhecida, gerando um padrão parabólico. Porém, isto só é válido para dutos circulares, e não para dutos retangulares⁵⁸ como utilizado no presente trabalho. O perfil de velocidades para estes casos torna-se menos trivial, e depende, além das propriedades do fluido, da proporção entre altura e largura do duto⁵⁹, entre outros fatores.

Contudo, o resultado ainda é bastante expressivo para a técnica, e apresenta-se como um indicador positivo para a sua utilização. Demonstra boa sensibilidade do algoritmo, já que foi capaz de distinguir o gradiente de fluxos dentro de um mesmo duto. Ressalta-se ainda que os tempos de decorrelação mensurados na região de maior fluxo estão de bom acordo com aqueles já calculados em outros experimentos e demonstrados anteriormente, para o fluxo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Para ilustrar de maneira melhor o resultado, foi realizado um ajuste parabólico dos valores obtidos, e uma nova imagem foi gerada, para tornar mais evidentes as regiões no gradiente de fluxos. Este ajuste, apesar de não ser fiel ao fenômeno observado, como comentado, auxilia na visualização e compreensão dos resultados. Este resultado está na Figura 60.

Figura 60 - Gráfico tridimensional obtido a partir dos tempos de decorrelação calculados para o fluxo volumétrico de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Demonstramos desta forma a viabilidade e aplicabilidade de uso da técnica proposta para discriminar diferentes fluxos volumétricos e, portanto, oferecer informações quantitativas da dinâmica de fluxos em uma amostra, com base no speckle existente no sinal de OCT.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho abordou características teóricas, experimentais e computacionais dos sistemas de OCT e o padrão de speckle nele presente. Diversas técnicas de análise foram estudadas e aplicadas, visando entender seu funcionamento e adaptar seus algoritmos a novos cenários. Por fim, novas modalidades de análises foram desenvolvidas e seus resultados discutidos. Todo o desenvolvimento deste trabalho foi feito de maneira iterativa e incremental, para que cada etapa pudesse contribuir e interagir com a seguinte, contruindo o conhecimento ao longo do tempo.

Em primeiro momento foi feita uma revisão da literatura sobre OCT e o atual estado da arte da técnica para as medidas de fluxo. Foi identificada uma lacuna nas adaptações de fluxometria para a técnica, que combinasse informações quantitativas (como velocidade de fluxo) e independência de ângulo de imageamento. Preencher esta lacuna motivou o desenvolvimento do presente trabalho, bem como diversos outros grupos de estudos de OCT que investigam o assunto.

A seguir a técnica de OCT foi testada com um conjunto de microcanais com diferentes aspectos, para averiguar sua funcionalidade como ferramenta de avaliação da qualidade dos circuitos microfluídicos. Através de diversas medidas como profundidade, abertura, largura na base e à meia-altura, foi demonstrada a capacidade de identificar as peculiaridades dos microcanais, como aberrações causadas pela varredura do feixe. Medidas com perfilometria óptica comprovaram os resultados obtidos, e viabilizaram a tomografia por coerência óptica como uma técnica adequada para a aferição das microestruturas.

Posteriormente, uma adaptação do OCT para o mapeamento de fluxo através de speckle, o Speckle Variance OCT foi abordado. O simulador desenvolvido pôde fornecer entradas controladas para o algoritmo, para que fosse possível analisar seu funcionamento, e foi comprovada a sensibilidade do SV-OCT ao ruído de fundo das imagens. Além disso, os resultados corroboraram com o descrito na literatura, reportando que a técnica, da maneira como é implementada, não consegue oferecer informações quantitativas sobre fluxo, apenas diferenciando regiões estáticas de regiões com movimento de

espalhadores. Com isto em mente, e tendo conhecimento do funcionamento do SV-OCT, pudemos propor um novo algoritmo para mapeamento de fluxo, de modo otimizado e com a mesma utilização de memória. Demonstramos um ganho de 31% em tempo de processamento em relação ao SV-OCT, obtendo resultados compatíveis. O novo algoritmo tem base na variação entre pares de imagens consecutivas no tempo.

O passo seguinte foi estudar uma técnica reconhecida na literatura, baseada em speckle e capaz de fornecer informações quantitativas de fluxo – o LASCA. Tal técnica, entretanto, é baseada em imagens adquiridas com um tempo de exposição bem definido, o que não é o caso do OCT. Estudos do algoritmo, no entanto, permitiram que a técnica fosse adaptada às imagens de tomografia por coerência óptica, mediante tratamento destas através de softwares desenvolvidos neste trabalho. Concomitantemente, os estudos de LASCA levaram à abordagem de autocorrelação da intensidade nas imagens de OCT. Estas duas novas técnicas foram testadas mediante diferentes tipos de entrada, e resultaram, após limiarização, em bons mapeamentos de fluxo, porém sem relação com a velocidade deste. Contudo, foi através destes experimentos que a taxa de aquisição foi descoberta como um fator limitante.

Com o desenvolvimento de um sistema de OCT em conjunto com um software de aquisição otimizado próprio, foi possível contornar este obstáculo, e retomar as investigações sobre a técnica mais promissora, baseada em autocorrelação. A técnica foi aplicada não mais a imagens, mas a A-Scans de OCT, e demonstrou capacidade de discernir entre fluxos volumétricos, através do tempo de decorrelação. Realizamos, então, diversos testes para caracterizar este algoritmo e compreender suas limitações. Através de análise com diversos fluxos volumétricos, foi descoberto o limite superior, imposto pela taxa de aquisição do sistema, em 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, sendo que a resposta do sistema é otimizada para fluxos abaixo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, o que possibilita aplicações biológicas, como acompanhamento da microvascularização da pele. Para testar os limites inferiores de detecção utilizamos amostras com movimento browniano em diferentes temperaturas, e foi demonstrada a capacidade do sistema em diferenciar estes dois regimes, comprovando uma boa sensibilidade para fluxos lentos. Contudo, foi descoberto, ainda, que caso os fluxos volumétricos impostos sejam muito baixos, é possível que o movimento browniano ainda permaneça como regime

dominante. Por fim, testamos a sensibilidade à concentração de espalhadores, e demonstramos que mesmo para diluições em mais de metade do volume, o sistema ainda responde de maneira adequada. Para diluições muito grandes, no entanto, houve diferença na resposta do sistema, que pode ter sido ocasionada por alterações reológicas do fluido nestas diluições.

Com esta caracterização do sistema, por fim, foi montada uma imagem de corte transversal de um fluxo em um microcanal, codificada em cores falsas a partir do tempo de decorrelação calculado. O resultado foi compatível com o esperado, e demonstra variações do fluxo ao longo do perfil do microcanal, indicando boa sensibilidade do algoritmo.

Todos estes testes, assim, resultam no objetivo final do trabalho, que é demonstrar o OCT como uma ferramenta interessante em aplicações microfluídicas, sejam elas industriais ou biológicas. O OCT com suas adaptações, portanto, é capaz de verificar a qualidade de microcircuitos fabricados, mapear o fluxo em uma amostra de maneira otimizada, com o algoritmo proposto e, com a técnica de autocorrelação demonstrada, pode ainda oferecer informações quantitativas sobre este fluxo.

8. APÊNDICES

Apêndice A – Fluxograma do Software de Aquisição Otimizado

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 HUANG, D. et al. OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1178-1181, Nov 1991. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991GQ83400038 >.
- 2 MICHELSON, A. A. **Studies in Optics**. 1. Mineola, New York: Dover Publications, 1995. 208 ISBN 0486687007.
- 3 YOUNGQUIST, R. C.; CARR, S.; DAVIES, D. E. N. Optical coherence-domain reflectometry: a new optical evaluation technique. **Optics Letters**, v. 22, n. 3, p. 158-160, 1987-03-01 1987. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-12-3-158> >.
- 4 TAKADA, K. et al. New measurement system for fault location in optical waveguide devices based on an interferometric technique. **Applied Optics**, v. 26, n. 9, p. 1603-1606, 1987-05-01 1987. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-26-9-1603> >.
- 5 GLOMBITZA, U.; TECH, U., HAMBURG-HARBURG, GERMANY; BRINKMEYER, E. Coherent frequency-domain reflectometry for characterization of single-mode integrated-optical waveguides. **Lightwave Technology, Journal of**, v. 11, n. 8, p. 1377-1384, Aug 1993 1993. Disponível em: < <http://ieeexplore.ieee.org/articleDetails.jsp?arnumber=254098> >.Disponível em: < <http://ieeexplore.ieee.org/jel1/50/6469/00254098.pdf?arnumber=254098> >.
- 6 FERCHER, A. F.; MENGEDOHT, K.; WERNER, W. Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. **Optics Letters**, v. 13, n. 3, p. 186-188, 1988-03-01 1988. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-13-3-186> >.
- 7 IZATT, J. A. et al. **OPHTHALMIC DIAGNOSTICS USING OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY**. Conf on Ophthalmic Technologies 3. Los Angeles, Ca: Spie - Int Soc Optical Engineering. Jan 16-18, 1993. 136-143 p.
- 8 SERGEEV, A. et al. **INVIVO OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY OF HUMAN SKIN MICROSTRUCTURE**. Conference on Biomedical Optoelectronic Devices and Systems II. Lille, France: Spie - Int Soc Optical Engineering. Sep 06-08, 1994. 144-150 p.
- 9 SWANSON, E. A. et al. In vivo retinal imaging by optical coherence tomography. **Optics Letters**, v. 18, n. 21, p. 1864-1866, 1993-11-01 1993. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-18-21-1864> >.
- 10 IZATT, J. A. et al. MICROMETER-SCALE RESOLUTION IMAGING OF THE ANTERIOR EYE IN-VIVO WITH OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY. **Archives of Ophthalmology**, v. 112, n. 12, p. 1584-1589, Dec 1994. ISSN 0003-9950. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PW46900021 >.
- 11 BOUMA, B. E.; TEARNEY, G. J. **Handbook of Optical Coherence Tomography**. 1. CRC Press, 2001. 756 ISBN 0824705580.

- 12 BOPPART, S. A.; IEEE. Optical coherence tomography of living and fabricated microfluidic systems. **Leos 2001: 14th Annual Meeting of the IEEE Lasers & Electro-Optics Society, Vols 1 and 2, Proceedings**, p. 190-191, 2001. ISSN 1092-8081. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175700800095 >.
- 13 CZAJKOWSKI, J. et al. **Evaluation of microfluidic channels with optical coherence tomography**. Conference on Laser Applications in Life Sciences. Oulu, FINLAND: Spie-Int Soc Optical Engineering. Jun 09-11, 2010. p.
- 14 LANDAHL, S.; TERRY, L. A.; FORD, H. D. Investigation of Diseased Onion Bulbs Using Data Processing of Optical Coherence Tomography Images. **Vi International Symposium on Edible Alliaceae**, v. 969, p. 261-269, 2012. ISSN 0567-7572. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000324531800035 >.
- 15 STIFTER, D. et al. Polarisation-sensitive optical coherence tomography for material characterisation and strain-field mapping. **Applied Physics a-Materials Science & Processing**, v. 76, n. 6, p. 947-951, Apr 2003. ISSN 0947-8396. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182493700019 >.
- 16 TARGOWSKI, P. et al. Optical coherence tomography in art diagnostics and restoration. **Applied Physics a-Materials Science & Processing**, v. 92, n. 1, p. 1-9, Jul 2008. ISSN 0947-8396. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256426000001 >.
- 17 YAZDANFAR, S.; KULKARNI, M.; IZATT, J. High resolution imaging of in vivo cardiac dynamics using color Doppler optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 1, n. 13, p. 424-431, 1997-12-22 1997. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-1-13-424> >.
- 18 IZATT, J. A. et al. *In vivo* bidirectional color Doppler flow imaging of picoliter blood volumes using optical coherence tomography. **Optics Letters**, v. 22, n. 18, p. 1439-1441, 1997-09-15 1997. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-22-18-1439> >.
- 19 MARIAMPILLAI, A. et al. Speckle variance detection of microvasculature using swept-source optical coherence tomography. **Optics Letters**, v. 33, n. 13, p. 1530-1532, 2008-07-01 2008. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-33-13-1530> >.
- 20 BRIERS, J. D.; WEBSTER, S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a nonscanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow. **Journal of Biomedical Optics**, v. 1, p. 174-179, 1996-04 1996. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <http://adsabs.harvard.edu/abs/1996JBO.....1..174B> >.
- 21 RAELE, M. P. **Desenvolvimento da técnica de tomografia por coerência óptica de autocorrelação e melhoramento de resolução axial por análise de sinal via transformada de Fourier**. 2013. 138 (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 22 SCHMITT, J. M.; XIANG, S. H.; YUNG, K. M. Speckle in optical coherence tomography. **Journal of Biomedical Optics**, v. 4, n. 1, p. 95-105, Jan 1999. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000082183900014 >.

- 23 GOODMAN, J. W. Some Fundamental Properties of Speckle. **Journal of the Optical Society of America**, v. 66, n. 11, p. 1145-1150, 1976. ISSN 0030-3941. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976CL46500001 >.
- 24 THOMPSON, O. B.; ANDREWS, M. K. Tissue perfusion measurements: multiple-exposure laser speckle analysis generates laser Doppler-like spectra. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 2, p. 027015-1 - 027015-7, 2010/03/01 2010. ISSN 1083-3668. Disponível em: < http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/data/Journals/BIOMEDO/22429/027015_1.pdf >.
- 25 PEARSON, K. The problem of the random walk. **Nature**, v. 72, p. 294-294, May-Oct 1905. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188312900134 >.
- 26 RAYLEIGH. The problem of the random walk. **Nature**, v. 72, p. 318-318, May-Oct 1905. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188312900144 >.
- 27 GOODMAN, J. W. Statistical Properties Of Laser Speckle Patterns In: DAINITY, J. C. (Ed.). **Laser Speckle and Related Phenomena**. 2ª Ed.: Springer Berlin Heidelberg, 1984. cap. 2, p.9 - 75. (Topics in Applied Physics). ISBN 978-3-540-07498-4.
- 28 LIU, S. S.; LI, P. C.; LUO, Q. M. Fast blood flow visualization of high-resolution laser speckle imaging data using graphics processing unit. **Optics Express**, v. 16, n. 19, p. 14321-14329, Sep 2008. ISSN 1094-4087. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259271900002 >.
- 29 LI, P. C. et al. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging. **Optics Letters**, v. 31, n. 12, p. 1824-1826, Jun 2006. ISSN 0146-9592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238156800016 >.
- 30 REIF, R. et al. Monitoring Hypoxia Induced Changes in Cochlear Blood Flow and Hemoglobin Concentration Using a Combined Dual-Wavelength Laser Speckle Contrast Imaging and Doppler Optical Microangiography System. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12, 2012/12/18 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0052041.pdf> >.
- 31 BRIERS, J. D. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow. **Optica Applicata**, v. 37, n. 1-2, p. 139-152, 2007. ISSN 0078-5466. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249906800016 >.
- 32 FUJII, H. et al. BLOOD-FLOW OBSERVED BY TIME-VARYING LASER SPECKLE. **Optics Letters**, v. 10, n. 3, p. 104-106, 1985. ISSN 0146-9592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1985ACQ0200002 >.
- 33 OKAMOTO, T.; ASAKURA, T. **DETECTION OF THE OBJECT VELOCITY USING THE TIME-VARYING SCATTERED SPECKLES**. Conf on Optical Systems in Adverse Environments. Singapore, Singapore: Spie - Int Soc Optical Engineering. Oct 22-27, 1990. 192-199 p.
- 34 OHTSUBO, J.; ASAKURA, T. VELOCITY-MEASUREMENT OF A DIFFUSE OBJECT BY USING TIME-VARYING SPECKLES. **Optical and Quantum Electronics**, v. 8, n. 6, p. 523-529, 1976. ISSN 0306-8919. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976CH71800005 >.

- 35 BRIERS, J. D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. **Physiological Measurement**, v. 22, n. 4, p. R35-R66, Nov 2001. ISSN 0967-3334. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172456200001 >.
- 36 FERCHER, A. F.; BRIERS, J. D. FLOW VISUALIZATION BY MEANS OF SINGLE-EXPOSURE SPECKLE PHOTOGRAPHY. **Optics Communications**, v. 37, n. 5, p. 326-330, 1981. ISSN 0030-4018. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1981LU93900005 >.
- 37 WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368-373, 2006-07-26 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v442/n7101/full/nature05058.html> >.
- 38 JENSEN, K. F.; REIZMAN, B. J.; NEWMAN, S. G. Tools for chemical synthesis in microsystems. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 17, p. 3206-3212, 2014. ISSN 1473-0197. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000340204300012 >.
- 39 ZHU, H. Y. et al. Optofluidic Fluorescent Imaging Cytometry on a Cell Phone. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 17, p. 6641-6647, Sep 2011. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294322100031 >.
- 40 MACHADO, L. M. et al. Microchannels Direct Machining using the Femtosecond Smooth Ablation Method. **Lasers in Manufacturing 2011: Proceedings of the Sixth International Wlt Conference on Lasers in Manufacturing, Vol 12, Pt B**, v. 12, p. 67-75, 2011. ISSN 1875-3892. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298853300009 >.
- 41 SUDHEENDRAN, N. et al. Speckle variance OCT imaging of the vasculature in live mammalian embryos. **Laser Physics Letters**, v. 8, n. 3, 2011. ISSN 1612-202X. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lapl.201010120/abstract> >. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lapl.201010120/pdf> >.
- 42 MARIAMPILLAI, A. et al. Optimized speckle variance OCT imaging of microvasculature. **Optics Letters**, v. 35, n. 8, p. 1257-1259, Apr 2010. ISSN 0146-9592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276861100048 >.
- 43 MAHMUD, M. S. et al. Review of speckle and phase variance optical coherence tomography to visualize microvascular networks. **Journal of Biomedical Optics**, v. 18, n. 5, p. 13, May 2013. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000322339900007 >.
- 44 GIRARD, M. J. A. et al. Shadow Removal and Contrast Enhancement in Optical Coherence Tomography Images of the Human Optic Nerve Head. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 10, p. 7738-7748, Sep 2011. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295467200094 >.
- 45 LIU, X. et al. Quantitative transverse flow measurement using optical coherence tomography speckle decorrelation analysis. **Optics Letters**, v. 38, n. 5, p. 805-807, Mar 2013. ISSN 0146-9592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315602600070 >.
- 46 SUBHASH, H. M.; LEAHY, M. J. Microcirculation imaging based on full-range high-speed spectral domain correlation mapping optical coherence tomography. **J Biomed Opt**, v. 19, n. 2, p. 7, Feb 2014. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1117/1.jbo.19.2.021103> >.

- 47 WEISS, N.; VAN LEEUWEN, T. G.; KALKMAN, J. Localized measurement of longitudinal and transverse flow velocities in colloidal suspensions using optical coherence tomography. **Physical Review E**, v. 88, n. 4, p. 7, Oct 2013. ISSN 1539-3755. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326163800006 >.
- 48 WEISS, N.; LEEUWEN, T. G. V.; KALKMAN, J. Simultaneous and localized measurement of diffusion and flow using optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 23, n. 3, p. 12, 2015-02-09 2015. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-23-3-3448> >.
- 49 RAJAN, V. et al. Speckle size and decorrelation time; space-time correlation analysis of coherent light dynamically scattered from turbid media. **Optics Communications**, v. 281, n. 6, p. 1755-1760, Mar 2008. ISSN 0030-4018. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253612300064 >.
- 50 BOAS, D. A.; DUNN, A. K. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 1, p. 12, Jan-Feb 2010. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276944200019 >.
- 51 MOORE, E. D.; MCLEOD, R. R. Correction of sampling errors due to laser tuning rate fluctuations in swept-wavelength interferometry. **Optics Express**, v. 16, n. 17, p. 13139-13149, Aug 2008. ISSN 1094-4087. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259268700074 >.
- 52 WU, T. et al. Spectral phase based k-domain interpolation for uniform sampling in swept-source optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 19, n. 19, p. 18430-18439, Sep 2011. ISSN 1094-4087. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294781200075 >.
- 53 RAELE, M. P. **Desenvolvimento de um sistema de tomografia por coerência óptica no domínio de Fourier sensível à polarização e sua utilização na determinação das matrizes de Mueller**. 2009. 84 (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 54 STUCKER, M. et al. Capillary blood cell velocity in human skin capillaries located perpendicularly to the skin surface: Measured by a new laser Doppler anemometer. **Microvascular Research**, v. 52, n. 2, p. 188-192, Sep 1996. ISSN 0026-2862. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VL86600008 >.
- 55 IVANOV, K. P.; KALININA, M. K.; LEVKOVICH, Y. I. BLOOD-FLOW VELOCITY IN CAPILLARIES OF BRAIN AND MUSCLES AND ITS PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE. **Microvascular Research**, v. 22, n. 2, p. 143-155, 1981. ISSN 0026-2862. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1981MK01500002 >.
- 56 LI, T. C.; RAIZEN, M. G. Brownian motion at short time scales. **Annalen Der Physik**, v. 525, n. 4, p. 281-295, Apr 2013. ISSN 0003-3804. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317361800004 >.
- 57 FARHAT, G. et al. **Optical coherence tomography speckle decorrelation for detecting cell death**. Conference on Biomedical Applications of Light Scattering V. San Francisco, CA: Spie-Int Soc Optical Engineering. Jan 22-24, 2011. p.

- ⁵⁸ MORINI, G. L.; SPIGA, M. SLIP FLOW IN RECTANGULAR MICROTUBES. **Microscale Thermophysical Engineering**, v. 2, n. 4, p. 10, 1998. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/108939598199919#.VNzh62jF9bH> >.
- ⁵⁹ KASHANINEJAD, N. et al. FLUID MECHANICS OF FLOW THROUGH RECTANGULAR HYDROPHOBIC MICROCHANNELS. **Proceedings If the Asme 9th International Conference on Nanochannels, Microchannels and Minichannels 2011, Vol 1**, p. 647-655, 2012. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000320286500083 >.