

UNIVERSIDADE DE COIMBRA  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Departamento de Física

Métodos e instrumentação para  
fluxometria laser:  
aplicações à microcirculação sanguínea



Edite Maria Areias Figueiras  
Dissertação para obtenção do grau de Doutor em  
*Física - Física Tecnológica*

2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Física

# Métodos e instrumentação para fluxometria laser:

aplicações à microcirculação sanguínea

Edite Maria Areias Figueiras

*Dissertação\* para obtenção do grau de Doutor em*

*Física - Física Tecnológica,*

*realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor Luís Filipe Requicha  
Ferreira da Universidade de Coimbra (Portugal) e da Prof. Doutora Anne Marie  
Humeau-Heurtier da Universidade de Angers (França)*

2012

---

\*Esta tese não está escrita ao abrigo do novo acordo ortográfico, publicado em Diário da República, 1.ª série, N.º 145, 29 de Julho de 2008, Resolução da Assembleia da República n.º 35/2008 (pág. 4802).



Este trabalho teve o apoio financeiro do Instituto de Investigação Interdisciplinar da Universidade de Coimbra, através da bolsa de doutoramento atribuída, e foi isento do pagamento de propinas à Universidade de Coimbra.

Este trabalho teve também o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia através dos projectos “PTDC-SAU-BEB-1017192008” e “PTDC-SAU-NEU-1017262008”.





*Ao meu avô  
À memória da minha avó*



## O júri

Presidente Prof. M. Constança Mendes P. da Providência Santarém e Costa  
Professor Catedrático da Universidade de Coimbra

Prof. Doutor Walter Charles Pierre Michel Blondel  
Professor da Universidade de Lorraine

Prof. Doutor João de Lemos Pinto  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Carlo Manuel Bolota Alexandre Correia  
Professor Catedrático da Universidade de Coimbra

Prof. Doutora Anne Marie Humeau-Heurtier  
Professor da Universidade de Angers

Prof. Doutor Luís Filipe Requicha Ferreira  
Professor Associado da Universidade de Coimbra



## *Agradecimentos*

Ao Prof. Doutor Luís Filipe Requicha Ferreira pela orientação, pelo apoio e preocupação constante, e pelas inúmeras sugestões e comentários, indispensáveis ao desenvolvimento deste trabalho.

Au Professeur Anne Humeau-Heurtier pour la co-direction de ma thèse, pour son soutien, et surtout pour son aide lors de mes séjours à Angers.

À monsieur le Directeur du groupe ESAIP, Jacky Lépicier, pour m'avoir accueillie au sein de son établissement pendant mes séjours à Angers.

To Prof. Frits de Mul, always willing to help and answer questions that arose when using the Monte Carlo software, developed by himself.

Ao Prof. Doutor Carlos Correia pela amizade, pela disponibilidade que sempre teve para me ajudar, e por se ter preocupado em proporcionar condições para a minha investigação.

Ao Doutor João Cardoso por nunca ter recusado os meus pedidos de ajuda, fosse para esclarecer dúvidas, fosse para utilizar equipamento do laboratório.

A todos os que trabalharam comigo durante este anos. À minha amiga Sónia Semedo que muito me ajudou com os seus conhecimentos de programação e processamento de sinal. Ao Ricardo Oliveira e à Rita Campos pela participação interessada nos projectos, onde efectuaram as suas tarefas sempre com muito empenho e dedicação. À Cátia Marques, que disponibilizou tempo para os testes *in vivo* do fluxómetro invasivo. À Vânia Almeida, que sempre se disponibilizou para ouvir os problemas com que me deparei, contribuindo com sugestões para os resolver. A todos os voluntários, que com muita paciência, entregaram o corpo à ciência, sem nada exigirem em troca.

Ao Sr. Cruz pelo apoio e suporte dados nos assuntos da sua competência e pela disponibilidade em resolver os problemas que foram surgindo. Ao pessoal da oficina, pela disponibilidade e pelos conselhos dados no campo da mecânica. À Doutora Sónia e à Doutora Isabel pelo auxílio na gestão dos projectos.

À minha família: aos meus pais e à minha irmã Andreia, porque lhes devo muito. Ao meu primo Ricardo e à minha madrina Maria pela ajuda na revisão da tese.

Ao Helder pela ajuda na preparação das imagens que fazem parte desta tese.

A todos aqueles que contribuiriam de alguma forma, directa ou indirectamente, para o trabalho aqui apresentado.

Obrigado!



## Resumo

Diferentes doenças afectam de modo diferente o comportamento das camadas da rede microcirculatória da pele. Havendo interesse clínico no conhecimento do seu inter-relacionamento, é necessária a discriminação do sinal de perfusão sanguínea (informação acerca da velocidade e concentração dos dispersores) com origem nas camadas da pele, superficial e profundas. Assim fomos conduzidos à realização de estudos com o objectivo de aperfeiçoar a técnica de fluxometria laser Doppler (FLD) no que diz respeito à discriminação da profundidade amostrada. Estes estudos culminaram com o desenvolvimento de um fluxómetro que permite o estudo, em simultâneo, da influência do comprimento de onda e da distância entre as fibras emissora e receptora na monitorização da perfusão sanguínea na pele. A tecnologia desenvolvida foi testada *in vitro* e validada através de simulações Monte Carlo. As simulações comprovaram que a profundidade média dos fótons dispersos aumenta com o comprimento de onda e com a distância entre fibras. Nos testes de validação *in vivo* foram verificadas diferenças evidentes quando se compararam fluxos obtidos com diferentes comprimentos de onda e diferentes distâncias entre fibras. Concomitantemente ao desenvolvimento do protótipo referido, foram realizadas análises, no domínio do tempo e no domínio das frequências, de sinais de perfusão obtidos com fluxómetros comerciais. Nestes estudos demonstrou-se que a perfusão obtida, em participantes saudáveis, em diferentes regiões de pele, têm propriedades diferentes, e que a perfusão obtida em pacientes com esclerose sistémica tem uma regularidade diferente da dos sinais obtidos em indivíduos saudáveis ou com fenómeno de Raynaud.

A necessidade de se observarem as variações do fluxo capilar sanguíneo no cérebro de ratos, levou os investigadores a recorrer às sondas de fibra óptica invasivas, para FLD, disponíveis no mercado. No entanto, devido ao seu elevado diâmetro externo (ca. 450  $\mu\text{m}$ ), o tecido cerebral a ser monitorizado fica muito danificado. Estudos realizados com o objectivo de reduzir as dimensões destas sondas culminaram com a construção de micro-sondas de uma única fibra óptica, baseadas na técnica de detecção *self-mixing*, com um diâmetro externo de 260  $\mu\text{m}$ . As micro-sondas desenvolvidas apresentaram uma boa linearidade quando testadas com diferentes velocidades de dispersores. Nas medições efectuadas *in vivo* houve boas indicações de que as micro-sondas avaliadas podiam ser utilizadas para seguir o fluxo microcirculatório, em tempo real, no cérebro dos ratos.

Os resultados obtidos com os protótipos (não-invasivo e invasivo) são animadores e pre-nunciam a sua utilização, tanto a nível clínico como em investigação.

**Palavras-chaves:** fluxometria laser Doppler, microcirculação sanguínea, instrumentação biomédica, *self-mixing*, simulações Monte Carlo.



## *Abstract*

Different diseases affect in different ways the behavior of the microcirculatory layers of the skin. Since there are clinical interests in the knowledge of their interrelationship, it is required the discrimination of the blood perfusion signal (information about the velocity and concentration of scatterers) arose from the superficial and the deep skin layers. Therefore, we were conducted to studies with the aim to improve the laser Doppler flowmetry (LDF) technique in what concerns the sample depth discrimination. These studies resulted in the development of a flowmeter prototype that enables us to study, simultaneously, the influence of the wavelength and of the distance between emitting and receiving fibres in the skin blood perfusion measurements. The developed technology was tested *in vitro* and validated through Monte Carlo simulations. They have shown that the average depth of the scattered photons increases with the wavelength and with the distance between the emitting and the receiving fibres. *In vivo* validation tests showed clear differences when comparing perfusion results obtained with different wavelengths and with different fibres distances.

Perfusion signals obtained with the commercial flowmeter were analyzed in time and frequency domains. It was demonstrated that the obtained perfusion in healthy subjects in different regions of the skin, have different properties, and the perfusion obtained in patients with systemic sclerosis have a different regularity, when compared with the obtained perfusion in healthy subjects or patients with Raynaud's phenomenon.

The need to follow the variations of the microcirculatory blood flow in the rat brain, has led researchers to use the invasive LDF optical fibres probes commercially available. However, due to their large external diameter (ca. 450  $\mu m$ ), the invasive LDF probes can damage the tissue to be monitored. Studies conducted with the aim of reducing the dimensions of the LDF probes, led to the construction of a *self-mixing* based micro-probe using a single thin optical fibre. These probes have an outer diameter of 260  $\mu m$ . The developed micro-probes showed a good linearity when tested for different scatterers velocities. *In vivo* measurements showed good indicators that lead us to conclude that the evaluated micro-probes can be used to monitor the microcirculatory blood flow in real time, in the rat brain.

The obtained results with the two prototypes (non-invasive and invasive) are encouraging, and there are good indicators for their applicability in clinical and research environments.

**Keywords:** laser Doppler flowmetry, blood microcirculation, biomedical instrumentation, self-mixing, Monte Carlo simulations.



# Abreviaturas e acrónimos

<b>AC</b>	Alternating Current
<b>ADC(s)</b>	Analog-to-Digital Converter
<b>ApEn</b>	Entropia Aproximada
<b>ANOVA</b>	Análise da Variância
<b>AM1</b>	Amostra 1
<b>AM2</b>	Amostra 2
<b>AVAs</b>	ArterioVenous Anastomoses
<b>ACF</b>	Função de autocorrelação
<b>CGVM</b>	Concentração dos Glóbulos Vermelhos em Movimento
<b>CMOS</b>	Complementary Metal Oxide Semiconductor
<b>CO635</b>	Comprimento de Onda de 635 nm
<b>CO785</b>	Comprimento de Onda de 785 nm
<b>CO830</b>	Comprimento de Onda de 830 nm
<b>DAC(s)</b>	Digital-to-Analog Converter
<b>DC</b>	Direct Current
<b>DF0.00</b>	Distância entre as Fibras emissora e receptora de 0,00 mm
<b>DF0.14</b>	Distância entre as Fibras emissora e receptora de 0,14 mm
<b>DF0.25</b>	Distância entre as Fibras emissora e receptora de 0,25 mm
<b>DF1.20</b>	Distância entre as Fibras emissora e receptora de 1,20 mm
<b>Dig</b>	Saída Digital
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>EP</b>	Espectro de Potência
<b>E<sub>1</sub></b>	Espelho 1
<b>E<sub>2</sub></b>	Espelho 2
<b>E<sub>3</sub></b>	Espelho 3
<b>FFT</b>	Transformada de Fourier discreta

---

<b>FD(s)</b>	FotoDetector(es)
<b>FD1</b>	FotoDetector 1
<b>FD2</b>	FotoDetector 2
<b>FD3</b>	FotoDetector 3
<b>FLD</b>	Fluxometria Laser Doppler
<b>FP</b>	Fracção/Fracções de Perfusão
<b>FR</b>	Fenómeno de Raynaud
<b>fMRI</b>	funcional Magnetic Resonance Imaging
<b>GVM</b>	Glóbulo Vermelho em Movimento
<b>GV</b>	Glóbulo Vermelho
<b>HRPO</b>	Hiperemia Reactiva Pós-Oclusiva
<b>Hb</b>	sangue desoxigenado
<b>HbO<sub>2</sub></b>	sangue oxigenado
<b>pHRPO</b>	pico da Hiperemia Reactiva Pós-Oclusiva
<b>HTL</b>	Hiperemia Térmica Local
<b>ICNIRP</b>	International Commission on Non-Ionizing Protection
<b>IPLD</b>	Imagiologia da Perfusão Laser Doppler
<b>laser(s)</b>	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
<b>L</b>	comprimento da cavidade laser
<b>L<sub>ext</sub></b>	comprimento da cavidade externa
<b>LED(s)</b>	Light Emitting Diode(s)
<b>M0</b>	Momento de ordem zero do espectro de potência
<b>M1</b>	Momento de ordem um do espectro de potência
<b>M785</b>	Micro-sonda de 785 nm
<b>M1308</b>	Micro-sonda de 1308 nm
<b>MC</b>	Método das Contagens
<b>MA</b>	Método da Autocorrelação
<b>MEP</b>	Método do Espectro de Potência
<b>MPE</b>	Maximum Permissible Exposure (exposição máxima permitida)
<b>MPLD</b>	Monitorização pontual da Perfusão Laser Doppler
<b>NA</b>	Abertura numérica
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico Sintase neuronal

---

<b>eNOS</b>	Óxido nítrico Sintase endotelial
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico Sintase induzível
<b>Perf</b>	Perfusão
<b>PET</b>	Positron Emission Tomography
<b>ref(s).</b>	referência(s)
<b>S25%</b>	Solução aquosa de leite a 25%
<b>S50%</b>	Solução aquosa de leite a 50%
<b>SSc</b>	Esclerose Sistémica
<b>TP</b>	Taxa de Perfusão
<b>UP</b>	Unidade de Perfusão



# Símbolos e constantes físicas

$f$	frequência
$f'$	frequência desviada (efeito Doppler)
$v_f$	velocidade da fonte
$v_o$	velocidade do observador
$v$	velocidade
$v_d$	velocidade da partícula dispersora
$\omega_i$	frequência angular da luz incidente
$\omega_d$	frequência angular desviada
$\vec{q}$	vector dispersão
$\vec{k}_i$	vector do fotão incidente
$k_i$	amplitude de $\vec{k}_i$
$\vec{k}_d$	vector do fotão dispersado
$\vec{k}$	número de onda
$k$	número de onda
$\lambda$	comprimento de onda
$\lambda_t$	comprimento de onda da luz no tecido
$\theta$	ângulo de dispersão
$\alpha$	ângulo entre a $\vec{v}$ e o plano de dispersão
$\varphi$	ângulo entre $\vec{q}$ e $v_{//}$
$v_{//}$	projecção de $\vec{v}$ no plano de dispersão
$\omega_{max}$	desvio Doppler angular máximo
$y_1$	onda sinusoidal
$y_2$	onda sinusoidal
$A$	amplitude
$k_1$	número de onda
$k_2$	numero de onda

$\omega_1$	frequência angular
$\omega_2$	frequência angular
$v_{fase}$	velocidade de fase
$v_{grupo}$	velocidade de grupo
$\vec{E}_i$	campo eléctrico do fotão incidente
$\vec{E}_d$	campo eléctrico do fotão dispersado
$E_{0i}$	amplitude do campo eléctrico do fotão incidente
$E_{0d}$	amplitude do campo eléctrico do fotão dispersado
$k_i$	frequência angular da luz incidente
$r$	posição actual do fotão
$r_0$	posição inicial do fotão
$t$	tempo
$i_d$	correntes originadas por fotões desviados
$i_{nd}$	correntes originadas por fotões não desviados
$M_i$	momento de ordem i
$P(\omega)$	espectro de potência
$Perf_{prima}$	perfusão primária
$CGVM$	concentração de glóbulos vermelhos em movimento
$r_2$	coeficiente de reflexão do espelho efectivo
$r_{2s}$	coeficiente de reflexão do espelho $E_2$
$r_{2ext}$	coeficiente de reflexão do espelho $E_3$
$\tau_{ext}$	tempo de ida e volta da luz na cavidade externa
$c$	velocidade da luz ( $c = 2.997\,924\,58 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ )
$\Delta P$	flutuações de potência
$\kappa_{ext}$	constante de <i>feedback</i>
$f'_{sm}$	frequência Doppler desviada no efeito <i>self-mixing</i>
$C$	corrente de operação do díodo laser
$C_{th}$	corrente no limiar
$R_t$	reflectividade do alvo
$I_{th}$	corrente no limiar
$\eta_{eff}$	eficiência do acoplamento da luz
$n_c$	índice de refacção da cavidade
$g$	factor de anisotropia

$n$	índice de refração
$n_i$	índice de refração do meio $i$
$n_t$	índice de refração do meio $t$
$n_1$	índice de refração do meio 1
$n_2$	índice de refração do meio 2
$n_m$	índice de refração do meio
$n_s$	índice de refração do dispersor
$\mu_a$	coeficiente de absorção
$\mu_{al}$	coeficiente de absorção do meio $l$
$\mu_s$	coeficiente de dispersão
$\mu'_s$	coeficiente de dispersão reduzido
$\mu_t$	coeficiente de atenuação
$L$	radiância
$\vec{r}$	vector de posição
$\hat{s}$	vector unitário de direcção
$\hat{s}'$	vector unitário de direcção
$E$	energia
$h$	constante de Planck ( $h = 6,62618 \times 10^{-34} Js$ ),
$I$	irradiância
$I_0$	irradiância do feixe incidente
$d$	distância percorrida pelo fotão
$\rho_a$	densidade da molécula absorvente
$\sigma_a$	secção eficaz de absorção
$P_{abs}$	potência absorvida
$L_A$	percurso livre médio de absorção
$T$	transmitância
$R$	reflectância
$N_i$	quantidade relativa de luz injectada
$\mu^m e l_a$	coeficiente de absorção da melanina
$\sigma_s$	secção eficaz de dispersão
$P_{sct}$	potência dispersada
$\rho_s$	densidade da molécula dispersora
$L_s$	percurso livre médio de dispersão

$p(\cos\theta)$	função de fase
$p_{hg}(\cos\theta)$	função de fase de Henyey-Greenstein
$g_{hg}$	factor de anisotropia de Henyey-Greenstein
$p(\theta)$	função de fase modificada de Henyey-Greenstein
$\beta$	componente isotrópica da função de fase
$p_{gk}(\theta)$	função de fase kernel paramétrica de Gegenbauer
$k_x$	direcção do fotão no eixo do x
$k_y$	direcção do fotão no eixo do y
$k_z$	direcção do fotão no eixo do z
$L_l$	distância média de translação
$c_{lb}$	concentração das partículas do tipo $b$ na camada $l$
$\sigma_{tb}$	secção eficaz total da partícula $b$
$\sigma_{ab}$	secção eficaz de absorção da partícula $b$
$\sigma_{sb}$	secção eficaz de dispersão da partícula $b$
$f_{lb}$	probabilidade do fotão encontrar uma partícula do tipo $b$ no objecto $l$
$f_{sl}$	probabilidade da partícula percorrer uma distância $\Delta p$
$f_{al}$	probabilidade de absorção no meio $l$
$\Delta p$	distância percorrida actual
$H$	número aleatório ( $0 < H < 1$ )
$\Delta p_{eff}$	caminho efectivo
$f_p$	fracção de caminho percorrido
$a_{lb}$	albedo da partícula $b$ no objecto $l$
$L_{trans,l}$	comprimento de translação médio
$L_{abs,l}$	comprimento de absorção médio
$C(\theta, \varphi)$	função cumulativa normalizada
$p_{iso}(\theta, \varphi)$	função de fase para a dispersão isotrópica
$R_F(\theta_1)$	relação de Fresnel
$v_0$	velocidade média
$R$	raio do tubo
$N(\omega_i)$	distribuição de frequências angulares discretas
$S(j\Delta\omega)$	espectro de potência da distribuição de frequências simuladas
$const$	constante de proporcionalidade
$\beta$	constante de coerência

$a_i$	número de fótons no $i$ -ésimo intervalo espectral
$N_{int} + 1$	número de intervalos espectrais
$H$	expoente de Hurst
$m$	tamanho dos dados
$r$	tolerância
$N$	nº de pontos
$fc_i$	frequência de corte inferior
$fc_s$	frequência de corte superior
$F_a$	Frequência de amostragem
$nfft$	número de pontos do espectro de potência
$\%sobreposicao$	percentagem de sobreposição
$R_f$	Resolução em frequência
$Perf_{ruído}$	recta de ruído do detector
$d_c$	declive da curva
$b$	ponto de intersecção com o eixo dos $yy$
$M$	constante de calibração
$Perf$	perfusão
$R^2$	coeficiente de determinação
$linha\ de\ base$	perfusão média obtida em dois minutos na linha de base
$ZB$	perfusão média obtida em dois minutos no ZB
$pHRPO$	perfusão obtida no pHRPO
$tempo\ pHRPO$	tempo em que ocorre o pHRPO
$tempo\ RO$	instante em que é removida a oclusão
$tempo\ FB$	instante de retorno ao fluxo basal
$f_{speckle}$	frequência de <i>speckle</i>
$N_f$	número de flutuações em cada bloco
$\sigma$	tempo de autocorrelação



# Índice

<b>Agradecimentos</b>	<b>xi</b>
<b>Resumo</b>	<b>xiii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xv</b>
<b>Abreviaturas e acrónimos</b>	<b>xvi</b>
<b>Símbolos e constantes físicas</b>	<b>xxi</b>
<b>Índice</b>	<b>xxvii</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>xxxii</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>xxxvii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento e Motivação . . . . .	1
1.2 Objectivos . . . . .	3
1.2.1 Medições não invasivas - discriminação em profundidade . . . . .	3
1.2.2 Estudos realizados em sinais de FLD . . . . .	5
1.2.3 Medições invasivas - a necessidade de uma micro-sonda . . . . .	6
1.3 Estrutura da Tese . . . . .	7
1.4 Contribuições científicas . . . . .	8
<b>2 Rede vascular microcirculatória</b>	<b>11</b>
2.1 Microcirculação . . . . .	11
2.1.1 Microcirculação cutânea . . . . .	12
2.1.1.1 Monitorização da microcirculação cutânea . . . . .	14
2.1.2 Microcirculação do cérebro de ratos . . . . .	15
<b>3 Fluxometria laser Doppler</b>	<b>17</b>
3.1 Análise Histórica . . . . .	17
3.2 Análise Teórica . . . . .	18
3.2.1 O efeito Doppler . . . . .	18

3.2.2	Desvio Doppler único . . . . .	19
3.2.3	Onda de batimento . . . . .	20
3.2.4	Deteção homodínica e heterodínica . . . . .	21
3.2.5	Efeito <i>speckle</i> . . . . .	22
3.2.6	Do campo electromagnético à função de autocorrelação . . . . .	23
3.2.7	Estimação da Perfusão . . . . .	24
3.3	Métodos de detecção . . . . .	25
3.3.1	Monitorização pontual da perfusão laser Doppler . . . . .	25
3.3.2	Imagiologia da perfusão laser Doppler . . . . .	26
3.3.3	Interferometria <i>self-mixing</i> . . . . .	26
3.3.3.1	Análise Teórica . . . . .	27
3.3.3.2	Vantagens da interferometria <i>self-mixing</i> . . . . .	29
3.4	Limitações da FLD . . . . .	29
<b>4</b>	<b>Método de Monte Carlo</b>	<b>33</b>
4.1	Introdução . . . . .	33
4.2	Teoria do transporte da luz - tecidos biológicos . . . . .	34
4.2.1	Coefficiente de absorção . . . . .	35
4.2.1.1	Coefficiente de absorção da pele . . . . .	37
4.2.2	Dispersão . . . . .	39
4.2.2.1	Coefficiente de dispersão . . . . .	39
4.2.2.2	Factor de anisotropia $g$ . . . . .	43
4.2.2.3	Função de fase . . . . .	43
4.3	Descrição geral das simulações . . . . .	44
4.3.1	Lançamento do fotão . . . . .	45
4.3.2	Mecanismo de propagação do fotão . . . . .	46
4.3.3	Absorção do conjunto de fotões . . . . .	48
4.3.4	Dispersão do grupo de fotões . . . . .	49
4.3.5	Reflexão ou transmissão numa fronteira . . . . .	51
4.3.6	Deteção e Terminação . . . . .	52
4.3.7	Implementação dos perfis de velocidade e construção do espectro de potência . . . . .	52
4.3.8	Construção do espectro Doppler de potência . . . . .	53
<b>5</b>	<b>Protótipo não-invasivo</b>	<b>55</b>
5.1	<i>Hardware</i> - sistema electrónico . . . . .	55
5.1.1	Segurança laser . . . . .	62
5.2	<i>Software</i> - controlo digital . . . . .	63
5.3	Processamento de sinal . . . . .	65
5.4	Calibração . . . . .	68
5.4.1	Protocolo . . . . .	68
5.4.2	Resultados e discussão . . . . .	71
5.5	Estudos <i>in vitro</i> . . . . .	76
5.5.1	Simulações Monte Carlo . . . . .	78
5.5.1.1	Descrição . . . . .	78
5.5.1.2	Resultados e Discussão . . . . .	80
5.5.2	Validação . . . . .	86

5.5.2.1	Protocolo de aquisição . . . . .	86
5.5.2.2	Resultados e discussão . . . . .	87
5.6	Estudos <i>in vivo</i> . . . . .	90
5.6.1	Simulações Monte Carlo . . . . .	90
5.6.1.1	Descrição . . . . .	90
5.6.1.2	Resultados e Discussão . . . . .	93
5.6.2	Validação . . . . .	101
5.6.2.1	Protocolo de medição . . . . .	101
5.6.2.2	Protocolo de investigação . . . . .	102
5.6.2.3	Análise no domínio das frequências . . . . .	103
5.6.2.4	Resultados e discussão . . . . .	105
5.7	Conclusões . . . . .	130
<b>6</b>	<b>Estudos realizados em sinais obtidos na pele por FLD</b>	<b>133</b>
6.1	Análise no domínio dos tempos e no domínio das frequências de sinais de FLD recolhidos na pele glabra e na pele não glabra . . . . .	133
6.1.1	Diferenças fisiológicas entre pele glabra e não glabra . . . . .	134
6.1.2	Métodos . . . . .	134
6.1.2.1	Protocolo de medição . . . . .	134
6.1.2.2	Processamento de sinal . . . . .	135
6.1.3	Resultados e discussão . . . . .	136
6.2	Estudo da entropia nos sinais de FLD recolhidos em participantes saudáveis e em pacientes . . . . .	138
6.2.1	Métodos . . . . .	138
6.2.1.1	Protocolo de medição . . . . .	138
6.2.1.2	Processamento de sinal . . . . .	140
6.2.1.3	Análise estatística . . . . .	141
6.2.2	Resultados e Discussão . . . . .	141
6.3	Conclusões . . . . .	145
<b>7</b>	<b>Protótipo invasivo</b>	<b>147</b>
7.1	Descrição do protótipo . . . . .	147
7.2	Software - Controlo digital . . . . .	150
7.3	Processamento de sinal . . . . .	150
7.3.1	Método das contagens . . . . .	153
7.3.2	Método da autocorrelação . . . . .	155
7.3.3	Método do espetro de potência . . . . .	157
7.4	Estudos <i>in vitro</i> . . . . .	160
7.4.1	Objectivos e Métodos . . . . .	160
7.4.1.1	Altifalante . . . . .	160
7.4.1.2	Fantoma . . . . .	160
7.4.2	Resultados e Discussão . . . . .	161
7.4.2.1	Altifalante . . . . .	161
7.4.2.2	Fantoma . . . . .	162
7.5	Estudos <i>in vivo</i> . . . . .	163
7.5.1	Simulações Monte Carlo . . . . .	164
7.5.1.1	Descrição . . . . .	164

---

7.5.1.2	Resultados e Discussão . . . . .	164
7.5.2	Validação . . . . .	165
7.5.2.1	Métodos - Protocolo de medição . . . . .	165
7.5.2.2	Resultados e Discussão . . . . .	166
7.6	Conclusões . . . . .	170
<b>8</b>	<b>Considerações finais</b>	<b>171</b>
8.1	Conclusões Finais . . . . .	171
8.2	Sugestões para trabalho futuro . . . . .	174
<b>A</b>	<b>Resultados Monte Carlo - Fantoma</b>	<b>179</b>
<b>B</b>	<b>Resultados - Fantoma</b>	<b>187</b>
<b>C</b>	<b>Fotografias dos protótipos</b>	<b>197</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>199</b>

# Lista de Figuras

2.1	Ilustração da microcirculação cutânea. . . . .	13
3.1	Representação esquemática dos vectores e dos ângulos de propagação de um fotão antes e depois de dispersado por um glóbulo vermelho em movimento. . . . .	19
3.2	Modelo de três espelhos que ilustra o efeito <i>self-mixing</i> num díodo laser semiconductor onde PD representa o fotodíodo, e E1, E2 e E3 representam os espelhos. . . . .	27
4.1	Espectro de absorção da hemoglobina desoxigenada (curva azul) e oxigenada (curva vermelha). . . . .	38
4.2	Espectro de absorção da água para os comprimentos de onda no intervalo compreendido entre os 600 e os 1400 nm. . . . .	38
4.3	Técnicas utilizadas para a aplicação do método de Monte Carlo na fluxometria laser Doppler. . . . .	45
4.4	Lançamento do fotão: a superfície do modelo simulado está no plano X-Y, F é o local de injeção, $\theta$ e $\varphi$ são os ângulos de inclinação de $k_i$ . . . . .	46
4.5	Eixo de dispersão. Os vectores de propagação do fotão, antes e depois da dispersão, são representados por $k_0$ e $k_d$ , respectivamente. . . . .	49
4.6	Relação entre as coordenadas de laboratório (subscrito $L$ ) e as coordenadas de dispersão (subscrito $d$ ). O círculo indica o conjunto de possibilidades para as direcções do vector para $\theta$ fixo e $\varphi$ aleatório. . . . .	50
5.1	Protótipo não-invasivo. . . . .	56
5.2	Desenho esquemático do protótipo não-invasivo, constituído pelos sistemas: (a) de actuação; (b) de calibração e (c) de aquisição. . . . .	57
5.3	Representação detalhada do sistema de actuação. Os blocos com fundo azul representam a interacção do sistema com o microcontrolador, sendo que <i>Dig</i> representa uma saída digital do microcontrolador. . . . .	58
5.4	Representação detalhada do sistema de calibração. Os blocos com fundo azul representam a interacção do sistema com o microcontrolador e <i>Dig</i> representa uma saída digital do microcontrolador. . . . .	59
5.5	Representação detalhada do sistema de detecção. . . . .	60
5.6	Representação do conector de um canal de detecção, onde se podem ver: <i>A</i> a sonda; <i>B</i> o conector; <i>C</i> o fotodetector bi-celular; <i>D</i> as fibras ópticas; e <i>E</i> a caixa metálica onde estão posicionados os LEDs. . . . .	61

5.7	Desenho esquemático da disposição das fibras ópticas na sonda: círculo vermelho - fibra emissora; círculo preto - fibras detetoras; DF0.14 - fibra detetora localizada a 0,14 mm da fibra central; DF0.25 - fibra detetora localizada a 0,25 mm da fibra central; e DF1.20 - fibras detetoras localizada a 1,20 mm da fibra central. . . . .	61
5.8	Fluxograma representativo das funções executadas pelo micro-controlador. . . . .	65
5.9	Fluxograma representativo do processamento de sinal realizado. . . . .	66
5.10	Esquema representativo da janela de sobreposição utilizada no cálculo da perfusão. . . . .	68
5.11	Fluxograma representativo das etapas da calibração. . . . .	70
5.12	Determinação da recta de ruído: (a) resposta em tensão dos três fotodetectores quando excitados com níveis crescentes de intensidade de luz, onde A1 e A2 representam as duas áreas foto-sensíveis do fotodetector bi-celular; e (b) recta de ruído de cada fotodetector. . . . .	73
5.13	Perfusão obtida na solução padrão de motilidade depois da calibração para: (a) o díodo laser de 635 nm; e (b) o PF5000, nos três canais de detecção. . . . .	74
5.14	Perfusão obtida no disco de Delrin®, depois da calibração, para: (a) o díodo laser de 830 nm; e (b) o PF5000, nos três canais de detecção. . . . .	75
5.15	Esquemático do fantoma constituído por um micro-tubo de teflon® enrolado em torno de uma peça de alumínio onde se podem ver: A o micro-tubo de teflon®; e B a sonda laser Doppler. . . . .	77
5.16	Esquemático do fantoma de acrílico onde se podem ver: A o tubo de látex; B o canal de passagem do fluido dispersor (5x4 mm); e C a sonda. . . . .	78
5.17	Modelo simulado, equivalente ao fantoma de teflon® construído, constituído por 3 camadas: a) a camada superficial, constituída por micro-tubos preenchidos com leite magro; e b) e c) as camadas mais internas, que modelam a placa de alumínio. d) representa o feixe laser. . . . .	79
5.18	M1 vs. distância entre as fibras emissora e receptora, obtidos no modelo simulado para uma solução aquosa com 25% de leite para as velocidades de: 1,56; 3,12; 4,68; 6,25; 7,78 e 9,35 mm/s. . . . .	83
5.19	Trajectórias percorridas por 25 fotões que foram injectados no modelo simulado. . . . .	84
5.20	Trajectórias percorridas por 13128 fotões que foram injectados no modelo simulado. . . . .	85
5.21	Perfusão obtida no fantoma de teflon® com: (a) o PF5000, e (b) o CO830, para S25% e para as três distâncias entre as fibras colectora e receptora. . . . .	88
5.22	Perfusão obtida no fantoma de acrílico com: (a) o PF5000, e (b) o CO785, com a DF1.20 para as três soluções testadas. . . . .	89
5.23	Histograma da profundidade média atingida pelos fotões detectados nas simulações Monte Carlo, quando o modelo é iluminada com luz laser de 635 nm de comprimento de onda, para as distâncias entre fibras emissora e receptora de: (a) 0,00 mm, (b) 0,14 mm, (c) 0,25 mm, e (d) 1,20 mm. . . . .	94
5.24	Histograma da profundidade média atingida pelos fotões detectados nas simulações Monte Carlo, quando o modelo é iluminada com luz laser de 785 nm de comprimento de onda, para as distâncias entre fibras emissora e receptora de: (a) 0,00 mm, (b) 0,14 mm, (c) 0,25 mm, e (d) 1,20 mm. . . . .	95

5.25	Histograma da profundidade média atingida pelos fótons detectados nas simulações Monte Carlo, quando o modelo é iluminada com luz laser de 830 nm de comprimento de onda, para as distâncias entre fibras emissora e receptora de: (a) 0,00 mm, (b) 0,14 mm, (c) 0,25 mm, e (d) 1,20 mm. . . . .	96
5.26	Espectros de potência obtidos durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO, com o díodo laser de 785 nm e a distância entre fibras emissora e receptora de 1,20 mm. . . . .	105
5.27	Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na face ventral do braço de um participante, com o PF5000, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	106
5.28	Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na face ventral do braço de um participante, com o CO635, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	107
5.29	Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na face ventral do braço de um participante, com o CO785, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	107
5.30	Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na face ventral do braço de um participante, com o CO830, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	108
5.31	Espectros de potência obtidos, durante o fluxo basal e o ZB, com o díodo laser de 830 nm e a distância entre fibras receptora e emissora de 0,25 mm. . . . .	115
5.32	Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na palma da mão de um participante, com o PF5000, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	116
5.33	Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na palma da mão de um participante, com o CO635, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	116
5.34	Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na palma da mão de um participante, com o CO785, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	117
5.35	Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na palma da mão de um participante, com o CO830, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	117
5.36	Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na face ventral do braço de um participante, durante o fluxo basal com o PF5000. . . . .	120
5.37	Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na face ventral do braço de um participante, durante o fluxo basal com o CO635. . . . .	120
5.38	Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na face ventral do braço de um participante, durante o fluxo basal com o CO785. . . . .	121
5.39	Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na face ventral do braço de um participante, durante o fluxo basal com o CO830. . . . .	121
5.40	Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na palma da mão de um participante, durante o fluxo basal com o PF5000. . . . .	123
5.41	Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na palma da mão de um participante, durante o fluxo basal com o CO635. . . . .	123
5.42	Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na palma da mão de um participante, durante o fluxo basal com o CO785. . . . .	124
5.43	Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na palma da mão de um participante, durante o fluxo basal com o CO830. . . . .	124

- 6.1 Sinais de perfusão sanguínea obtidos, em simultâneo na face ventral do braço (curva violeta) e na palma da mão (curva preta), num participante saudável. . . . . 135
- 6.2 Espectros de potência dos sinais de FLD obtidos, na face ventral do braço (curva violeta) e na palma da mão (curva preta), num participante saudável. 137
- 6.3 Traçado típico de sinais de perfusão sanguínea cutânea, recolhidos: (a) na ponta do dedo; e (b) na face ventral do braço em participantes saudáveis antes e durante o aquecimento local. . . . . 142
- 7.1 Protótipo invasivo. . . . . 148
- 7.2 Esquemático do protótipo invasivo composto pelos sistemas: (a) de actuação; e (b) de aquisição *self-mixing*. . . . . 148
- 7.3 Esquemático da micro-sonda constituída: (a) pela fibra óptica, (b) pelo suporte e (c) pela agulha. . . . . 149
- 7.4 Fantoma mecânico, constituído: *A* pelo motor, *B* pelo prato giratório e *D* pelo posicionador micrométrico. *C* representa a micro-sonda. . . . . 151
- 7.5 Sinal *self-mixing* obtido no fantoma, quando este se move: a) a 6, e b) a 48 mm/s, obtidos com o díodo laser de 1308 nm. A amplitude do sinal foi deslocada de modo a facilitar a visualização, uma vez que os dois sinais tem a mesma tensão média. . . . . 151
- 7.6 Fluxograma de aquisição e processamento de sinal em tempo real. . . . . 152
- 7.7 Fluxograma descritivo do método das contagens. . . . . 153
- 7.8 Sinal *self-mixing* (curva violeta), registado quando o fantoma se move a 6 mm/s, obtido com o díodo laser de 1308 nm, e a sua conversão num trem de impulsos binário (curva preta). . . . . 154
- 7.9 Autocorrelações obtidas para 0, 6, 10, 14, 19, 23, 27, 31, 35, 40, 44 e 48 mm/s com os díodos laser de: (a) 1308, e (b) 785 nm. . . . . 156
- 7.10 Fluxograma descritivo do método da autocorrelação. . . . . 157
- 7.11 Fluxograma descritivo do método do espectro de potência. . . . . 158
- 7.12 Espectros de potência obtidos para 0, 6, 10, 14, 19, 23, 27, 31, 35, 40, 44 e 48 mm/s com os díodos laser de: (a) 1308 e (b) 785 nm. . . . . 159
- 7.13 Montagem para aquisição de sinal *self-mixing* no altifalante, onde se podem ver: *A* a micro-sonda, *B* o espelho reflector, e *C* o altifalante. . . . . 160
- 7.14 Sinais *self-mixing* (curva violeta), obtidos com o diodo laser de: (a) 1308, e (b) 785 nm, quando o altifalante é excitado com uma sinusóide (curva azul). . . . . 161
- 7.15 Resultados obtidos na validação *in vitro* com os métodos de processamentos de sinal: a) MC, c) MA, e) M0 e g) M1 para o díodo laser de 1308 nm; e com os métodos de processamentos de sinal: b) MC, d) MA, f) M0 e h) M1 para o díodo laser de 785 nm. . . . . 163
- 7.16 Resultados da validação *in vivo* obtidos com: a) o Periflux 5000, e com protótipo com a M1308 para os métodos de processamento de sinal: b) MC, c) MA, d) M0 e e) M1. . . . . 167
- 7.17 Resultados da validação *in vivo* obtidos com: a) o Periflux 5000, e com protótipo com a M785 para os processamentos de sinal: b) MC, c) MA, d) M0 e e) M1. . . . . 168

8.1	Esquema de processamento em tempo real, onde se podem ver: (a) o fotodetector bi-celular, (b) o filtro analógico passa alto, (c) o filtro analógico passa baixo, (d) o sistema de amplificação dos sinais AC, e (d) a sua diferenciação. . . . .	175
8.2	Esquema de processamento em tempo real, onde se podem ver: (a) os blocos de ajustamento de sinal, (b) o bloco que representa a filtragem anti-aliasing, e (c) o ADC. $AC_{aj}$ e $DC_{aj}$ representam as componentes AC e DC ajustadas à entrada do ADC, e $AC_{fl}$ representa a componente AC filtrada. . . . .	176
B.1	Perfusão obtida no fantoma de teflon® com o PF5000 para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite. . . . .	188
B.2	Perfusão obtida no fantoma de teflon® com o comprimento de onda de 635 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite. . . . .	189
B.3	Perfusão obtida no fantoma de teflon® com o comprimento de onda de 785 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite. . . . .	190
B.4	Perfusão obtida no fantoma de teflon® com o comprimento de onda de 830 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite. . . . .	191
B.5	Perfusão obtida no fantoma de acrílico com o PF5000 para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite. . . . .	192
B.6	Perfusão obtida no fantoma de acrílico com o comprimento de onda de 635 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite. . . . .	193
B.7	Perfusão obtida no fantoma de acrílico com o comprimento de onda de 785 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite. . . . .	194
B.8	Perfusão obtida no fantoma de acrílico com o comprimento de onda de 830 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite. . . . .	195
C.1	Protótipo não-invasivo. . . . .	197
C.2	Protótipo invasivo. . . . .	197



# Lista de Tabelas

5.1	Valores MPE para os comprimentos de onda utilizados para um tempo de exposição entre $10^3$ e $3 \times 10^4$ . . . . .	62
5.2	Irradiâncias calculadas para os díodos laser utilizados no protótipo. . . . .	63
5.3	Representação binária dos vários tipos de dispositivos. . . . .	63
5.4	Descrição das funções dos comandos utilizados no protocolo de comunicação. . . . .	64
5.5	Declive ( $d_c$ ) e intersecção com o eixo dos $yy$ ( $b$ ) das rectas de ruído obtidas com os três LEDs de calibração em cada um dos canais de detecção. . . . .	72
5.6	Propriedades ópticas do leite e do teflon® para o comprimento de onda de 635 nm. . . . .	79
5.7	Profundidade média dos fotões que sofreram desvio Doppler, percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e número médio de dispersões Doppler por fotão quando é injectado leite no micro-tubo com 1,56 mm/s de velocidade. . . . .	80
5.8	Momento de ordem um do espectro de potência Doppler (M1) obtido no modelo simulado, para as concentrações e velocidades de fluido dispersor, e para as diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora simuladas. . . . .	82
5.9	Número médio, profundidade média e comprimento médio das trajectórias percorridos por cada fotão, para diferentes concentrações de leite e distâncias entre fibras emissora e receptora simuladas, para a velocidade de 1,56 mm/s . . . . .	86
5.10	Camadas de pele, espessura das camadas de pele e concentração de sangue para as três velocidades presentes em cada camada. . . . .	91
5.11	Propriedades ópticas ( $n$ , $\mu_a$ e $\mu_s$ ) para as seis camadas de pele, para o sangue (hematócrito de 42%) e para a melanina. . . . .	92
5.12	Propriedades ópticas ( $g$ e albedo) para as seis camadas de pele, para o sangue (hematócrito de 42%) e para a melanina. . . . .	92
5.13	Parâmetros da função de fase de dispersão de Gegenbauer kernel. . . . .	93
5.14	Profundidade média dos fotões que sofreram desvio Doppler, percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e número médio de dispersões Doppler sofridas por cada fotão nas simulações realizadas no modelo da pele humana. . . . .	97
5.15	Percentagem de eventos Doppler sofridos, em cada camada de pele, pelos fotões detectados a 0,00; 0,14; 0,25 e 1,20 mm da fibra emissora para os três comprimentos de onda simulados. . . . .	98
5.16	Momento de ordem um do espectro de potência Doppler (M1) obtido no modelo da pele para os comprimentos de onda e distâncias entre fibras emissora e receptora simulados. . . . .	99
5.17	Número médio, profundidade média e comprimento médio das trajectórias percorridas pelos fotões no modelo da pele humana simulado. . . . .	100

5.18	Perfusão sanguínea mediana (1º quartil; 3º quartil) obtida durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO, na face ventral do braço. . . . .	109
5.19	Percentagem de abaixamento e de aumento medianos (1º quartil; 3º quartil) obtidos nos sinais de perfusão sanguínea recolhidos na face ventral do braço. . . . .	110
5.20	Fracções de perfusão medianas (1º quartil; 3º quartil) entre diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora, obtidas na face ventral do braço durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO. . . . .	112
5.21	Fracções de perfusão medianas (1º quartil; 3º quartil) entre diferentes comprimentos de onda, obtidas na face ventral do braço durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO. . . . .	113
5.22	Tempos de subida e de descida medianos (1º quartil; 3º quartil) obtidos na face ventral do braço. . . . .	114
5.23	Perfusão sanguínea mediana (1º quartil; 3º quartil) obtida durante o fluxo basal e o ZB, na face ventral do braço e na palma da mão. . . . .	118
5.24	Percentagem de abaixamento e tempo de subida medianos (1º quartil; 3º quartil) obtidos nos sinais de perfusão sanguínea recolhidos na face ventral do braço e na palma da mão. . . . .	119
5.25	Valores medianos da potência medida nas 5 bandas de frequência analisadas (I, II, III, IV e V), obtidas nos sinais de perfusão sanguínea adquiridos na face ventral do braço, durante o fluxo basal, para as diferentes distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	125
5.26	Valores medianos da potência medida nas 5 bandas de frequência analisadas (I, II, III, IV e V), obtidas nos sinais de perfusão sanguínea adquiridos na palma da mão, durante o fluxo basal, para as diferentes distâncias entre as fibras emissora e receptora. . . . .	126
5.27	Coerência média entre os sinais de perfusão sanguínea obtidos com diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora, durante o fluxo basal e o zero biológico, medidos na face ventral do braço. . . . .	127
5.28	Coerência média entre os sinais de perfusão sanguínea medidos na face ventral do braço com diferentes comprimentos de onda, durante o fluxo basal e o zero biológico. . . . .	128
5.29	Coerência média entre os sinais de perfusão sanguínea medidas na palma da mão com diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora, durante o fluxo basal e o zero biológico. . . . .	129
5.30	Coerência média entre os sinais de perfusão sanguínea medidas na palma da mão com diferentes comprimentos de onda, durante o fluxo basal e o zero biológico. . . . .	130
6.1	SampEn média (desvio padrão) obtida para os segmentos de sinal de perfusão sanguínea analisados, antes e depois de 25 minutos de aquecimento a 42 °C; as comparações foram realizadas com ANOVA (AM1: amostra 1 e AM2: amostra 2). . . . .	143
6.2	SampEn média (desvio padrão) obtida para os segmentos de sinal perfusão sanguínea analisados, antes e depois de 25 minutos de aquecimento a 42 °C; o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação estatística entre grupos. . . . .	144

7.1	Propriedades ópticas da matéria cinzenta, sangue oxigenado e desoxigenado, para o comprimento de onda de 785 nm. . . . .	164
7.2	Profundidade média dos fotões que sofreram desvio Doppler, número médio de dispersões Doppler sofridas por cada fotão, percentagem de fotões que sofreram desvio Doppler e M1, obtidos no modelo do cérebro de rato. . . . .	165
7.3	Correlações obtidas entre os resultados obtidos com a sonda da Perimed® e os resultados obtidos as micro-sondas. . . . .	166
A.1	Profundidade média dos eventos Doppler para cada fotão, percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e o número médio de dispersões Doppler por fotão quando é injectado leite no micro-tubo para o comprimento de onda de 635 nm. . . . .	180
A.2	Profundidade média dos eventos Doppler para cada fotão, percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e o número médio de dispersões Doppler por fotão quando é injectada solução aquosa de leite a 50% no microtubo para o comprimento de onda de 635 nm. . . . .	181
A.3	Profundidade média dos eventos Doppler para cada fotão, percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e o número médio de dispersões Doppler por fotão quando é injectada solução aquosa de leite a 25% no microtubo para o comprimento de onda de 635 nm. . . . .	182
A.4	Número médio de caminhos percorridos, profundidade média e caminho médio percorrido, quando é utilizado leite como dispersor. . . . .	183
A.5	Número médio de caminhos percorridos, profundidade média e caminho médio percorrido, quando é utilizada uma solução aquosa com 50% de leite como dispersor. . . . .	184
A.6	Número médio de caminhos percorridos, profundidade média e caminho médio percorrido, quando é utilizada uma solução aquosa com 25% de leite como dispersor. . . . .	185
B.1	Coefficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos nos resultados da perfusão recolhidos no fantoma de teflon®, $p < 0,01$ , excepto nos casos referidos. . . . .	196
B.2	Coefficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos nos resultados d perfusão recolhidos no fantoma de acrílico, $p < 0,01$ . . . . .	196



# Capítulo 1

## Introdução

*Neste capítulo é apresentado o enquadramento e a motivação do trabalho realizado, assim como a descrição dos seus objectivos. Na parte final do capítulo é apresentada a estrutura da tese e os trabalhos publicados.*

### 1.1 Enquadramento e Motivação

A fluxometria laser Doppler (FLD) é uma técnica desenvolvida para a medição, em tempo real, do fluxo microcirculatório de tecidos biológicos. Esta técnica pode ser utilizada para medições não invasivas da perfusão sanguínea, como por exemplo a medição da perfusão na pele, ou para medições invasivas, como por exemplo a medição da perfusão em cérebro e órgãos.

Há muitas dificuldades na estimação do volume e profundidade amostrados nas medições da perfusão sanguínea na pele [1–3]. Para além disso, há muitas incertezas na interpretação da fracção de fotões que sofre desvio Doppler relativamente à que não sofre esse desvio [4]. A incerteza na profundidade amostrada leva a ambiguidades na interpretação da fracção de luz dispersa pelas camadas mais superficiais (circulação nutricional), e da fracção de luz dispersa pelas camadas mais profundas (circulação termo-regulatória) da pele [2, 4]. Uma vez que doenças como a diabetes, o fenómeno de Raynaud e a esclerose sistémica afectam de forma distinta as diferentes camadas da rede microcirculatória da pele, uma ferramenta capaz de avaliar de forma fidedigna essas mesmas camadas seria proveitoso para o diagnóstico dessas mesmas patologias. De modo a ultrapassar a referida limitação, é proposto o desenvolvimento e a validação de um novo fluxómetro protótipo constituído por três díodos laser com diferentes comprimentos de onda, e por

três canais de detecção para recolha de luz dispersa proveniente de fibras receptoras localizadas a diferentes distâncias da fibra óptica emissora. O efeito destas duas variáveis (comprimento de onda e configuração da sonda) na monitorização da perfusão da pele, foram já estudadas por alguns grupos, no entanto nunca foi construído um fluxómetro que as abarcasse em simultâneo.

Diferentes regiões da pele apresentam características fisiológicas e anatómicas distintas. Com o objectivo de perceber se essas diferenças afectam os sinais de perfusão sanguínea foi realizado um estudo em sinais recolhidos em sujeitos saudáveis com um fluxómetro comercial [5]. Uma vez que diferentes técnicas de processamento de sinal aplicadas a sinais de perfusão sanguínea, podem fornecer informação importante para a compreensão da função microvascular em pacientes com patologias que afectam o fluxo microcirculatório [6], foi realizado um estudo onde foi comparada a regularidade dos sinais de perfusão sanguínea obtidos em voluntários saudáveis e em pacientes [7].

A crescente necessidade do acompanhamento da actividade funcional do cérebro, em tempo real e com elevada resolução espacial, tem resultado no aumento do interesse do uso de micro-sensores de monitorização da actividade do cérebro. Actualmente estão disponíveis técnicas de imagiologia funcional não invasiva para mapeamento do cérebro, *e.g.* tomografia de emissão de positrões (PET) e imagiologia de ressonância magnética funcional (fMRI). Estas técnicas permitem monitorizar a actividade funcional do cérebro, no entanto os processos neurobiológicos responsáveis por essa actividade ainda são desconhecidos [8]. A limitada reserva de energia no cérebro, torna o fornecimento contínuo de glucose e de oxigénio obrigatório para sustentar a actividade neuronal, pois os neurónios têm uma taxa metabólica elevada, uma baixa capacidade de armazenamento, e são muito sensíveis à privação de oxigénio. Este fornecimento é regulado local e dinamicamente, de modo a responder à demanda energética associada ao aumento da actividade neuronal. A existência de mecanismos que correlacionam as variações da actividade neuronal com o fluxo sanguíneo disponível localmente, foi sugerido há mais de um século atrás, mas os processos que o sustentam não estão totalmente esclarecidas [9]. É portanto necessário que o acesso quantitativo ao fluxo sanguíneo cerebral seja realizado com uma grande resolução temporal e espacial. A FLD é uma técnica cada vez mais utilizada na avaliação, em tempo real, das alterações de fluxo sanguíneo cerebral, e no estudo dos mecanismos de controlo através dos quais o cérebro controla o seu próprio fornecimento de sangue [10]. Esta técnica apresenta uma resolução espacial razoável para ser utilizado na investigação

dos mecanismos que regulam a hemodinâmica cerebral, uma vez que o volume amostrado é cerca de  $1 \text{ mm}^3$  [11]. No entanto, as sondas laser Doppler disponíveis comercialmente têm dimensões demasiado grandes (na ordem dos  $450 \mu\text{m}$ ), podendo causar danos nos tecidos de tal modo que podem prejudicar as próprias medições. Para ultrapassar esta limitação, uma micro-sonda laser Doppler baseada no método de detecção *self-mixing* foi desenvolvida [12].

## 1.2 Objectivos

### 1.2.1 Medições não invasivas - discriminação em profundidade

A profundidade de penetração da luz laser nos tecidos depende do comprimento de onda da luz laser [1, 2, 13, 14], da largura de banda com que o sinal é filtrado e da configuração da sonda, nomeadamente da utilização de diferentes distâncias entre as fibras emissora e receptora [1, 2, 13, 14].

A monitorização da perfusão sanguínea com diferentes comprimentos de onda permite a medição do fluxo microcirculatório presente nas diferentes camadas microcirculatórias da pele, uma vez que as propriedades ópticas (coeficientes de absorção e dispersão) do sangue e dos tecidos cutâneos dependem do comprimento de onda da luz laser. Alguns estudos, onde se compara a perfusão sanguínea obtida com diferentes comprimentos de onda, foram realizados [1, 3, 13–18]. Esses estudos pretendiam demonstrar que quando é utilizado um determinado comprimento de onda é monitorizado o fluxo sanguíneo presente numa determinada camada microcirculatória da pele [19].

A maioria dos dispositivos de FLD disponíveis no mercado, utilizam díodos laser com 780 nm. No entanto, foram utilizados diferentes comprimentos de onda, no intervalo compreendido entre os 540 e 810 nm, em diversos estudos científicos [19], tendo sido demonstrado que a profundidade de penetração da luz aumenta com o comprimento de onda [3, 19]. Isto deve-se ao facto de que, para os comprimentos de onda mais curtos (inferiores a 670 nm), há um aumento dos coeficientes absorção e dispersão da pele, causado pela presença de melanina, e de outros pigmentos do sangue, como a hemoglobina e a oxi-hemoglobina (que têm coeficientes de absorção elevados), e pelos tecidos fibrosos, como por exemplo as fibras de colagénio (que têm coeficientes de dispersão elevados) [20].

Nalguns trabalhos apresentados na literatura, foi mostrado que luz verde ( $\lambda=540$  nm), atinge apenas a camada mais superficial da microcirculação cutânea, tendo sido estimada uma profundidade média de penetração de  $150 \mu\text{m}$  [16, 21, 22]. Comprimentos de onda na zona do vermelho (intervalo compreendido entre os 630 e os 740 nm), conseguem atingir profundidades maiores, embora ainda sejam muito dependentes da quantidade de cromóforos presentes na pele [1, 13, 15–17]. Uma profundidade de penetração entre os 600 e os  $1.000 \mu\text{m}$ , foi estimada para estes comprimentos de onda [14, 18, 23, 24]. No que diz respeito à luz no infra-vermelho próximo (comprimentos de onda superiores a 800 nm), foi reconhecido que, pode penetrar mais profundamente nos tecidos pois é menos absorvida pelos pigmentos da pele do que a luz com comprimentos de onda mais curtos [15, 19, 25]. Estimativas apresentadas na literatura atribuíram uma profundidade média de penetração de aproximadamente 1,2 mm a este comprimento de onda.

Estudos realizados com diferentes configurações de sondas laser Doppler mostraram que a profundidade de penetração da luz aumenta com a distância entre as fibras emissora e receptora, e conseqüentemente, aumenta também o volume amostrado nas medições da perfusão sanguínea [2, 26–29]. Estas observações sugerem a possibilidade de discriminação do fluxo sanguíneo presente das diferentes camadas do tecido cutâneo [3, 30, 31], no entanto a maioria das sondas laser Doppler disponíveis no mercado, utilizam apenas separações de 0,25 mm entre as fibras emissora e receptora.

Apenas dois trabalhos analisaram, em simultâneo e *in vivo*, a influência da distância entre fibras emissora e receptora e do comprimento de onda, nas medições da perfusão sanguínea [27, 32]. Gush *et al.* [27] estudou o efeito de diferentes comprimentos de onda (633, 514 e 477 nm) e de diferentes distâncias entre fibras (0,8; 1,1; 1,6; 2,45; 3,65 e 4,6 mm). No entanto, os comprimentos de onda estudados estão na gama da luz visível, onde a penetração da luz é muito influenciada pelas propriedades ópticas do tecido. Para além disso, as distâncias entre as fibras utilizadas são muito grandes, e os sinais obtidos em cada distância foram recolhidos separadamente, pois a sonda apenas tinha uma fibra receptora, que a cada aquisição era posicionada a uma determinada distância da fibra emissora. No trabalho de Freccero *et al.* [32], a influência de diferentes comprimentos de onda nas medições da perfusão sanguínea, foram estudados com dois fluxómetros distintos (um fluxómetro de registo pontual da perfusão sanguínea e outro de registo em imagem). A comparação de resultados obtidos com sistemas diferentes revela dificuldades metodológicas, uma vez que diferentes processamentos de sinal e diferentes

métodos de calibração são utilizados nos diferentes dispositivos.

O fluxómetro comercial, *Periflux 5000* da Perimed® (Suécia), utilizado como fluxómetro padrão na comparação com os resultados obtidos com o protótipo desenvolvido, apresenta um volume amostrado na gama compreendida entre os 0,5 a 1  $mm^3$  para uma separação entre fibras emissora e receptora de 0,25 mm, e para o comprimento de onda de 780 nm, segundo o respectivo manual de utilização [33].

Simulações Monte Carlo foram realizadas por Fredriksson *et al.* [34], onde foi estudada a influência de diferentes comprimentos de onda e diferentes separações entre as fibras ópticas na profundidade atingida pelos fotões detectados. No entanto, estas variáveis têm de ser testadas *in vivo*, uma vez que a complexidade da estrutura da pele, a sua anatomia vascular, os seus complexos mecanismos de regulação, e as variações regionais do fluxo microcirculatório, não são tidos em conta nas simulações numéricas.

Tendo em conta os factos acima discutidos foi desenvolvido um fluxómetro protótipo com três comprimentos de onda e três canais de detecção, que permitem a detecção de luz dispersa por três fibras ópticas receptoras, posicionadas a diferentes distâncias da fibra emissora. O uso destas variáveis num só protótipo permite superar problemas, tais como diferentes processamentos de sinal e diferentes processos de calibração implementados em diferentes dispositivos, possibilitando que a perfusão sanguínea obtida com diferentes comprimentos de onda e fibras receptoras, posicionadas a diversas distâncias da fibra emissora, possam ser comparadas. Além disso, e a fim de evitar factores instrumentais cujos efeitos não podem ser correctamente julgados, mudanças dinâmicas como a hiperemia reactiva pós-oclusiva (ao invés da simples monitorização contínua da perfusão sanguínea) são avaliadas.

### 1.2.2 Estudos realizados em sinais de FLD

Dois estudos independentes, aplicados em sinais de perfusão sanguínea foram realizados no decorrer dos trabalhos desenvolvidos e descritos nesta dissertação.

Um dos estudos pretende clarificar se diferenças na anatomia vascular, na espessura da pele e no controlo fisiológico, existentes em diferentes regiões de pele, como por exemplo na palma de mão e na face ventral do braço, afectam os sinais de perfusão sanguínea. Para isso, foi efectuada a análise temporal e espectral de sinais recolhidos em voluntários

saudáveis, com um fluxómetro comercial, em simultâneo, na palma de mão e na face ventral do braço [5].

Diferentes processamentos de sinal tem vindo a ser aplicados em sinais de FLD de modo a clarificar o efeito de certas doenças no fluxo microcirculatório. A transformada de Fourier foi aplicada a sinais perfusão sanguínea recolhidos em pacientes com fenómeno de Raynaud (FR) e com esclerose sistémica (SSc), no entanto não foram encontradas diferenças entre os grupos de pacientes e o grupo de controlo [35]. Com o objectivo de analisar o modo como as patologias referidas modificam a regularidade dos sinais de FLD, a entropia de sinais de FLD recolhidos, antes e durante o aquecimento cutâneo local, em pacientes (com FR e SSc) foram processados e comparados com a entropia da perfusão sanguínea medida, nas situações referidas, em participantes saudáveis.

### 1.2.3 Medições invasivas - a necessidade de uma micro-sonda

As sondas laser Doppler disponíveis no mercado são baseadas no método de detecção tradicional, onde uma fibra óptica emissora e uma fibra óptica receptora são necessárias, restringindo o seu diâmetro externo mínimo a 450  $\mu m$ . O desenvolvimento de sondas com diâmetros menores, que permitam o acompanhamento das alterações do fluxo sanguíneo nas estruturas cerebrais profundas, minimizando os danos nos tecidos e o seu impacto sobre o ambiente natural, é um requisito importante para entender melhor como o cérebro controla seu próprio fornecimento de sangue. Assim, para monitorizar as mudanças do fluxo sanguíneo nas estruturas cerebrais profundas, foram desenvolvidas duas sondas laser Doppler miniaturizadas, baseadas na técnica de detecção *self-mixing* [36]. Esta técnica é proposta com o objectivo de ultrapassar a limitação do diâmetro externo mínimo da sonda, imposto pelo tamanho das fibras ópticas (fibra emissora e receptora) e pela distância de separação entre elas [12].

Esta sonda será aplicada *in vivo* em cérebro de ratos, acoplada a um microeléctrodo para medição do óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre gasoso e um mensageiro intercelular ubíquo produzido por três isoformas de óxido nítrico sintases (nNOS, eNOS, iNOS). A relevância biológica da medição em simultâneo do NO e do fluxo sanguíneo cerebral está relacionada com o papel desempenhado por esta molécula nas diversas vias de sinalização celular. O NO é um neuromodulador envolvido em importantes mecanismos neuronais, como a aprendizagem e a memória, sendo também um potente vasodilatador [37].

Devido à sua elevada hidrofobicidade, quando produzido pelos neurónios activos, pode difundir-se até aos vasos sanguíneos adjacentes. Uma vez nas células musculares desses vasos, o NO promove o vaso-relaxamento aumentando assim o fluxo sanguíneo local via activação da guanilato ciclase solúvel [37]. Estes mecanismos responsáveis pelo acréscimo do fluxo sanguíneo local em resposta ao aumento das necessidades metabólicas impostas pelo aumento de actividade neuronal é vital para o cérebro manter a sua integridade funcional e estrutural. O desenvolvimento de abordagens experimentais que permitam o estudo *in vivo* destes mecanismos, minimizando a perturbação imposta pela necessidade de se medir de forma invasiva os eventos no seu ambiente natural, constitui uma mais-valia para um conhecimento mais profundo da forma como o cérebro regula o fornecimento sanguíneo local.

### 1.3 Estrutura da Tese

Esta dissertação está dividida em 8 Capítulos.

- No **Capítulo 1** é feita uma introdução ao tema da tese, onde são relatados o enquadramento e motivação, assim como os objectivos do trabalho desenvolvido. Também são referidos os artigos publicados no âmbito deste trabalho.
- A fisiologia do sistema microcirculatório é relatada no **Capítulo 2**. Para além disso, é descrita a fisiologia da microcirculação na pele e no cérebro de rato.
- A análise teórica subjacente à fluxometria laser Doppler é explicada no **Capítulo 3**. São descritos os métodos de detecção, sendo também discutidas as limitações da técnica.
- A descrição do software utilizado para as simulações Monte Carlo é feita no **Capítulo 4**. É neste capítulo que é introduzida a teoria de transporte, onde são expostas as propriedades ópticas.
- No **Capítulo 5** é descrito o protótipo para medição da microcirculação na pele humana e são apresentados os métodos utilizados para a sua validação *in vitro* e *in vivo*. Finalmente, os dados obtidos são discutidos e as conclusões são apresentadas.

- Dois trabalhos de processamento de sinal realizados são descritos no **Capítulo 6**.
- No **Capítulo 7** é introduzido o protótipo para medição da microcirculação em cérebro de rato. Neste capítulo são também apresentados os métodos utilizados para a validação *in vitro* e *in vivo* deste protótipo. Finalmente, os dados obtidos são discutidos e as conclusões são apresentadas.
- A tese termina com o **Capítulo 8**, onde é feito um resumo das principais conclusões dos trabalhos realizados e onde são descritas sugestões de trabalho futuro.

## 1.4 Contribuições científicas

As contribuições científicas do trabalho descrito nesta dissertação são as seguintes:

### Capítulo de livro

**FIGUEIRAS E.**, REQUICHA FERREIRA L.F., DE MUL F.F.M., HUMEAU A., “Monte Carlo methods to numerically simulate signals reflecting the microvascular perfusion”, capítulo do livro “Numerical Simulations - Applications, Examples and Theory”, editado por : Lutz Angermann, ISBN: 978-953-307-440-5, Editora : InTech, Data de publicação: Janeiro de 2011 (<http://www.intechopen.com/articles/show/title/monte-carlo-methods-to-numerically-simulate-signals-reflecting-the-microvascular-perfusion>).

### Patente

**FIGUEIRAS E.**, REQUICHA FERREIRA L.F., OLIVEIRA R., “METHOD AND SELF-MIXING MICROPROBE FOR MEASURING THE BLOOD FLOW IN LIVING TISSUE”, submetido ao INPI como pedido provisório de patente.

### Publicações em revistas internacionais

**FIGUEIRAS E.**, OLIVEIRA R., LOURENÇO C.F., CAMPOS R., BARBOSA R.M., LARANJINHA J., REQUICHA FERREIRA L.F., de MUL F.F.M., HUMEAU-HEURTIER A., “Self-mixing microprobe to monitor microvascular perfusion in rat brain”, submetido para IEEE Transactions on Biomedical Engineering.

**FIGUEIRAS E.**, CAMPOS R., SEMEDO S., OLIVEIRA R., REQUICHA FERREIRA L.F., HUMEAU-HEURTIER A., “A new laser Doppler flowmeter prototype for depth dependent monitoring of skin microcirculation”, aceite para publicação na Review of Scientific Instruments.

**FIGUEIRAS E.**, ROUSTIT M., SEMEDO S., REQUICHA FERREIRA L.F., CRAWOSKI J.L., HUMEAU A. “Sample entropy of laser Doppler flowmetry signals increases in patients with systemic sclerosis”, *Microvascular Research*, 82(2), 152-155, 2011.

Actas em congressos internacionais

**FIGUEIRAS E.**, CAMPOS R., OLIVEIRA R., REQUICHA FERREIRA L.F., HUMEAU-HEURTIER A., “A new laser Doppler flowmeter prototype for microcirculation skin depth monitoring - in vitro validation and in vivo preliminary results”, *Biodevices 2012 - Proceedings of the International Conference on Biomedical Electronics and Devices*, pp. 154-159, editada por Joaquim Gabriel, Carlos Correia, Ana Fred e Hugo Gamboa, ISBN 978-989-8425-91-1, 1-4 Fevereiro, 2012, Vilamoura (Portugal).

**FIGUEIRAS E.**, CAMPOS R., OLIVEIRA R., REQUICHA FERREIRA L.F., de MUL F.F.M., HUMEAU-HEURTIER A., “Laser doppler flowmeters prototypes validation using Monte Carlo simulations”, *Bioinformatics 2012 - Proceedings of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms*, pp. 24-33, editada por Jan Schier, Carlos Correia, Ana Fred e Hugo Gamboa, ISBN 978-989-8425-90-4, 1-4 Fevereiro, 2012, Vilamoura (Portugal). Bioinformatics 2012 best student paper award.

**FIGUEIRAS E.**, REQUICHA FERREIRA L.F., HUMEAU A. “Phantom validation for depth assessment in laser Doppler flowmetry technique”, *EOS Topical Meeting on Diffractive Optics*, ISBN 978-3-00-024193-2, 14-18 Fevereiro, 2010, Koli (Finlândia).

**FIGUEIRAS E.**, ABRAHAM P., REQUICHA FERREIRA L.F., HUMEAU A. “Comparison between laser Doppler flowmetry signals recorded in glabrous and non glabrous skin: time and frequency analyses”, *BIOSIGNALS 2010 - International Conference on Bio-inspired Systems and Signal Processing*, pp. 133-138, 20-23 Janeiro, 2010, Valencia (Espanha).

**FIGUEIRAS E.**, LOUREIRO V., REQUICHA FERREIRA L.F., HUMEAU A. “Some reasons to build a new laser Doppler flowmeter to monitor microvascular blood flow”, Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress 2009, IFMBE Proceedings, vol. 25 IV, O. Dossel and W.C. Schlegel (Eds), pp. 1865-1868, ISBN: 1-4244-0788-5, 7-12 Setembro, 2009, Munique (Alemanha).

Actas em congressos nacionais

**FIGUEIRAS E.**, REQUICHA FERREIRA L.F., HUMEAU-HEURTIER A. (2012) "Conception d'un prototype de nouveau fluxmètre laser Doppler pour l'étude de la perfusion microvasculaire." aceite para publicação na OPT-DIAG 2012, 9-11 Maio, 2012, Paris (France).

CAMPOS R., **FIGUEIRAS E.**, REQUICHA FERREIRA L.F., HUMEAU-HEURTIER A., “Spectral analysis of laser Doppler flowmetry signals”, 2<sup>nd</sup> Portuguese Meeting in Bioengineering, 23-25 Fevereiro, 2012, Coimbra (Portugal).

**FIGUEIRAS E.**, “Laser Doppler flowmeters for microcirculation measurements”, 11ème Journée des Doctorants - JDoc 2011, Faculté des Sciences et Technologies de l'Information et Mathématiques, Université de Nantes, 14 Abril, 2011, Nantes (France).

OLIVEIRA R., SEMEDO S., **FIGUEIRAS E.**, REQUICHA Ferreira L.F., HUMEAU A., “Laser Doppler flowmeters for microcirculation measurements”, 1st Portuguese Meeting in Bioengineering - Bioengineering and Medical Sciences, Portuguese chapter of IEEE EMB, pp. 182-185, 1-4 Março, 2011, Lisboa (Portugal).

**FIGUEIRAS E.**, SEMEDO S., REQUICHA FERREIRA L.F., HUMEAU A. “Démonstrateur d'un fantôme pour la validation d'un prototype de fluxmètre laser Doppler dans le domaine du biomédical”, Actes des 3èmes Journées Démonstrateurs du Club EEA (Electronique Electrotechnique Automatique), 30 Novembro a 1 Dezembro, 2010, Angers (France).

**FIGUEIRAS E.**, REQUICHA FERREIRA L.F., HUMEAU A. “Instrumentation, modélisation, et traitement des signaux biomédicaux reflétant la microcirculation sanguine : contribution à la technique de fluxmétrie laser Doppler”, 16ème colloque national de la recherche dans les IUT, 9-11 Junho, 2010, Angers (France).

## Capítulo 2

# Rede vascular microcirculatória

*Neste capítulo é apresentado o sistema microcirculatório e é descrita a sua organização nos tecidos biológicos que foram alvo de estudo nos trabalhos desenvolvidos e apresentados nesta dissertação.*

### 2.1 Microcirculação

A rede vascular microcirculatória engloba os vasos com diâmetro inferior a  $100 \mu m$ , *i.e.*, os vasos sanguíneos mais periféricos da árvore circulatória. Esta rede é constituída por arteríolas, que conduzem o sangue para os capilares através dos esfíncteres pré-capilares, e capilares que por sua vez se reúnem e formam as vénulas. Existem vasos que vão directamente das arteríolas para as vénulas, através de um mecanismo de contracorrente, não originando redes capilares. Estes vasos são conhecidos como anastomoses arteriovenosas (AVAs), ou simplesmente *shunts* vasculares [38].

A troca de nutrientes e materiais gasosos ocorre ao nível dos capilares sanguíneos, pois estes micro-vasos são constituídos por paredes muito finas. Os capilares sanguíneos são de extrema importância para a manutenção de um ambiente celular equilibrado, proporcionando um meio homeostático a todas as células do organismo [38]. Por sua vez, as arteríolas são constituídas por músculo liso e tecido elástico, contribuindo para as capacidades vasoactivas que este tipo de vasos têm. Por esta razão as arteríolas, juntamente com os esfíncteres pré-capilares, são os principais contribuintes para a resistência vascular periférica. Esta resistência tem a capacidade de alterar aspectos centrais do sistema

cardíaco, e tem como função diminuir a pressão arterial para o nível de pressão dos capilares, de modo a facilitar as trocas entre os vasos e os tecidos [38]. Foi já demonstrado que o fluxo nos capilares é de natureza pulsatória (intermitente) devido à actividade rítmica vasomotora dos esfíncteres pré-capilares. Estes esfíncteres também respondem a alterações locais químicas de metabolitos, ou a estímulos do sistema simpático. Em conjunto com as arteríolas, os esfíncteres pré-capilares também ajustam a quantidade de fluxo de sangue de modo a responder às necessidades energéticas dos tecidos [38].

O fluxo microcirculatório é controlado pelo sistema nervoso autónomo, mas também pode sofrer alterações devido a variações na concentração de gases e hormonas no sangue, ou devido a factores físicos como variações de temperatura e pressão [29]. Estes estímulos aumentam ou diminuem a perfusão microvascular regulando a vasoconstricção ou a vasodilatação das arteríolas.

Os AVAs, presentes apenas em algumas regiões da pele, têm a capacidade de aumentar ou diminuir rapidamente o fluxo sanguíneo de modo a alimentar ou a drenar a rede capilar [39]. Para além disso, têm funções termo-regulatórias, pois regulam a temperatura corporal através da dissipação do calor para o ambiente, mediante a modulação do fluxo sanguíneo nestes vasos [39].

### 2.1.1 Microcirculação cutânea

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem como função proteger o corpo de factores externos, como a temperatura e os agentes patogénicos. Um desenho esquemático representando a estrutura da pele e a sua microcirculação pode ser visto na figura 2.1. A pele é constituída por uma camada superficial, a epiderme, e uma camada profunda, a derme, que por sua vez está ancorada à hipoderme [40, 41]. Esta última é também conhecida como tecido ou gordura subcutâneo.

A epiderme, com uma espessura que varia entre 50 e 400  $\mu m$ , não contém vasos sanguíneos e é transparente à luz, principalmente à radiação no infra-vermelho próximo. Esta camada contém um cromóforo, a melanina, que contribui para a coloração da pele. A melanina absorve luz para o intervalo de comprimentos de onda compreendido entre os 200 e os 800 nm [40, 41], sendo que o seu coeficiente de absorção diminui com o aumento do comprimento de onda. A derme, localizada por baixo da epiderme, é constituída por fibras de colagénio, fibras elásticas, tecido conjuntivo, e possui também uma rede

microvascular. A camada mais superficial desta rede vascular, localizada a 400-500  $\mu\text{m}$  da superfície da pele, é conhecida como derme papilar. Na derme papilar os capilares sanguíneos formam laços capilares que fornecem nutrientes e eliminam desperdícios das células cutâneas [29, 40, 41]. Na camada inferior, o plexo subpapilar, constituído por uma densa rede microvascular, sustenta os laços capilares. Este plexo está em contacto com o plexo subcutâneo através de uma rede de arteríolas ascendentes e vénulas descendentes, que constituem a derme reticular. Os dois plexos são constituídos por vasos sanguíneos com uma orientação paralela à superfície da pele, enquanto que os vasos sanguíneos presentes na derme reticular têm uma orientação perpendicular [40, 41]. O plexo cutâneo está a 1,9 mm da superfície da pele [29]. Nalgumas zonas como os dedos, o nariz, os lábios e as orelhas podem ser encontrados os AVAs entre os dois plexos referidos [29]. A camada mais profunda, o tecido subcutâneo, é constituída por artérias e veias de pequeno diâmetro [40, 41].

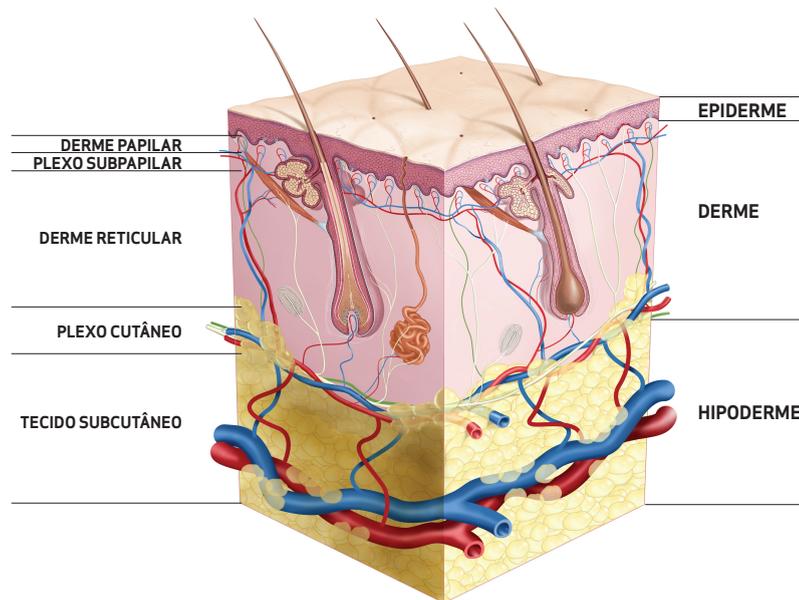


FIGURA 2.1: Ilustração da microcirculação cutânea.

De acordo com a literatura, 10% do fluxo cutâneo está presente na microcirculação nutricional e 90% está nos vasos maiores e mais profundos da camada termo-regulatória e nas áreas com fluxo sanguíneo com velocidades maiores [19, 40]. Os movimentos e direcções dos glóbulos vermelhos nos capilares e nos vasos maiores são diferentes. Nos capilares eles seguem um único percurso porque o tamanho do lúmen é aproximadamente o diâmetro dos glóbulos vermelhos, enquanto que nas arteríolas e vénulas ocorrem movimentos transversos (há um volume tri-dimensional de sangue) [1].

Vários fenómenos fisiológicos causam oscilações na microcirculação cutânea. A análise espectral dos sinais de perfusão sanguínea, no intervalo de frequências entre 0,0095 e 1,6 Hz, revela oscilações distribuídas em determinados intervalos de frequência, sendo já conhecida a sua causa fisiológica. Foram identificadas 6 bandas de frequência características na microcirculação cutânea, com origem em mecanismos de regulação central ou local [42–44]. As referidas bandas de frequência reflectem as influências [42, 44, 45]:

- do batimento cardíaco (0,4 a 1,6 Hz);
- da frequência respiratória (0,15 a 0,4 Hz);
- da actividade miogénica das células do músculo liso presentes nas paredes dos vasos sanguíneos, que regulam a pressão sanguínea (0,06 a 0,15 Hz)
- da actividade neurogénica e metabólica, provocada pelo sistema simpático, que regula a pressão sanguínea através da regulação do diâmetro dos vasos sanguíneos (0,02 a 0,006 Hz);
- da actividade endotelial relacionada com a actividade metabólica da perfusão local (0,0095 a 0,02 Hz); e
- doutros mecanismos endoteliais, como o factor de hiperpolarização derivado do endotélio (0,005-0,0095 Hz).

Cada um destes intervalos de frequência foi estimado tendo em conta possíveis variações (temporais e inter-sujeitos) e pode ser aplicada em indivíduos saudáveis ou atléticos, assim como em pacientes com problemas cardíacos [44].

### **2.1.1.1 Monitorização da microcirculação cutânea**

Apesar da microcirculação ter sido descoberta à algumas décadas [38], os métodos para estudar esta parte do sistema circulatório estão menos desenvolvidos, quando comparados com as técnicas de medição de fluxo nos vasos grandes. As principais razões são a complexidade da rede microcirculatória tri-dimensional, assim como as diferentes funções do fluxo sanguíneo, nomeadamente a regulação da temperatura, a regulação nutricional e hormonal, e o transporte enzimático [46]. Existem uma série de técnicas para medir a microcirculação sanguínea na pele, tais como capilaroscopia clínica, termografia, condutividade térmica, pletismografia, *etc.* [47, 48]. A FLD tem vindo a estabelecer-se como um

método eficaz e de confiança para a monitorização do fluxo sanguíneo microcirculatório, no entanto, tal como as outras técnicas referidas, não tem capacidade para discriminar a profundidade ou o tipo de vasos monitorizados [47].

A pele é provavelmente o órgão mais estudado através da técnica de FLD e a sua microcirculação é afectada de diversas maneiras [48]. O plexo superficial e os laços capilares são afectados por doenças como os eczemas, a psoríase e o acne, enquanto que a microcirculação profunda é mais afectada por alterações cardiovasculares centrais. Por outro lado, doenças complexas, como a diabetes podem actuar nos dois níveis de microcirculação [49]. No caso da diabetes, estimou-se que em 2010 6,4 % da população mundial sofria desta maleita, sendo que se espera que esse número cresça para 7,8% em 2030 [50]. A diferenciação do fluxo sanguíneo superficial e profundo na avaliação da perfusão sanguínea cutânea em pacientes com fenómeno de Raynaud, com diabetes, com doenças vasculares periféricas, arteriosclerose, doenças obstrutivas e oclusivas, ou o acesso à profundidade de queimaduras cutâneas, *etc.* [49, 51] pode revelar informação valiosa de diagnóstico e aumentar a nossa compreensão acerca das referidas maleitas [19].

A avaliação da microcirculação, através do uso de métodos não invasivos com o mínimo de influência nos parâmetros em estudo, como é o caso da FLD, pode ser uma janela para a compreensão da fisiologia e das patologias do sistema microcirculatório [39].

### **2.1.2 Microcirculação do cérebro de ratos**

A rede microcirculatória presente no cérebro é, em geral, mais heterogénea do que a existente nos restantes órgãos. Nos ratos, as artérias e veias cerebrais não formam pares (como acontece nos outros órgãos), estando ligadas através de uma complexa rede capilar [52]. O fluxo microcirculatório no cérebro de ratos apresenta variações espaciais nas suas diversas estruturas. Na matéria branca há uma baixa densidade de capilares, enquanto que, nas estruturas do sistema auditivo pode encontrar-se uma grande densidade de capilares [53]. No entanto não é conhecido se a densidade de fluxo varia ao longo das diferentes camadas de uma determinada estrutura. No hipocampo do cérebro de ratos, a distribuição vascular também não é homogénea ao longo das suas várias estruturas nem ao longo do seu eixo dorso-ventral. A região ventral do hipocampo é mais vascularizada do que a região dorsal do mesmo no entanto, esta última tem uma densidade capilar maior [54, 55].



## Capítulo 3

# Fluxometria laser Doppler

*Neste capítulo é introduzida a teoria essencial para a compreensão da técnica de fluxometria laser Doppler (FLD), onde é explicado o efeito Doppler assim como a perspectiva dada pela análise do efeito speckle. São apresentadas as expressões matemáticas para estimação dos parâmetros a ser medidos (perfusão, e concentração e a velocidade dos glóbulos vermelhos) e são referidos os métodos de imagiologia da perfusão laser Doppler (IPLD) e de monitorização pontual da perfusão laser Doppler (MPLD). É também feita a distinção entre detecção *self-mixing* e não *self-mixing* e são analisadas as limitações da técnica de FLD.*

### 3.1 Análise Histórica

Os primeiros trabalhos experimentais na área da FLD tiveram lugar na década de 70 [56, 57]. Diversos dispositivos com diferentes configurações foram utilizadas desde então, e o método original foi desenvolvido e melhorado. No início da década de 1980 foi introduzido o primeiro fluxómetro de MPLD, com capacidade de monitorizar de forma pontual as variações temporais da microcirculação em tempo real, utilizando para isso sondas compostas por fibras ópticas [58]. Mais tarde surgiu a IPLD onde um mapa espacial da perfusão microcirculatória é estimado [58]. Hoje em dia existem sistemas de MPLD e de IPLD disponíveis no mercado.

Como o próprio nome indica, esta técnica utiliza o efeito Doppler para medir o fluxo microcirculatório. O efeito Doppler é conhecido desde meados do século XIX e explica as alterações na frequência de uma onda quando há movimento relativo entre a fonte da

onda e o observador [59]. Como a alteração na frequência depende da velocidade relativa entre a fonte e o observador este efeito pode ser usado para medir velocidades.

O efeito *self-mixing* começa a ser notado logo após a invenção do laser em 1960. Nessa altura foi registada a presença de um *feedback* externo para a cavidade laser que induzia a modulação da intensidade da saída de um laser de gás [60]. O primeiro velocímetro laser Doppler baseado no efeito *self-mixing* foi apresentado por Rudd (1968) [61], onde era usado um laser de He-Ne para medir a velocidade de partículas dispersoras. Equipas de investigadores desenvolveram diferentes aplicações para o efeito *self-mixing*, nomeadamente medição de velocidades [62–64], medição de deslocamentos, distâncias e vibrações [65–70], *etc.* Esta técnica também começou a ser utilizado em óptica biomédica, nomeadamente, na fluxometria laser Doppler [71, 72], no registo da onda de pulso sanguínea [73], no registo da pressão sanguínea contínua [74] e na medição das vibrações da pele [75].

## 3.2 Análise Teórica

A fluxometria laser Doppler é uma técnica que permite monitorizar a microcirculação sanguínea de um modo não-invasivo. Nesta técnica é iluminado um tecido biológico com luz coerente. No tecido a luz pode ser reflectida, transmitida, absorvida ou dispersa. No caso de a luz ser dispersada por partículas em movimento, como é o caso dos glóbulos vermelhos, ocorre um desvio na frequência, de acordo com o efeito Doppler. Os fotões desviados são depois detectados, juntamente com os fotões dispersados por partículas estáticas [18, 76].

### 3.2.1 O efeito Doppler

O efeito Doppler explica a alteração que ocorre na frequência de uma onda quando há movimento relativo entre a fonte e o detector da onda. Quando a fonte e o detector se aproximam as ondas emitidas são comprimidas, caso contrário elas expandem-se [59]. No efeito Doppler a frequência recebida,  $f'$ , está relacionada com a frequência original,  $f$ , e com a velocidade relativa da fonte,  $v_f$ , com a velocidade do observador,  $v_o$ , e com a velocidade das onda no meio,  $v$ , através da expressão:

$$f' = f \frac{v \pm v_o}{v \pm v_f}, \quad (3.1)$$

onde a escolha do uso dos sinais + ou - é feita de acordo com a convenção de que se a fonte e o observador se estão a aproximar a frequência recebida,  $f'$ , será maior do que a frequência original, caso contrário será menor.

### 3.2.2 Desvio Doppler único

Quando luz incidente choca com uma célula em movimento, como um glóbulo vermelho num capilar, a frequência da radiação dispersada pela célula será diferente da radiação incidente, através de um factor  $\omega_d$ . Este factor é o bem conhecido desvio Doppler, descrito na secção anterior. Devido à velocidade baixa dos eritrócitos nos tecidos, o desvio Doppler é bastante pequeno, quando comparado com a frequência angular da luz incidente,  $\omega_i$  [46]:

$$\omega_i \gg \omega_d. \quad (3.2)$$

Os vectores e os ângulos de propagação de um fotão que interage com um glóbulo vermelho em movimento (GVM) estão ilustrados na figura 3.1. A amplitude do desvio Doppler depende do comprimento de onda da luz no tecido,  $\lambda_t$ , do ângulo de dispersão  $\theta$ , e da direcção e da velocidade do dispersor ( $\vec{v}_d$ ). Assumindo que o fotão incidente, representado pelo vector de propagação  $\vec{k}_i$ , é dispersado na direcção  $\vec{k}_d$ , o vector de dispersão resultante é dado pela expressão [18, 77]:

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_d = 2k \sin(\theta/2) = \frac{4\pi}{\lambda_t} \sin(\theta/2) \quad (3.3)$$

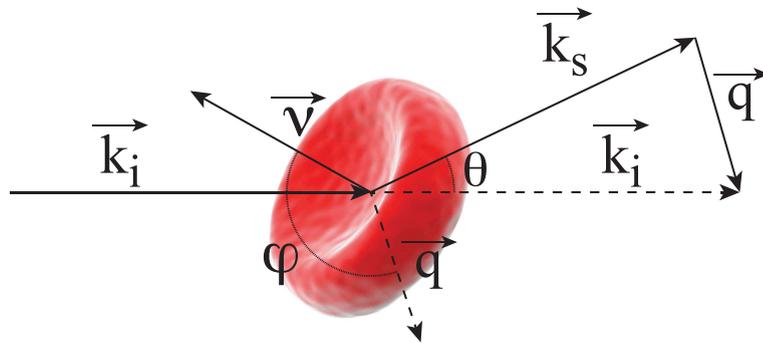


FIGURA 3.1: Representação esquemática dos vectores e dos ângulos de propagação de um fotão antes e depois de dispersado por um glóbulo vermelho em movimento.

A amplitude do desvio Doppler resultante é dada pela expressão:

$$\omega_d = \vec{q} \cdot \vec{v}_d = \frac{4\pi}{\lambda_t} v \sin(\theta/2) \cos(\varphi) \cos(\alpha), \quad (3.4)$$

onde  $\varphi$  é o ângulo entre o vector de dispersão e  $\vec{k}_i$ , e  $\alpha$  é o ângulo entre  $\vec{v}_d$  e o plano de dispersão [77]. A dedução desta equação pode ser encontrada na literatura [58].

O desvio Doppler máximo ( $\omega_{max}$ ) deduzido a partir da expressão anterior, para uma partícula que se desloca no plano da dispersão é dado por:

$$\begin{aligned}\omega_{max} &= \max_{\varphi, \theta} \left( \frac{4\pi v}{\lambda_t} \sin(\theta/2) \cos \varphi \right) \\ &= \frac{4\pi v}{\lambda_t} \\ &= \frac{4\pi v n}{\lambda},\end{aligned}\tag{3.5}$$

onde  $n$  é o índice de refração do tecido. Se considerarmos um glóbulo vermelho a deslocar-se com uma velocidade de 1 mm/s num meio com um índice de refração igual a 1,4; teremos um desvio Doppler máximo de 27705, 22411 e de 21196 Hz para os comprimentos de onda de 635, 785 e 830 nm, respectivamente. Estes valores, quando comparados com as frequências da luz original,  $4,7 \times 10^{14}$ ,  $3,8 \times 10^{14}$  e  $3,6 \times 10^{14}$  Hz são muito pequenos. Esta pequena alteração é impossível de ser detectada com espectroscopia tradicional, por isso, na técnica de FLD é detectado o batimento originado pela interferência das ondas dispersadas com a onda original.

### 3.2.3 Onda de batimento

Examinando o problema do ponto de vista ondulatório, se considerarmos duas ondas sinusoidais,  $y_1$  e  $y_2$ , com a mesma amplitude  $A$  e fase na origem, ambas a propagarem-se na mesma direcção e com o mesmo sentido, com comprimentos de onda ( $\omega_1$  e  $\omega_2$ ) e números de onda ( $k_1$  e  $k_2$ ) próximos, representadas pelas expressões:

$$\begin{aligned}y_1 &= A \sin(k_1 x - \omega_1 t), \\ y_2 &= A \sin(k_2 x - \omega_2 t),\end{aligned}\tag{3.6}$$

pode afirmar-se que  $k_1 \approx k_2 \approx k \approx \frac{k_1+k_2}{2}$  e que  $\omega_1 \approx \omega_2 \approx \omega \approx \frac{\omega_1+\omega_2}{2}$ , pois os comprimentos de onda e as frequências das duas ondas são semelhantes. Se definirmos

as seguintes quantidades:

$$\begin{aligned}\Delta k &= \frac{k_1 - k_2}{2} \\ \Delta\omega &= \frac{\omega_1 - \omega_2}{2},\end{aligned}\tag{3.7}$$

e se usarmos a propriedade:

$$\sin \alpha + \sin \beta = 2 \sin\left(\frac{\alpha + \beta}{2}\right) \cos\left(\frac{\alpha - \beta}{2}\right),\tag{3.8}$$

podemos obter algebricamente a soma das duas ondas:

$$y = y_1 + y_2 = 2A \cos(\Delta kx - \Delta\omega t) \sin(kx - \omega t).\tag{3.9}$$

As diferenças  $\Delta k$  e  $\Delta\omega$ , embora pequenas, não são desprezáveis. A onda de batimento é uma onda sinusoidal progressiva, dada pela função seno, mas cuja amplitude varia no espaço e no tempo de acordo com  $2A \cos(\Delta kx - \Delta\omega t)$ . A velocidade de propagação da onda, ou melhor, a velocidade de propagação da fase é dada por  $v_{fase} = \frac{\omega}{k}$ , e a velocidade de grupo é dada por  $v_{grupo} = \frac{\Delta\omega}{\Delta k}$ , a qual não coincide, em geral, com a velocidade de fase.

Na fluxometria laser Doppler a onda de batimento é obtida a partir da interferência entre luz laser que sofreu dispersão Doppler com a luz original, reflectida ou dispersada em partículas estáticas. A amplitude da onda resultante, oscila com uma frequência muito menor do que a própria onda [59]. Como esta frequência é igual à diferença das frequências das ondas originais, o desvio da frequência produzido pelo efeito Doppler pode ser determinado.

### 3.2.4 Detecção homodínica e heterodínica

Nos tecidos biológicos, os ângulos  $\theta$  e  $\varphi$  (equação 3.4) são considerados aleatórios por três motivos [59]:

- as dispersões antecedentes, sofridas pelo fotão incidente, em partículas estáticas tornam aleatória a direcção do fotão quando este encontra uma partícula em movimento;

- devido à orientação mais ou menos aleatória dos capilares, os GVM vão ter direcções aleatórias; e
- desde o ponto de injeção até ao ponto de detecção, os fotões podem sofrer múltiplos desvios Doppler.

Estes três efeitos em conjunto provocam o espalhamento da distribuição das frequências desviadas, que idealmente deveria ser um único pico, e tornam as medições insensíveis à direcção do fluxo sanguíneo. Para além disso, é preciso ter em conta que os glóbulos vermelhos não têm todos a mesma velocidade, mas sim uma distribuição de velocidades, o que também contribui para a existência de diferentes desvios de frequência [59]. Isto resulta na impossibilidade de se medirem velocidades locais, pois apenas se pode estimar a velocidade média ao longo do volume medido.

A luz que atinge o detector pode ter a frequência original, se foi dispersada por partículas estáticas, ou pode ter uma distribuição de frequências relacionadas com os efeitos referidos. Fotões com a frequência original podem interferir com fotões desviados, mas fotões dispersados com diferentes frequências também podem interferir originando um batimento [59]. Na terminologia laser Doppler, o sinal gerado pelo fotodetector que provém apenas da interferência de luz que sofreu desvio Doppler é conhecido como sinal homodínico, enquanto que o sinal produzido pela interferência de luz desviada com luz não desviada é conhecido como sinal heterodínico [78].

O grau com que as componentes heterodínica e homodínica influenciam a corrente no detector é determinado pela quantidade de fotões desviados: se houver muitos fotões desviados resulta numa grande componente homodínica e vice-versa [77].

### 3.2.5 Efeito *speckle*

O *speckle* é um efeito de interferência aleatório que surgiu com o aparecimento do laser. Quando a luz laser incide numa superfície como papel, metal não polido ou vidro, observa-se um padrão granulado de alto contraste que é difícil de focar [59]. O mesmo efeito ocorre quando a luz é reflectida ou dispersada por um meio turbido. Este padrão de interferência é produzido pela luz reflectida ou dispersada em diferentes regiões de uma superfície rugosa iluminada, e que por isso percorre diferentes distâncias ópticas antes de chegar ao plano da imagem. A intensidade resultante para um dado ponto na imagem é determinada pelas interferências construtivas e destrutivas dos fotões dispersados. Se a

amplitude resultante for zero, porque as ondas se cancelam, é visto um ponto escuro de *speckle*, enquanto que se todas as ondas, que chegam a um ponto da imagem, estiverem em fase é observado um máximo de intensidade [59]. A dinâmica do padrão de *speckle* oscila, quando ocorre desvio Doppler, tanto em intensidade como na posição dos pontos de *speckle*, com uma frequência média relacionada com a velocidade dos dispersores [77]. O estudo da análise estatística das flutuações de *speckle* pode revelar informação acerca do movimento dos dispersores [59].

O efeito *speckle* têm sido utilizado em medições de deslocamento, distorção e tensão, avaliação da rugosidade de superfícies e medição de velocidades. Algumas destas aplicações são na área da engenharia biomédica, inclusivamente em fluxometria laser Doppler [59, 64].

Apesar da interferência *speckle* parecer completamente diferente do método baseado no efeito Doppler, a análise matemática das duas técnicas mostra que de facto estas duas aproximações são idênticas [59, 79]. A aproximação baseada no efeito Doppler envolve a sobreposição de duas ondas com frequências próximas e a detecção da frequência de batimento resultante, enquanto que a aproximação baseada no efeito *speckle* descreve as alterações temporais das flutuações de intensidade da luz dispersa como sendo causadas pelas variações aleatórias da fase de fotões que percorreram distâncias diferentes. De qualquer modo, foi demonstrado que a frequência detectada é a mesma para as duas teorias [59, 79], o que indica que as duas aproximações são diferentes perspectivas de olhar para o mesmo fenómeno.

### 3.2.6 Do campo electromagnético à função de autocorrelação

O vector que representa o campo eléctrico de um fotão incidente pode ser descrito pela expressão:

$$\vec{E}_i = E_{0i} e^{i(\omega_i t - \vec{k}_i \cdot \vec{r})}, \quad (3.10)$$

onde  $\omega_i$  é a frequência da luz original,  $E_{0i}$  é a amplitude da onda incidente e  $\vec{r} = \vec{v}_d t + \vec{r}_0$  descreve a posição actual do fotão [76]. O vector que representa o campo eléctrico do fotão dispersado é dado pela expressão:

$$\vec{E}_d = E_{0d} e^{i(\omega_i t - \vec{k}_i \cdot \vec{r}) + i\vec{k}_d \cdot \vec{v}_d t}, \quad (3.11)$$

onde  $E_{0d}$  é a amplitude do fotão dispersado. Do rearranjo da expressão anterior resulta:

$$\vec{E}_d = E_{0d} e^{i\omega_i t} e^{-i\vec{k}_d \cdot \vec{r}_0} e^{-i\vec{q} \cdot \vec{v}_d t}. \quad (3.12)$$

O campo eléctrico do fotão dispersado é então descrito pela frequência da luz incidente,  $\omega_i$ , uma constante de fase que não varia no tempo,  $\vec{k}_d \cdot \vec{r}_0$ , e um factor de fase que varia com o tempo, e que descreve a frequência angular desviada ( $\omega_d = \vec{q} \cdot \vec{v}_d$ ) [76].

A função de autocorrelação (ACF) da fotocorrente produzida pelo fotodetector numa área de coerência é representada pela expressão [76]:

$$\begin{aligned} ACF &= \langle i(0)i(\tau) \rangle \\ &= 2i_{nd} \langle i_d \rangle + i_{nd}^2 + \langle i_d \rangle^2 + i_{nd} \langle i_d \rangle \left( \langle e^{i\vec{q} \cdot \vec{v} \tau} \rangle \langle e^{-i\vec{q} \cdot \vec{v} \tau} \rangle \right) \\ &\quad + \langle i_d \rangle^2 \left\langle \sum_{m=1, m \neq n}^{N_d} \sum_{n=1}^{N_d} e^{i(\vec{q}_m \cdot \vec{v}_m - \vec{q}_n \cdot \vec{v}_n) \tau} \right\rangle, \end{aligned} \quad (3.13)$$

onde  $i_d$  e  $i_{nd}$  representam as correntes originadas por fotões desviados e não desviados, respectivamente, e  $N_d$  é o número de interações entre os fotões e os dispersores móveis. Os três primeiros termos representam o sinal invariável no tempo, i.e., o sinal DC, e o quarto termo representa o sinal heterodínico, no qual existem contribuições de fotões desviados e não desviados. Finalmente o quinto termo representa a interferência homodínica, apenas constituído pelo sinal gerado por fotões que sofreram desvio Doppler [76]. Para uma concentração moderada de GVM o termo heterodínico domina sobre a componente homodínica.

### 3.2.7 Estimação da Perfusão

O espectro de potência descreve a potência da distribuição de frequências de uma série temporal. De acordo com o teorema de Wiener-Khintchine, a transformada de Fourier da ACF é equivalente ao espectro de potência do sinal [80]. Através da dedução da ACF, e ignorando o termo homodínico, pode ser demonstrado que a concentração de glóbulos vermelhos em movimento (CGVM), e a perfusão *Perf*, definida como a concentração de glóbulos vermelhos (GV) multiplicada pela a velocidade média dos mesmos, podem ser estimadas a partir do espectro de potência Doppler [18, 58, 76, 77]. Tendo em conta que

o momento de ordem  $i$  do espectro de potência é dado pela expressão:

$$M_i = \int_0^{\infty} \omega^i P(\omega) d\omega, \quad (3.14)$$

a CGVM pode ser estimada a partir do momento de ordem zero ( $M_0$ ), e a perfusão a partir do momento de ordem um ( $M_1$ ) [18, 76]:

$$CGVM \propto M_0 = \int_0^{\infty} P(\omega) d\omega, \quad (3.15)$$

$$Perf_{prima} \propto M_1 = \int_0^{\infty} \omega P(\omega) d\omega, \quad (3.16)$$

onde  $P(\omega)$  representa o espectro de potência Doppler, e  $\omega$  representa a frequência angular. Estas expressões só são válidas para baixas concentrações de GV, caso contrário a CGVM e a  $Perf_{prima}$  não variam linearmente com a concentração de GV no tecido [77]. Por outro lado, a relação entre a  $Perf_{prima}$  e a velocidade média dos GV é sempre linear, desde que a concentração de GV se mantenha constante e que a distribuição de frequências da fotocorrente esteja dentro da gama de frequências do sistema [77]. A velocidade média dos GVM pode ser estimada a partir do momento reduzido ( $M_1/M_0$ ) [18].

### 3.3 Métodos de detecção

Na fluxometria laser Doppler pode ser feito o registo da perfusão sanguínea em imagem (IPLD) ou num único ponto de tecido (MPLD), sendo que dois métodos de detecção podem ser utilizados: *self-mixing* e não *self-mixing*. Nos fluxómetros comerciais apenas se emprega detecção não *self-mixing*.

#### 3.3.1 Monitorização pontual da perfusão laser Doppler

Na MPLD não *self-mixing* são utilizadas fibras ópticas que conduzem a luz laser para o tecido e que recolhem a luz dispersada guiando-a até um fotodetector. Tipicamente são utilizados espaçamentos entre fibras na gama dos 250 a 500  $\mu m$  [39]. As sondas podem ser desenhadas para aplicação na superfície do tecido ou colocadas em agulhas para registo da perfusão intra-tecido. No tecido os fotões percorrem caminhos aleatórios desde a fibra emissora até à fibra receptora.

### 3.3.2 Imagiologia da perfusão laser Doppler

Na IPLD não *self-mixing* é registada uma imagem 2D da perfusão sanguínea através de um feixe de luz laser que varre uma determinada área de pele sem que haja contacto físico com o tecido. A luz laser de baixa potência é guiada para o tecido com a ajuda de um espelho móvel [58] e a porção de luz dispersa é guiada para o fotodetector, que geralmente está próximo do laser, através do mesmo espelho [58]. O sistema de espelhos, o laser e o fotodetector são colocados numa câmara de varrimento posicionada entre 0,1 a 1 m da superfície do tecido. Outros métodos utilizam para a detecção câmaras CMOS.

### 3.3.3 Interferometria *self-mixing*

A interferometria é uma técnica de sobreposição de duas ou mais ondas, resultando numa onda nova, com diferentes características, que pode ser utilizada para explorar as diferenças entre as ondas iniciais. Uma vez que esta técnica é um fenómeno transversal a todo o tipo de ondas, ela é aplicável a um largo espectro de campos, incluindo astronomia, metrologia óptica, oceanografia, sismologia e mecânica quântica.

A interferometria *self-mixing* ocorre quando luz laser reflectida ou dispersada por uma superfície difusora se mistura com a luz original na cavidade laser, causando a modulação da potência e da frequência da luz laser [72]. Estas flutuações de potência podem ser detectadas pelo fotodetector de monitorização localizado no lado oposto à saída da luz da cavidade laser. No caso de terem ocorrido alterações na luz reflectida ou dispersada, devido às propriedades físicas do dispersor (*e.g.* a sua velocidade de deslocamento), a medição da sua interferência com luz laser original pode acrescentar valor informativo acerca dessas mesmas propriedades [81].

Devido aos movimentos que ocorrem nos tecidos biológicos, a luz laser dispersada ou reflectida nestes tem amplitude e fases variáveis, *i.e.*, a sua fase e amplitude e variam com o tempo de um modo aleatório. O seu *feedback* na cavidade laser causa a modulação aleatória do limiar do ganho e da frequência *lasing* da luz laser [72, 82], uma vez que provoca alterações no número de transportadores na área activa e no limiar da corrente de excitação [83]. Consequentemente a potência de saída do díodo laser apresentará variações aleatórias que podem ser detectadas por um fotodíodo que se encontra na parte de trás da cavidade laser [72]. Deste modo, a luz que regressa à cavidade laser tem um papel activo no processo de geração laser e no efeito de inversão [83]. A presença de

*feedback* óptico externo afecta não só o limiar do laser mas também a sua distribuição espectral [84].

Equipamentos baseados no efeito *self-mixing* podem ser aplicados para registar diferentes parâmetros cardiovasculares de modo não-invasivo, tais como a forma da onda de pulso, o atraso da onda de pulso e o fluxo sanguíneo [83].

### 3.3.3.1 Análise Teórica

O modelo de três espelhos de *Fabry-Perot* é o método mais utilizado para explicar a origem da interferência *self-mixing* [85]. Neste modelo as flutuações da intensidade da luz são explicada através das alterações de potência dentro da cavidade do laser que ocorrem devido ao *feedback* externo [81]. O modelo de *Fabry-Perot* está representado na figura 3.2.

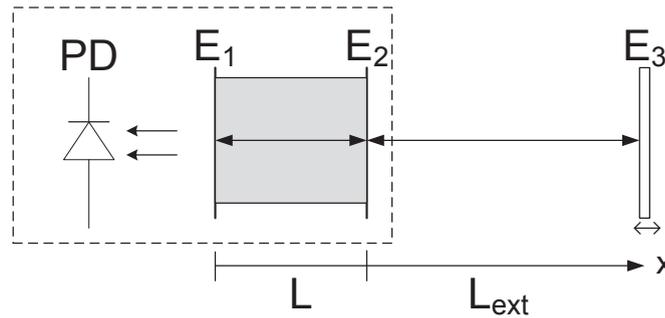


FIGURA 3.2: Modelo de três espelhos que ilustra o efeito *self-mixing* num diodo laser semiconductor onde PD representa o fotodiodo, e E1, E2 e E3 representam os espelhos.

Para a análise matemática do efeito *self-mixing*, é considerado que o *feedback* óptico é de fraca potência e que é utilizado um diodo laser semiconductor. Os espelhos  $E_1$  e  $E_2$  formam a cavidade laser, que tem um comprimento  $L$  e um índice de refração efectivo de  $\mu_e$ . Os espelhos estão localizados no eixo óptico dos  $xx$ , sendo que  $E_1$  está em  $x = 0$ . O alvo externo,  $E_3$ , está localizado a uma distância  $L_{ext}$  de  $E_2$ , sendo que  $L_{ext} \gg L$  [81]. PD representa o fotodiodo de monitorização do diodo laser.

Se substituirmos o espelho  $E_2$  por um espelho efectivo, que combina  $E_2$ ,  $E_3$  e a cavidade externa, a amplitude do coeficiente de reflexão do espelho efectivo,  $r_2$ , resultante é de [86]:

$$r_2(f) = r_{2s} + (1 - |r_{2s}|^2) r_{2ext} e^{-j2\pi f \tau_{ext}}, \quad (3.17)$$

onde  $r_{2s}$  e  $r_{2ext}$  são as amplitudes do coeficiente de reflexão do espelho  $E_2$  e do alvo externo  $E_3$ , respectivamente.  $\tau_{ext}=2L_{ext}/c$  corresponde ao tempo de ida e volta da luz na cavidade externa, que se assume ser o ar,  $f$  é a frequência e  $c$  representa a velocidade da luz [82, 87]. Reflexões múltiplas na cavidade externa são ignoradas, uma vez que  $|r_{2ext}| \ll |r_{2s}|$  [87].

Para que o laser funcione correctamente, os critérios de fase e de amplitude, que obrigam a que a fase da onda seja um múltiplo inteiro de  $2\pi$  numa viagem de ida e volta na cavidade laser, tem de ser satisfeitos. Se utilizarmos a equação 3.17, tendo em conta este critério, as flutuações de potência  $\Delta P$  na cavidade laser podem ser descritas pela expressão:

$$\Delta P \approx -\frac{\kappa_{ext}}{L} \cos\left(\frac{4\pi f v t}{c} + 2\pi f \sigma_{ext}\right), \quad (3.18)$$

onde  $\kappa_{ext}$  é uma constante de *feedback* proporcional ao coeficiente de reflexão do alvo ( $\kappa_{ext} = (1 - |r_{2s}|^2)r_{2ext}/r_{2s}$ ) que varia entre zero e um [81, 88].

Quando o alvo se move, a luz reflectida ou dispersada sofre um desvio na frequência proporcional à sua velocidade. De acordo com o efeito Doppler a frequência desviada,  $f'_{sm}$ , é dada pela expressão:

$$f'_{sm} = \frac{2v}{\lambda} \cos \varphi, \quad (3.19)$$

onde  $v$  é a velocidade do alvo em movimento,  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz laser e  $\varphi$  é o ângulo entre o eixo óptico e  $\vec{v}$  [81]. Se a velocidade dos dispersores for paralela ao eixo óptico, a equação fica reduzida a  $f' = 2v/\lambda$ . Resolvendo em ordem à velocidade,  $v = f'\lambda/2$ , e substituindo a expressão resultante na equação 3.18 pode ver-se que as flutuações na potência do díodo laser estão relacionadas com a frequência Doppler desviada [81]. Isto demonstra que é possível determinar-se a velocidade do alvo através da medição das flutuações de potência.

A modulação da intensidade do efeito *self-mixing* tem um comportamento interessante em função da corrente de operação do díodo laser, que é descrita pela expressão [81, 89]:

$$\Delta P \approx \left[ \frac{C/C_{th}}{C/C_{th} - 1} \right] R_t \eta_{eff}, \quad (3.20)$$

onde  $C$  representa a corrente de operação do díodo laser e  $C_{th}$  corresponde à corrente no limiar.  $R_t$  é a reflectividade do alvo e  $\eta_{eff}$  representa a eficiência do acoplamento da luz que regressa à cavidade laser.

### 3.3.3.2 Vantagens da interferometria *self-mixing*

O recurso a díodos laser para detecção *self-mixing* tem vantagens quando comparado com outros sistemas de interferometria convencionais, uma vez que [70, 72, 81, 83, 84]:

- utiliza um esquema de medição óptico simples, pois não necessita de divisores de feixes ou de fotodetectores externos, sendo apenas preciso um díodo laser com fibras ópticas ou lentes, o que torna o sistema compacto;
- não requer filtros espaciais, necessários na interferometria convencional, devido à abertura da face frontal do laser e à pequena área de detecção do fotodíodo;
- é de fácil alinhamento, visto que o sistema tem apenas um eixo óptico;
- o sistema é constituído por componentes baratas (díodos laser semicondutores);
- não são necessárias componentes adicionais;
- não é necessário o esquema heterodínico, porque a mistura heterodínica ocorre dentro da cavidade do laser;
- tem a mesma sensibilidade à fase que a interferometria convencional;
- não depende do tamanho de coerência da fonte;
- permite a discriminação da direcção do alvo;
- pode ser atingida uma precisão que corresponde a metade do comprimento de onda da fonte; e
- tem dimensões reduzidas.

## 3.4 Limitações da FLD

Devido às heterogeneidades da anatomia da pele e ao pequeno volume de tecido monitorizado, a MPLD é muito sensível às variações espaciais da perfusão sanguínea e às propriedades ópticas do tecido [58], por isso, os resultados obtidos num único local não são representativos de todo o tecido [39, 90]. Para além disso, a microcirculação é muito variável no tempo e é afectada por factores que não podem ser totalmente controlados simultaneamente. São necessários procedimentos operacionais e métodos de análise

para melhorar a reprodutibilidade das medições na monitorização pontual da perfusão sanguínea [29].

Na MPLD não se consegue discernir a origem das flutuações da intensidade da luz laser. Flutuações na intensidade da luz podem não ser só causadas por células sanguíneas em movimento, mas também por movimentos da sonda, ou devido a contracções musculares (artefactos de movimento). Estas perturbações podem originar um sinal com uma magnitude maior do que a própria perfusão sanguínea [29]. Caso elas não possam ser evitadas, o sinal deverá ter uma grande resolução temporal para que sejam detectados picos de movimento [58]. Os movimentos das fibras ópticas podem ser eliminados com a colocação do díodo laser e do fotodetector na própria sonda, eliminando assim, a necessidade de fibras ópticas [39].

Na fluxometria laser Doppler há muitas dificuldades na estimação do volume e profundidade amostrada nas medições, não existindo discriminação entre perfusão nutricional e perfusão total [39, 90]. A distância entre as fibras de iluminação e detectora assim como comprimento de onda utilizado influenciam o volume de tecido medido, mas infelizmente o efeito destas variáveis nas medições *in vivo* não é completamente conhecido [29].

Actualmente a técnica de FLD não dá medições absolutas da perfusão sanguínea (ou seja,  $ml/min/m^3$ ). É utilizada uma unidade arbitrária chamada unidade de perfusão (UP). Isto deve-se ao escasso conhecimento de variáveis como o volume exacto de tecido monitorizado, a direcção do fluxo sanguíneo, e a quantidade de vasos e o seu tamanho no volume medido [29]. No meio clínico este é um factor limitador e a principal razão pela qual os sistemas de FLD não são utilizados diariamente nos serviços de saúde [58].

Movimentos térmicos de dispersores que normalmente são considerados estáticos provocam dispersão Doppler. Este é um dos factores que contribui para o aparecimento de perfusão durante a oclusão arterial, conhecido como zero biológico. Outros efeitos não térmicos também podem contribuir para o zero biológico, nomeadamente os movimentos das paredes dos vasos, a não interrupção total da perfusão, ou o ruído eléctrico do sistema [58]. O zero biológico pode ser uma grande parte do sinal se na medição da FLD houver baixas perfusões ou se a temperatura aumentar [58].

Aparelhos comerciais de FLD utilizam diferentes métodos de processamento de sinal. Cada fabricante implementa o seu próprio algoritmo, e a sua própria técnica de calibração. O sinal final de fluxo está relacionado com o fluxo mas foi demonstrado que cada

aparelho dá valores de fluxo sanguíneo distintos para as mesmas condições [29].

Outra limitação da técnica de FLD provém da natureza da própria fórmula da perfusão que depende de dois parâmetros: da velocidade dos glóbulos vermelhos e da concentração dos mesmos. Se por um lado houver uma rede capilar rarefeita, com uma elevada velocidade dos glóbulos vermelhos, vai ser medido um sinal de perfusão normal ou elevado. Se por outro lado, houver capilares com diâmetros grandes, a concentração de glóbulos vermelhos será elevada, mas a sua velocidade será baixa, donde se obterá um fluxo sanguíneo normal. Apesar de nos dois casos a estrutura microcirculatória estar comprometida, esse efeito não será visível nas medições basais da perfusão sanguínea.



## Capítulo 4

# Método de Monte Carlo

*Neste capítulo é descrito, de forma sucinta, o software usado nas simulações Monte Carlo, gentilmente cedido pelo Prof. Doutor Frits de Mul. É feita uma introdução à teoria do transporte da luz onde são referidas as propriedades ópticas, e onde é analisada a função de fase que melhor representa a distribuição angular da luz dispersada nos tecidos biológicos. Posteriormente é feita a descrição geral das simulações e das suas diferentes etapas (lançamento dos fótons, mecanismo de propagação dos fótons, absorção e dispersão dos fótons e terminação). São apresentados os métodos utilizados para a implementação dos perfis de velocidade e para construção do espectro de frequências.*

### 4.1 Introdução

O método de Monte Carlo, proposto pela primeira vez por Metropolis e Ulam [91], é uma técnica estatística utilizada em simulações estocásticas com aplicações importantes em áreas tão diversas como a física, a matemática e a biologia. Este método é utilizado como forma de obter aproximações numéricas de funções complexas, sendo que envolve a geração de observações com uma determinada distribuição de probabilidades, e o uso da amostra obtida para aproximar a função de interesse [92].

A propagação de fótons num meio turbido, como a pele, é um processo complexo onde ocorrem processos de absorção e de dispersão, criando relações não lineares entre a intensidade do sinal detectado e as propriedades ópticas do tecido [77]. É muito difícil produzir modelos analíticos tratáveis do transporte da luz nesses meios, necessários para,

por exemplo, extrair os valores das suas propriedades ópticas. Simulações Monte Carlo do transporte da luz são uma ferramenta útil para resolver este tipo de problemas.

No método Monte Carlo o transporte da luz nos tecidos é descrito sob a forma de fotões que viajam ao longo de uma amostra. Na amostra, os fotões podem ser reflectidos ou refractados quando encontram uma fronteira, dispersados pelas partículas presentes no meio (o que resulta numa mudança de direcção) ou podem ser gradualmente absorvidos. O fenómeno de dispersão é determinado por uma função de dispersão adequada, enquanto que os fenómenos de reflexão ou refacção são determinados pela bem conhecida relação de Fresnel. Entre estes eventos, o fotão propaga-se no meio, e o caminho óptico livre médio na amostra vai determinar o comprimento do caminho a percorrer pelo fotão [92, 93]. O caminho a percorrer, os ângulos de desvio, a escolha entre dispersão e absorção, e entre reflexão e refacção, são determinadas por decisões baseadas em números aleatórios [92, 93]. São também utilizados mecanismos capazes de destruir fotões irrelevantes que, por exemplo, tenham viajado longe de mais [93]. Para além disso, os fotões podem ser dispersados por partículas em movimento, que vão causar o desvio da frequência dos fotões (efeito Doppler) [92, 93].

As simulações numéricas baseadas no método Monte Carlo revelam-se bastante atractivas e úteis para aplicação em fluxometria laser Doppler devido à facilidade de implementação e à flexibilidade de modelação de tecidos complexos [28, 31]. Com este método é possível simular as trajectórias percorridas pelos fotões no tecido biológico desde que se conheçam os coeficientes de dispersão e de absorção e a função de fase do meio. Estas trajectórias são obtidas a partir da aplicação de números aleatórios a funções de probabilidade, que descrevem a dispersão e a absorção nos tecidos. A média de um grande número de trajectórias simuladas resulta em dados estatisticamente confiáveis. Comparações entre o método de Monte Carlo e as medições efectuadas em fantoma mostraram que esta técnica prevê com fiabilidade a interacção de fotões com meios túrbidos [28, 31, 92, 94].

## 4.2 Teoria do transporte da luz - tecidos biológicos

Existe uma grande diversidade intra e inter-individual na quantidade de luz reflectida nos tecidos biológicos. Estas variações são devidas principalmente às migrações complexas dos fotões em meios túrbidos, governadas pelas propriedades ópticas dos tecidos tais como os coeficientes de absorção ( $\mu_a$ ) e de dispersão ( $\mu_s$ ) e o factor de anisotropia ( $g$ ) [77].

Os parâmetros ópticos são obtidos pela conversão de medições de quantidades observáveis, como por exemplo as reflexões, em parâmetros que caracterizam a propagação da luz nos tecidos. Este processo de conversão é baseado na teoria do transporte da luz nos tecidos, que actualmente é a teoria mais aprofundada para a descrição da transferência da luz laser nos tecidos biológicos [95]. Esta teoria é preferível na óptica dos tecidos biológicos em vez das aproximações analíticas que utilizam as equações de Maxwell, devido à não homogeneidade destes tecidos. De acordo com a referida teoria, a radiância  $L(\vec{r}, \hat{s})(W \cdot m^{-2} \cdot sr^{-1})$  da luz, na posição  $\vec{r}$  e a viajar na direcção do vector unitário  $\hat{s}$ , sofre um decréscimo devido a fenómenos de absorção e dispersão, mas é amplificada pela luz que é dispersada da direcção  $\hat{s}'$  para a direcção  $\hat{s}$ . A expressão que descreve as interacções da luz com os tecidos biológicos conhecida como a equação de transporte radiativa, escreve-se da seguinte forma:

$$\hat{s} \cdot \nabla L(\vec{r}, \hat{s}) = -\mu_t L(\vec{r}, \hat{s}) + \mu_s \int_{4\pi} p(\hat{s}, \hat{s}') L(\vec{r}, \hat{s}') dw' \quad (4.1)$$

onde  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$  é o coeficiente de atenuação,  $dw'$  é o ângulo sólido diferencial na direcção  $\hat{s}'$ , e  $p(\hat{s}, \hat{s}')$  é a função de fase [95].

### 4.2.1 Coeficiente de absorção

Os tecidos biológicos contêm uma variedade de moléculas que absorvem a luz dissipando a energia no meio sob a forma de energia térmica ou reemitindo-a sob a forma de radiação (cromóforos) [77]. Estas moléculas têm características ópticas que dependem do comprimento de onda da luz.

A absorção da luz ocorre quando a energia do fotão  $E$  coincide com a energia mínima entre dois níveis de energia possíveis na molécula. Quando o nível de energia da molécula cai para um nível inferior, a energia absorvida é transferida sobre a forma de calor e/ou reemitida (fluorescência e fosforescência). O fotão reemitido terá menos energia, e consequentemente maior comprimento de onda, do que o fotão absorvido [77].

A irradiância do feixe luminoso à entrada e à saída de um meio é dada pela lei de Beer-Lambert [77]:

$$I = I_0 e^{-\mu_a d}, \quad (4.2)$$

onde  $I_0$  representa a irradiância do feixe incidente e  $d$  a distância média percorrida pelo

fotão. O coeficiente de absorção  $\mu_a$  está relacionado com densidade de moléculas  $\rho_a$  (n.º de moléculas/volume), através da expressão [77]:

$$\mu_a = \rho_a \sigma_a, \quad (4.3)$$

onde  $\sigma_a$  é a secção eficaz de absorção que depende tanto do comprimento de onda como das dimensões da molécula. A secção eficaz de absorção representa a área na qual o feixe luminoso depositaria uma potência igual à absorvida [77]:

$$\sigma_a = \frac{P_{abs}}{I_0}, \quad (4.4)$$

onde  $P_{abs}$  representa a energia absorvida por unidade de tempo, ou potência absorvida.

O recíproco do coeficiente de absorção define o percurso livre médio:

$$L_A = \frac{1}{\mu_a}, \quad (4.5)$$

que representa a distância média que um fotão percorre no meio antes de ser absorvido [77]. A probabilidade de transmissão,  $T$ , ou de sobrevivência, do fotão após percorrer o caminho livre médio  $L_A$  é dado por:

$$T = \exp(-\mu_a L_A). \quad (4.6)$$

Para um meio não dispersor, com uma espessura e secção eficaz de absorção conhecidas, a concentração de partículas absorventes pode ser estimada através da expressão [77]:

$$\rho_a = -\frac{1}{\sigma_a d} \log\left(\frac{I}{I_0}\right). \quad (4.7)$$

Para um meio dispersor, como a pele, esta última equação não pode ser aplicada, uma vez que para esta situação o caminho percorrido pelo fotão é descrito por uma distribuição numérica e não por um único número. Para este meio, a atenuação da luz é descrita por [77]:

$$I = I_0 \sum_i N_i e^{-\mu_a d_i}, \quad (4.8)$$

onde  $N_i$  é a quantidade relativa de luz injectada que viajou uma distância  $d_i$  no caso de

$\mu_a=0$ . A distribuição  $N_i$ , governada pelas propriedades dispersoras do meio, é desconhecida e por isso a concentração de absorventes não pode ser obtida a partir da equação 4.7 [77].

#### 4.2.1.1 Coeficiente de absorção da pele

Os cromóforos da pele mais importantes absorvem a luz na zona do ultra-violeta (que compreende o intervalo de 1 a 400 nm), na zona do visível (que compreende o intervalo de 400 a 700 nm) e infra-vermelho próximo (que compreende o intervalo de 700 a 3000 nm). Eles são as proteínas e o ADN, a melanina (que absorve em toda a região do visível), a hemoglobina oxigenada e desoxigenada (que absorvem fortemente comprimentos de onda na região do azul/verde), e a água (que absorve predominantemente no infra-vermelho) [40, 41, 96].

A camada mais superficial da pele, a epiderme, não contém sangue, mas é bastante absorvente devido à presença da melanina. O coeficiente de absorção da melanina é dado pela expressão [97]:

$$\mu_a^{mel}(\lambda) = 1.7 \times \lambda^{-3.48} \times 10^{12}, \quad (4.9)$$

com o comprimento de onda,  $\lambda$ , em nm. Como já foi referido, a melanina absorve luz na gama do visível, sendo que o seu coeficiente de absorção diminui com o aumento do comprimento de onda [97]. Para além da melanina, a epiderme e as outras camadas da pele tem um coeficiente de absorção genérico causado por outros constituintes da pele.

O espectro de absorção do sangue desoxigenado ( $Hb$ ) e oxigenado ( $HbO_2$ ), estão apresentados na figura 4.1. O comprimento de onda de 800 nm é conhecido como o ponto isobéstico uma vez que nessa zona do espectro o coeficiente de absorção do sangue é independente do grau de saturação da hemoglobina [31].

No que diz respeito à água, o seu coeficiente de absorção, apresentado na figura 4.2, é muito baixo nas gamas espectrais que correspondem à luz visível e no infra-vermelho próximo [96].

A janela terapêutica ou de diagnóstico situa-se entre os 600 e os 1300 nm [98], pois para esta gama a absorção dos vários constituintes da pele, como a hemoglobina e a água, é mínima (ver figuras 4.1 e 4.2).

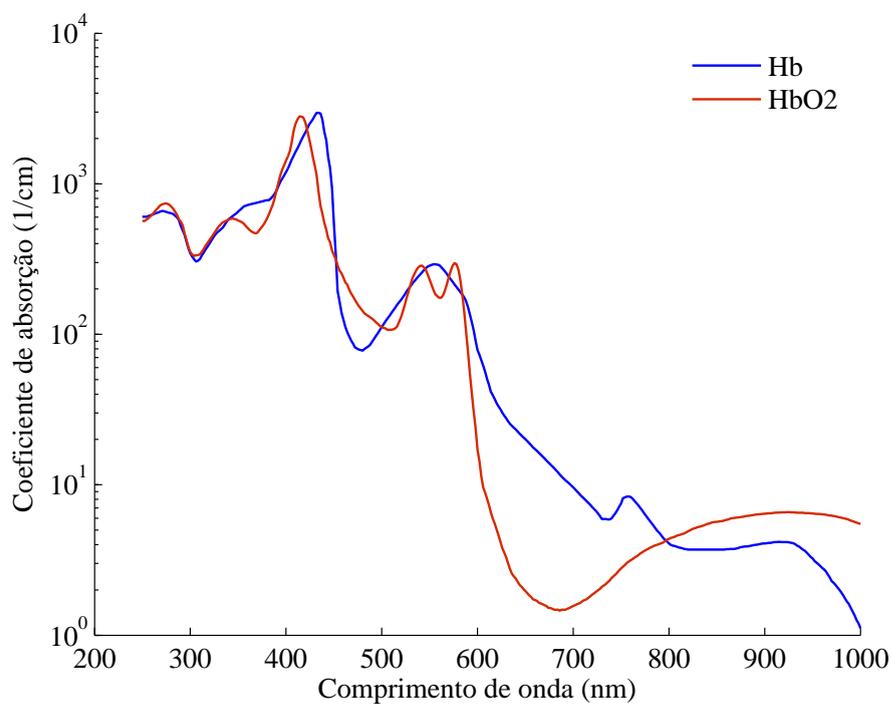


FIGURA 4.1: Espectro de absorção da hemoglobina desoxigenada (curva azul) e oxigenada (curva vermelha).

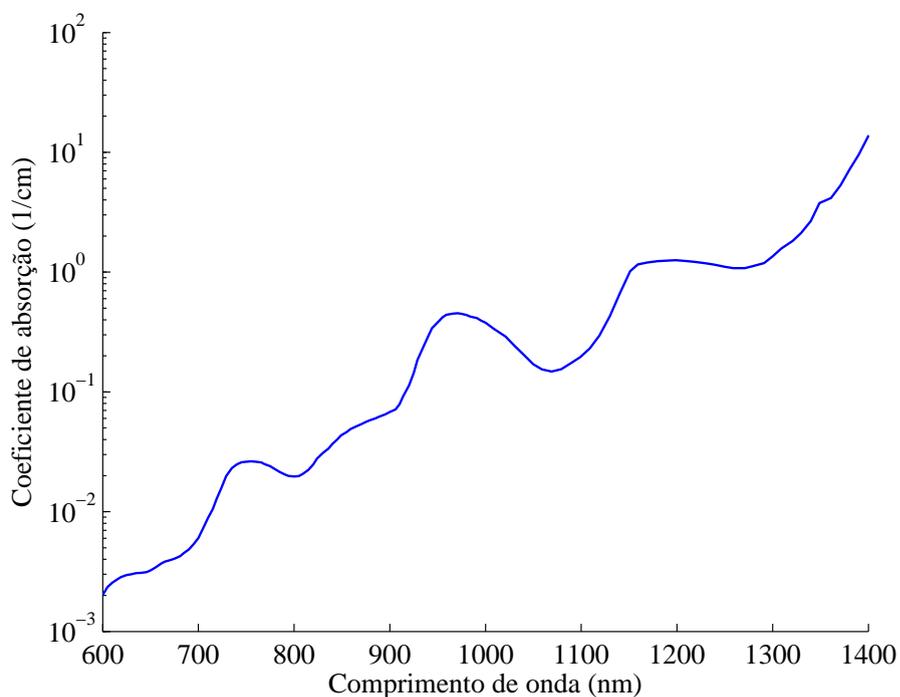


FIGURA 4.2: Espectro de absorção da água para os comprimentos de onda no intervalo compreendido entre os 600 e os 1400 nm.

### 4.2.2 Dispersão

Um meio onde existem heterogeneidades no índice de refração, devido à presença de pequenas partículas discretas ou fronteiras macroscópicas contínuas, vai dispersar a luz. No fenómeno de dispersão a onda incidente é absorvida, e é posteriormente emitida na totalidade ou parcialmente. As ondas electromagnéticas causam oscilação nas cargas eléctricas presentes no meio dispersor, *i.e.* provocam oscilações no momento dipolar. Estas oscilações vão re-irradiar as ondas electromagnéticas em todas as direcções, causando dispersão [77]. No entanto, num meio óptico homogéneo onde os átomos ou as moléculas com índice refractivo idêntico estão ordenados, a dispersão ocorrerá numa única direcção uma vez que para as outras direcções, as ondas se cancelam devido a interferências destrutivas [77].

#### 4.2.2.1 Coeficiente de dispersão

Tal como sucede com a absorção, a dispersão pode ser quantificada pela secção eficaz [98]:

$$\sigma_s = \frac{P_{sct}}{I_0}, \quad (4.10)$$

onde  $I_0$  é a irradiância do feixe incidente e  $P_{sct}$  é a energia dispersada por unidade de tempo.

Um meio com uma distribuição uniforme de dispersores idênticos pode ser caracterizado pelo coeficiente de dispersão [77, 98]:

$$\mu_s = \rho_s \sigma_s, \quad (4.11)$$

onde  $\rho_s$  é a concentração de dispersores (n.º de dispersores/volume). O coeficiente de dispersão representa o número de eventos de dispersão por unidade de comprimento.

O recíproco do coeficiente de dispersão representa o percurso livre médio [77, 98]:

$$L_s = \frac{1}{\mu_s}, \quad (4.12)$$

que corresponde à distância média que um fóton percorre no meio antes de ser dispersado.

A dispersão da luz em meios túrbidos não absorventes contendo numerosos dispersores é descrita por [77]:

$$I = I_0 e^{-\mu_s d}, \quad (4.13)$$

onde  $I_0$  representa a intensidade de luz injectada e  $d$  representa o caminho percorrido pelo fóton.

A partir dos coeficientes de absorção e dispersão pode ser obtido o albedo, medida relativa da quantidade de luz reflectida:

$$albedo = \frac{\mu_s}{\mu_s + \mu_a}. \quad (4.14)$$

Os efeitos da dispersão dependem da amplitude das heterogeneidades do índice de refração no meio e do comprimento de onda da luz. A dispersão pode ser dividida em três regiões, explicadas a seguir, onde se aplicam diferentes teorias [77]. O limite de dispersão geométrica aplica-se quando os dispersores têm dimensões muito maiores que o comprimento de onda da luz; a dispersão de Mie aplica-se quando os dispersores têm tamanhos próximos ao comprimento de onda e a dispersão de Rayleigh aplica-se quando os dispersores são mais pequenos que o comprimento de onda da luz incidente.

- Limite de dispersão geométrica:

Neste caso o comprimento de onda da radiação incidente é muito inferior ao tamanho dos dispersores, predominando portanto as leis da reflexão e transmissão [98]. Fronteiras macroscópicas como a interface tecido - ar estão abrangidas neste limite. A direcção da luz dispersada é descrita pela lei de Snell:

$$n_i \sin(\theta_i) = n_t \sin(\theta_t), \quad (4.15)$$

onde  $n_i$  e  $n_t$  representam os índices de refração dos dois meios,  $\theta_i$  representa o ângulo da luz incidente e  $\theta_t$  o ângulo da luz refractada.

A quantidade relativa de luz reflectida e transmitida é descrita pela equação de Fresnel. Para a luz polarizada aleatoriamente, a equação de Fresnel pode ser expandida para:

$$R = \frac{1}{2} \left( \frac{\sin^2(\theta_i - \theta_t)}{\sin^2(\theta_i + \theta_t)} + \frac{\tan^2(\theta_i - \theta_t)}{\tan^2(\theta_i + \theta_t)} \right) \quad (4.16a)$$

$$T = 1 - R, \quad (4.16b)$$

onde  $R$  representa a reflectância e  $T$  a transmitância [77].

Nas dispersões de Mie e de Rayleigh a interferência destrutiva que cancela as ondas dispersadas é mais fraca devido ao tamanho reduzido das heterogeneidades presentes nos tecidos. Deste modo, estes tipos de dispersão não podem ser representados por uma única direcção como acontece na dispersão geométrica. Portanto a dispersão é descrita por uma distribuição, chamada função de fase onde é estabelecida a relação entre o ângulo de dispersão  $\theta$  e a intensidade da luz dispersada [77]. Estes dois tipos de dispersão, que são derivados das equações de Maxwell, podem prever a função de fase para uma esfera, se o tamanho desta, o comprimento de onda do fóton e os índices de refração do dispersor e do meio circundante forem conhecidos [77].

- Dispersão de Mie:

A dispersão de Mie explica a dispersão luminosa por objectos esféricos e é aplicável quando o tamanho dos dispersores é comparável ao tamanho do comprimento de onda da radiação incidente. No entanto, na prática este limite é aplicado quando a aproximação de Rayleigh e o limite geométrico falham.

A teoria de Mie apresenta uma solução exacta da equação de Maxwell para objectos esféricos. Neste caso, em que os dispersores e o comprimento de onda são da mesma ordem de grandeza, a oscilação do momento dipolar irá reemitir a luz com uma diferença de fase que não pode ser negligenciada [99]. Com o uso da teoria de Mie, é possível calcular como a interferência destrutiva e construtiva, gerada pela luz reemitida, depende do ângulo de dispersão. Nos tecidos humanos objectos como a mitocôndria, glóbulos vermelhos, núcleos e fibras de colagénio obedecem ao regime de Mie [77, 98]. Neste regime a secção eficaz do dispersor tem uma dependência do comprimento de onda que é afectada pelas propriedades do dispersor e do meio circundante [77].

- Dispersão de Rayleigh ou dipolar:

Esta aproximação é considerada menos complicada do que a dispersão de Mie, mas contém simplificações que apenas a tornam válida para dispersores muito mais pequenos que o comprimento de onda da radiação incidente. Para estes dispersores, todos os momentos de oscilação dipolar reemitem luz com a mesma fase virtual, e portanto a interferência destrutiva é insignificante. Este tipo de dispersores reemitem luz em todas as direcções de um modo quase uniforme, conhecido como dispersão isotrópica [98]. Para uma partícula esférica de raio  $a$ , a distribuição angular da radiação dispersada é dada pela expressão:

$$\frac{d\sigma_s}{d\Omega} = 8\pi^4 n_m^4 \left( \frac{n_s^2 - n_m^2}{n_s^2 + 2n_m^2} \right) \frac{a^6}{\lambda^4} (1 + \cos^2 \theta), \quad (4.17)$$

onde  $\theta$  é o ângulo entre a direcção da onda incidente e a direcção da onda dispersada,  $n_m$  e  $n_s$  são os índices de refacção do meio e do dispersor, respectivamente, e  $\Omega$  é o ângulo sólido [98, 99]. Nos tecidos humanos as membranas celulares e as fibrilas de colagénio obedecem à dispersão de Rayleigh [77].

Neste regime a secção eficaz do dispersor depende do comprimento de onda pois  $\sigma_s \propto \lambda^{-4}$  [77].

A dispersão pode ocorrer se a energia do fotão incidente coincide com os níveis de energia do dispersor (átomos ou moléculas). Este tipo de dispersão, assemelha-se ao fenómeno de absorção explicado anteriormente, com a diferença de que o nível de energia dos átomos ou moléculas cai directamente para o estado inicial. A energia do fotão dispersado é conservada, por isso, o fotão reemitido terá a mesma frequência que o fotão incidente [77, 98]. Fotões com níveis de energia que não coincidem com nenhum nível de energia de dispersão da partícula dispersora podem ser alvo de dispersão. Nessas situações, as transições de energia ocorrem entre estados intermediários, onde a queda também ocorre para o estado inicial, ou seja, o fotão dispersado terá a mesma frequência que o fotão incidente. Este tipo de dispersão é conhecida como dispersão elástica da luz [77, 98]. A dispersão inelástica ocorre quando há ganho ou perda de energia do fotão incidente, resultando num desvio de frequência. No processo de dispersão *quasi*-elástico ocorrem as duas situações, ocorre a perda ou ganho de energia, mas a mecânica quântica que explica o fenómeno é semelhante à da dispersão elástica. Em FLD, ocorre este último

caso, sendo que a alteração de energia do fóton incidente está relacionada com o desvio Doppler provocado pelo movimento das partículas dispersoras.

#### 4.2.2.2 Factor de anisotropia $g$

A função de fase  $p(\cos \theta)$  é caracterizada pelo factor de anisotropia ( $g$ ), que representa o co-seno médio do ângulo de dispersão, e é dado pela expressão [77]:

$$g = \langle \cos \theta \rangle = \int_{-1}^1 p(\cos \theta) \cos \theta d(\cos \theta). \quad (4.18)$$

A anisotropia varia entre -1 e 1, onde  $g = 0$  indica dispersão isotrópica e valores próximos da unidade indicam uma dispersão para a frente. O factor de anisotropia para os tecidos biológicos varia entre 0,3 e 0,98; sendo que na maioria das vezes  $g \approx 0,9$  na gama do visível [100]. No limite de Rayleigh  $g=0$ , e na aproximação de Mie  $g \in ]0, 1]$ , sendo que neste último o factor de anisotropia depende do comprimento de onda e das propriedades ópticas do dispersor e do meio circundante [77].

O factor de anisotropia pode ser combinado com o coeficiente de dispersão, resultando no coeficiente de dispersão reduzido definido pela expressão:

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g). \quad (4.19)$$

#### 4.2.2.3 Função de fase

A função de fase descreve a distribuição angular da luz dispersada, e é característica de cada partícula, pois depende do tamanho e forma desta, do índice de refração, assim como do comprimento de onda e do ângulo da luz incidente [101]. No entanto para simplificar, considera-se que uma determinada função de fase descreve as características mais importantes do processo de dispersão de partículas semelhantes [77, 101].

A função de fase de Henyey-Greenstein, descrita pela função:

$$p_{hg}(\cos \theta) = \frac{1}{2} \frac{1 - g_{hg}^2}{(1 + g_{hg}^2 - 2g_{hg} \cos \theta)^{3/2}}, \quad (4.20)$$

tem sido muito utilizada para descrever a distribuição angular da luz dispersada em tecidos biológicos. Esta função tem características que a tornam atractiva, nomeadamente

o facto de o factor de anisotropia,  $g_{hg}$ , e o inverso da função de distribuição cumulativa de  $p_{hg}$  poderem ser determinados analiticamente, o que facilita a sua aplicação nas simulações Monte Carlo [77].

Uma função de fase muito utilizada na literatura para a modelação de tecido estático é a função de fase modificada de Henyey-Greenstein, dada pela expressão:

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \left[ \beta + (1 - \beta) \frac{1 - g_{hg}^2}{(1 + g_{hg}^2 - 2g_{hg} \cos \theta)^{3/2}} \right], \quad (4.21)$$

onde  $\beta$  descreve a componente isotrópica da função de fase e  $\theta$  representa o ângulo de deflexão [102].

A função de fase de Henyey-Greenstein é imprecisa quando se trata de modelar a dispersão dos glóbulos vermelhos [103], tendo sido sugerido e demonstrado, que a função de fase kernel paramétrica de Gegenbauer ( $p_{gk}$ ) é um modelo que melhor descreve as propriedades de dispersão destas células [103, 104]. A referida função é dada pela expressão:

$$p_{gk}(\theta) = \frac{\alpha_{gk} g_{gk} (1 - g_{gk}^2)^{2\alpha_{gk}}}{\pi((1 + g_{gk})^{2\alpha_{gk}} - (1 - g_{gk})^{2\alpha_{gk}} (1 + g_{gk}^2 - 2g_{gk} \cos(\theta))^{\alpha_{gk}+1}}, \quad (4.22)$$

onde  $\alpha_{gk}$  e  $g_{gk}$  são os únicos parâmetros que afectam esta função [77].

### 4.3 Descrição geral das simulações

Diversas técnicas, sumariadas no fluxograma apresentado na figura 4.3, foram aplicadas no estudo da interacção entre a luz e os tecidos biológicos através método Monte Carlo.

Após o lançamento, o fóton percorre uma determinada distância, fixa ou variável, durante a qual pode sofrer absorção ou dispersão (com ou sem alterações na frequência), reflexão ou refacção interna, transmissão ou reflexão para fora do meio ou não sofrer qualquer alteração [101]. Quando o deslocamento do fóton é variável, a distância a percorrer é escolhida de modo que nesse deslocamento o fóton sofre dispersão ou absorção [101].

Para o lançamento do fóton podem ser utilizadas duas técnicas: a técnica de injeção directa, onde é lançado um fóton de cada vez, ou uma técnica de redução de variância, conhecida como técnica da captura implícita. De acordo com o Prof. Frits de Mul [93], quando a técnica da captura implícita é utilizada, é necessário aplicar informação que provêm de cálculos anteriores para prever os seguintes, o que pode acarretar alguns

perigos. Por este motivo, o software utilizado e desenvolvido pelo Prof. Frits de Mul [93] aplica o método de injeção directa que apesar de ser mais demorado permite ultrapassar os perigos das técnicas de redução de variância. Nesta técnica, a simulação termina quando o fóton é detectado ou quando é totalmente absorvido/reflectido, seguindo-se o lançamento de um novo fóton. O processo é repetido até que sejam lançados todos os fótons pretendidos.

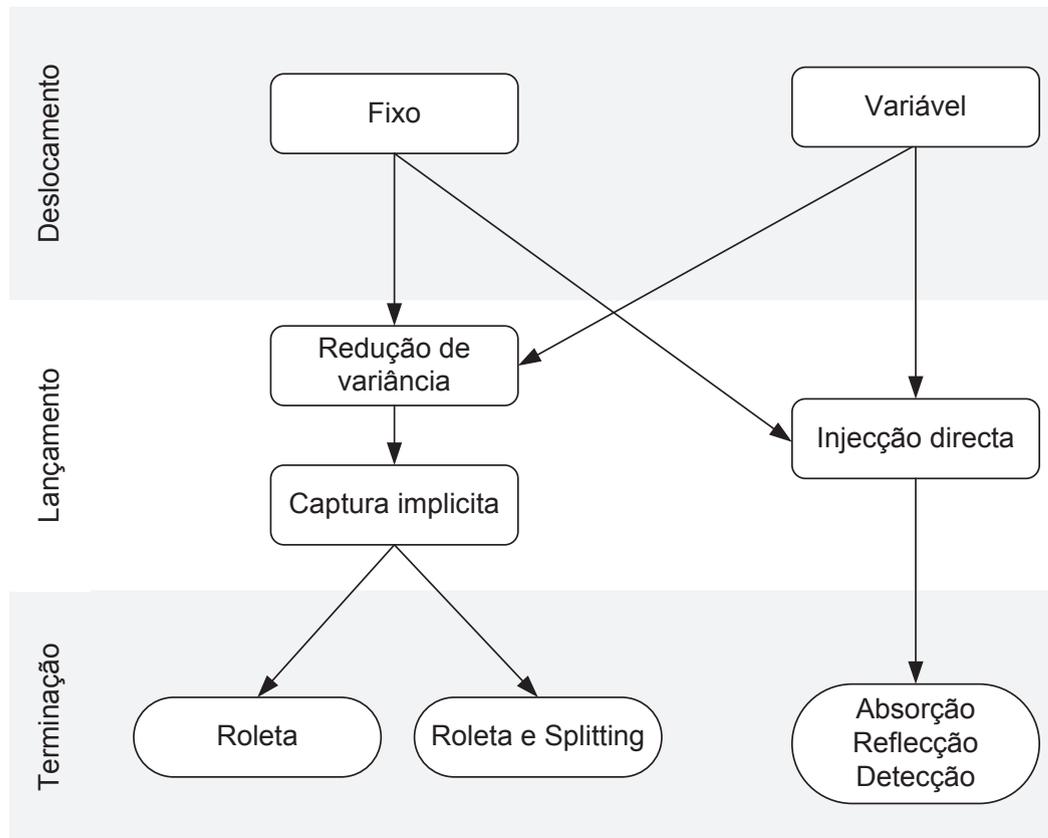


FIGURA 4.3: Técnicas utilizadas para a aplicação do método de Monte Carlo na fluxometria laser Doppler.

### 4.3.1 Lançamento do fóton

A injeção dos fótons no meio é efectuada sob a forma de um feixe focado (*pencil beam*) e os fótons são lançados na camada mais superficial do modelo simulado [93]. A direcção de propagação do fóton pode ser descrita pelos ângulos polar e azimutal,  $\theta$  e  $\varphi$  (ver figura 4.4). Sendo  $\vec{k}_i$  o vector que representa o fóton injectado no meio e  $k_i$  a sua amplitude, a

direcção do fóton em cada eixo é descrita pelas expressões [93]:

$$\begin{aligned} k_x &= k_i \sin \theta \cos \varphi; \\ k_y &= k_i \sin \theta \sin \varphi; \\ k_z &= k_i \cos \theta, \end{aligned} \quad (4.23)$$

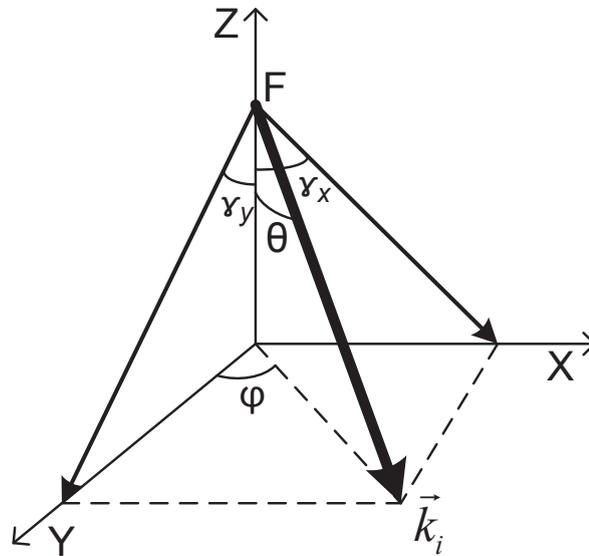


FIGURA 4.4: Lançamento do fóton: a superfície do modelo simulado está no plano X-Y, F é o local de injeção,  $\theta$  e  $\varphi$  são os ângulos de inclinação de  $\vec{k}_i$ .

Os ângulos de divergência da projecção do percurso nos planos X-Z e Y-Z são  $\gamma_x$  e  $\gamma_y$ , respectivamente, e são definidos pelas expressões [93]:

$$\begin{aligned} \tan \gamma_x &= \frac{k_x}{k_z} = \tan \theta \cos \varphi; \\ \tan \gamma_y &= \frac{k_y}{k_z} = \tan \theta \sin \varphi. \end{aligned} \quad (4.24)$$

### 4.3.2 Mecanismo de propagação do fóton

A distância média de translação de um fóton numa camada ou num objecto  $l$  do modelo simulado, caso não haja absorção nessa camada, é dada pela expressão [93]:

$$L_l = \frac{l}{\sum_b c_{lb} \sigma_{tb}}, \quad (4.25)$$

onde  $c_{lb}$  é a concentração das partículas do tipo  $b$  na camada  $l$  (partículas/ $mm^{-3}$ ), e  $\sigma_{tb}$  é a secção eficaz total da partícula  $b$  [93]. A secção eficaz total é representada pela expressão:

$$\sigma_{tb} = \sigma_{ab} + \sigma_{sb}, \quad (4.26)$$

onde  $\sigma_{ab}$  e  $\sigma_{sb}$  são a secção eficaz de absorção e de dispersão da partícula  $b$ , respectivamente. A probabilidade do fotão encontrar uma partícula do tipo  $b$  no objecto  $l$  é dada pela expressão [93]:

$$f_{lb} = \frac{c_{lb}\sigma_{tb}}{\sum_b c_{lb}\sigma_{tb}}, \quad (4.27)$$

e a probabilidade da partícula percorrer uma distância  $\Delta p$  é dada por [93]:

$$f_{sl} = 1 - \exp\left(\frac{-\Delta p}{L_1}\right). \quad (4.28)$$

A partir desta expressão pode ser deduzido a distância percorrida actual  $\Delta p$  [93]:

$$\Delta p = -L_l \ln(1 - H), \quad (4.29)$$

onde  $H$  é um número aleatório ( $0 \leq H < 1$ ). A expressão  $\ln(1 - H)$  é utilizada para evitar a singularidade no caso de  $H$  ser igual a 0.

É preciso ter em conta que a distância percorrida pelo fotão pode terminar prematuramente quando é atingida uma fronteira. Nesse caso pode ser definida a fracção de caminho percorrido ( $f_p$ ) entre o último evento e o ponto de intersecção com a fronteira. O caminho efectivo pode então ser calculado através da expressão [93]:

$$\Delta p_{eff} = f_p \Delta p. \quad (4.30)$$

Caso  $f_p < 1$ , a trajectória percorrida vai prolongar-se para o outro lado da interface e consequentemente o percurso terá de ser corrigido de acordo com o caminho livre médio percorrido pelo fotão nos dois meios.

A probabilidade de absorção do fotão no meio  $l$  antes do fotão atingir o final do percurso  $\Delta p_{eff}$  é dada pela expressão [93]:

$$f_{al} = 1 - \exp(-\mu_{al}\Delta p_{eff}). \quad (4.31)$$

Para decidir se acontece absorção é necessário escolher um novo número aleatório  $H$ . Se  $H < f_{al}$  a absorção ocorre durante o percurso  $\Delta p_{eff}$ . Se a condição anterior não for verdade, a absorção ocorre no final do percurso  $\Delta p_{eff}$  quando:

$$H < 1 - a_{lb}, \quad (4.32)$$

onde  $H$  é um novo número aleatório e  $a_{lb}$  é o albedo da partícula  $b$  no objecto  $l$ . Se a equação 4.32 não for satisfeita, então o fóton será dispersado.

Uma vez que estão a ser consideradas separadamente a absorção pelas partículas presentes no meio e a absorção do próprio meio, pode ser definido o comprimento de translação médio,  $L_{trans,l}$ , para o meio  $l$ :

$$L_{trans,l} = [\mu_{al} + \sum_b c_{lb}\sigma_{sb}]^{-1}, \quad (4.33)$$

onde  $\mu_{al}$  é o coeficiente de absorção do meio  $l$  [93]. O comprimento de absorção médio  $L_{abs,l}$  resultante é dado pela expressão [93]:

$$L_{abs,l} = [\mu_{al} + \sum_b c_{lb}\sigma_{ab}]^{-1}. \quad (4.34)$$

A equação 4.29 pode ser então corrigida, assim como as subsequentes expressões tendo em conta a absorção do meio. A distância percorrida  $\Delta p$  é então representada pela expressão [93]:

$$\Delta p = -L_{trans,l} \ln(1 - H). \quad (4.35)$$

### 4.3.3 Absorção do conjunto de fótons

O algoritmo utilizado para a absorção do fóton é baseado no método da “morte súbita”, onde é considerado que o fóton é completamente absorvido de uma só vez, sendo então removido dos cálculos. Este método torna a simulação mais demorado, quando comparado com a técnica da captura implícita, especialmente quando há uma grande probabilidade de que ocorra absorção. Por outro lado, este algoritmo permite-nos estudar a posição onde os fótons foram absorvidos [93].

A posição do fóton, juntamente com os ângulos direccionais, são armazenados depois da reflexão ou transmissão. No entanto, para o caso da absorção, a posição é armazenada

juntamente com os ângulos do último percurso do fóton, de acordo com a convenção:

$$\Delta p = |\Delta p|(\sin \theta \cos \varphi, \sin \theta \sin \varphi, \cos \theta). \quad (4.36)$$

#### 4.3.4 Dispersão do grupo de fótons

No caso do fóton não ser absorvido durante ou no final do percurso de translação, ele vai sofrer dispersão. Para a luz não polarizada, o eixo dos  $xx$  pode ser escolhido aleatoriamente num plano perpendicular ao eixo dos  $zz$ . O ângulo de dispersão  $\theta$  é o ângulo de dispersão (ver figura 4.5) [93].

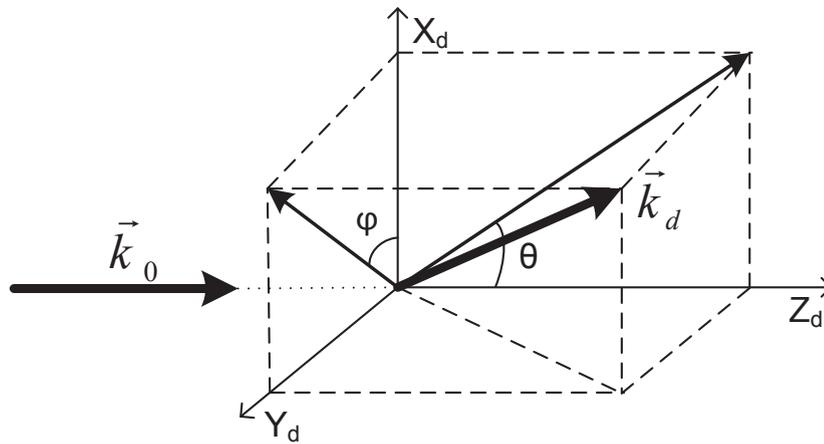


FIGURA 4.5: Eixo de dispersão. Os vectores de propagação do fóton, antes e depois da dispersão, são representados por  $\vec{k}_0$  e  $\vec{k}_d$ , respectivamente.

A probabilidade de dispersão na direcção dada pelos ângulos  $\theta$  e  $\varphi$  é descrita pela função de dispersão  $p(\theta, \varphi)$ . Esta função é normalizada de modo a que a dispersão total, ao longo do ângulo sólido  $4\pi$ , é igual à unidade [93]:

$$\int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^\pi d\theta p(\theta, \varphi) \sin \theta = 1. \quad (4.37)$$

O ângulo azimutal  $\varphi$  pode ser determinado através da expressão [93]:

$$\varphi = H2\pi, \quad (4.38)$$

enquanto que para a determinação do ângulo polar  $\theta$ , é obtida a função cumulativa normalizada  $C(\theta, \varphi)$  dada por:

$$C(\theta, \varphi) = \frac{C'(\theta, \varphi)}{C'(\pi, \varphi)} \quad \text{com} \quad C'(\theta, \varphi) = \int_0^\theta p(\theta', \varphi) \sin \theta' d\theta'. \quad (4.39)$$

O ângulo  $\theta$  é então obtido através da resolução da equação:

$$C(\theta, \varphi) = H, \quad (4.40)$$

onde  $H$  é um novo número aleatório calculado [93].

As coordenadas de dispersão, representadas na figura 4.5, foram relacionadas com as coordenadas do laboratório através das relações apresentadas na figura 4.6 ( $\theta$  é o ângulo entre os vectores de propagação antes e depois da dispersão).

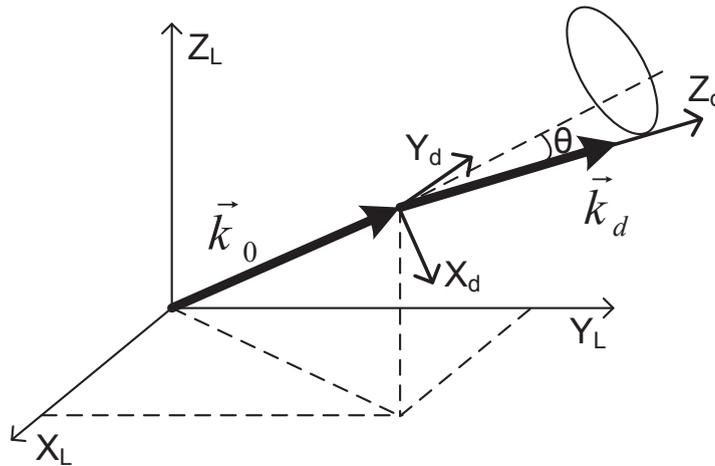


FIGURA 4.6: Relação entre as coordenadas de laboratório (subscrito  $L$ ) e as coordenadas de dispersão (subscrito  $d$ ). O círculo indica o conjunto de possibilidades para as direcções do vector para  $\theta$  fixo e  $\varphi$  aleatório.

A ligação entre os dois sistemas,  $L$  e  $d$ , é feita em três etapas [93]:

$$\begin{aligned} (1) \quad \vec{z}_d &= \frac{\vec{k}_0}{|\vec{k}_0|}; \\ (2) \quad \vec{y}_d &= \frac{\vec{z}_L \times \vec{z}_d}{|\vec{z}_L \times \vec{z}_d|}; \\ (3) \quad \vec{x}_d &= \frac{\vec{y}_d \times \vec{z}_d}{|\vec{y}_d \times \vec{z}_d|}; \end{aligned} \quad (4.41)$$

sendo que [93]:

$$\vec{k}_d = |\vec{k}_d| [x_d \cos \varphi \sin \theta + y_d \sin \varphi \sin \theta + z_s \cos \theta]. \quad (4.42)$$

O comprimento de  $\vec{k}_d$  é determinado pelo comprimento de onda local:  $2\pi/\lambda_{local}$ . Deste modo, o vector de dispersão pode ser representado nas coordenadas do laboratório [93]. No software o vector unitário expresso nas coordenadas de laboratório é actualizado em cada evento em que há alteração da direcção do fotão.

A função de fase para a dispersão isotrópica, utilizada nas simulações do fantoma, é descrita pela expressão [93]:

$$p_{iso}(\theta, \varphi) = \frac{1}{4\pi}. \quad (4.43)$$

Neste caso a função cumulativa normalizada  $C(\theta)$  é determinada por [93]:

$$C(\theta) = 1/2(1 - \cos \theta), \quad (4.44)$$

sendo que  $\theta$  pode ser obtido através da expressão  $\theta = \arccos(1 - 2H)$ , e  $g$  é igual a zero.

#### 4.3.5 Reflexão ou transmissão numa fronteira

Para o caso em que as fronteiras são perpendiculares ao eixo dos  $zz$ , o cálculo dos ângulos de reflexão ou refacção é baseado na lei de Snell apresentada na equação 4.15.

A fracção de luz reflectida é dada pela relação de Fresnel [93]:

$$R_F(\theta_1) = \begin{cases} \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}\right)^2 & \text{se } \theta = 0 \\ \frac{1}{2} \left[ \frac{\sin^2(\theta_1 - \theta_2)}{\sin^2(\theta_1 + \theta_2)} + \frac{\tan^2(\theta_1 - \theta_2)}{\tan^2(\theta_1 + \theta_2)} \right] & \text{se } 0 < \theta_1 < \theta_c \\ 1 & \text{se } \theta_1 > \theta_c; \text{ com } \theta_c = \arcsin(n_2/n_1), \end{cases} \quad (4.45)$$

onde  $n_1$  e  $n_2$  são os índices de refacção do meio 1 e do meio 2, respectivamente.

Um número aleatório  $R$  é gerado. Caso  $R < R_F(\theta_1)$  o fotão é reflectido, caso contrário acontece refacção [93].

### 4.3.6 Detecção e Terminação

A detecção dos fótons é externa e tem lugar na superfície do meio simulado. A região de detecção está limitada pela abertura numérica (NA), com  $NA = \sin \theta_D$ , onde  $\theta_D$  é metade do ângulo de abertura do cone de detecção. NA varia entre 0 e 1, sendo que quando  $NA = 1$  todos os ângulos são aceites [93].

O software utilizado armazena o local de detecção do fóton (coordenadas  $x$  e  $y$ ) e os ângulos direccionais ( $\theta$  e  $\varphi$ ) relativamente às coordenadas laboratoriais. Também são guardados o número de eventos de dispersão, a percentagem de eventos de dispersão Doppler, a frequência Doppler resultante e a trajetória percorrida. A profundidade média dos eventos de dispersão ou a profundidade média do percurso percorrido também é armazenada [93].

É assumido que o fóton é detectado quando [93]:

- o plano de detecção é ultrapassado na direcção correcta. Isto implica que o fóton atravesse a interface final entre o modelo simulado e o meio onde está o detector. Isto é determinado através das relações de Fresnel; e
- quando o plano de detecção é ultrapassado dentro da fronteira da janela de detecção. Nas simulações realizadas foi utilizada uma janela em forma de anel.

### 4.3.7 Implementação dos perfis de velocidade e construção do espectro de potência

O perfil de velocidades das partículas dispersoras tem uma distribuição parabólica, ou seja, varia entre 0 mm/s, nas paredes dos vasos, e o dobro da velocidade média, no centro do vaso. A velocidade da partícula dispersora é calculada de acordo com a expressão [93]:

$$v = 2v_0 \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right), \quad (4.46)$$

em que  $v_0$  representa a velocidade média ao longo do perfil,  $r$  é a posição da partícula relativamente ao eixo de simetria do tubo e  $R$  é o raio do tubo.

### 4.3.8 Construção do espectro Doppler de potência

A construção do espectro de potência é feita a partir da distribuição de frequências de todos os fótons detectados, agrupados numa distribuição de frequências discreta  $N(\omega_i)$  [93].

A expressão geral para o cálculo do espectro de potência é dada por [93]:

$$S(j\Delta\omega) = 2\pi \frac{const^2 \beta^2}{\Delta\omega} \sum_{p=0}^{N_{int}-j} a_p a_{p+j}, \quad (4.47)$$

onde  $const$  é uma constante de proporcionalidade,  $\beta$  é uma constante relacionada com o grau de coerência dos sinais nos intervalos de frequência ( $\beta = 1$  representa a coerência perfeita),  $a_i$  representa o número de fótons no  $i$ -ésimo intervalo espectral (com  $\Delta\omega = 2\pi\Delta f$ ) e  $N_{int} + 1$  é o número de intervalos espectrais.

A dedução das expressões apresentadas pode ser consultada em [93].



## Capítulo 5

# Protótipo não-invasivo

*Neste capítulo é descrito o protótipo desenvolvido para a medição, com discriminação em profundidade, da perfusão sanguínea da pele. São apresentado o hardware e o software desenvolvidos, e são mostrados e discutidos os resultados obtidos nos testes realizados. Foram levados a cabo testes *in vitro*, onde foi avaliada a linearidade das medições, para diferentes concentrações e velocidades de dispersores móveis, assim como para diferentes profundidades dos mesmos. O protótipo foi validado *in vivo* em participantes saudáveis, onde foi avaliada a variação da perfusão sanguínea em testes de reacção.*

### 5.1 *Hardware* - sistema electrónico

Como já foi referido anteriormente, existe interesse por parte dos clínicos na discriminação do fluxo sanguíneo proveniente dos vasos sanguíneos mais superficiais do fluxo proveniente de vasos mais internos. A utilização de diferentes comprimentos de onda e diferentes separações entre fibras pode expandir o potencial da técnica de FLD para o estudo de doenças como a psoríase, doenças reumáticas, fenómeno de Raynaud, acesso a inflamações na derme e queimaduras, úlceras cutâneas, entre outras, ao permitir o acesso a estruturas mais profundas de pele. Com o objectivo de testar as duas variáveis referidas, comprimentos de onda e diferentes separações entre fibras, em simultâneo, foi desenvolvido o protótipo não-invasivo apresentado na figura C.2 (uma fotografia do mesmo pode ser vista no apêndice C). O sistema é constituído por três comprimentos de onda e por três canais de detecção.

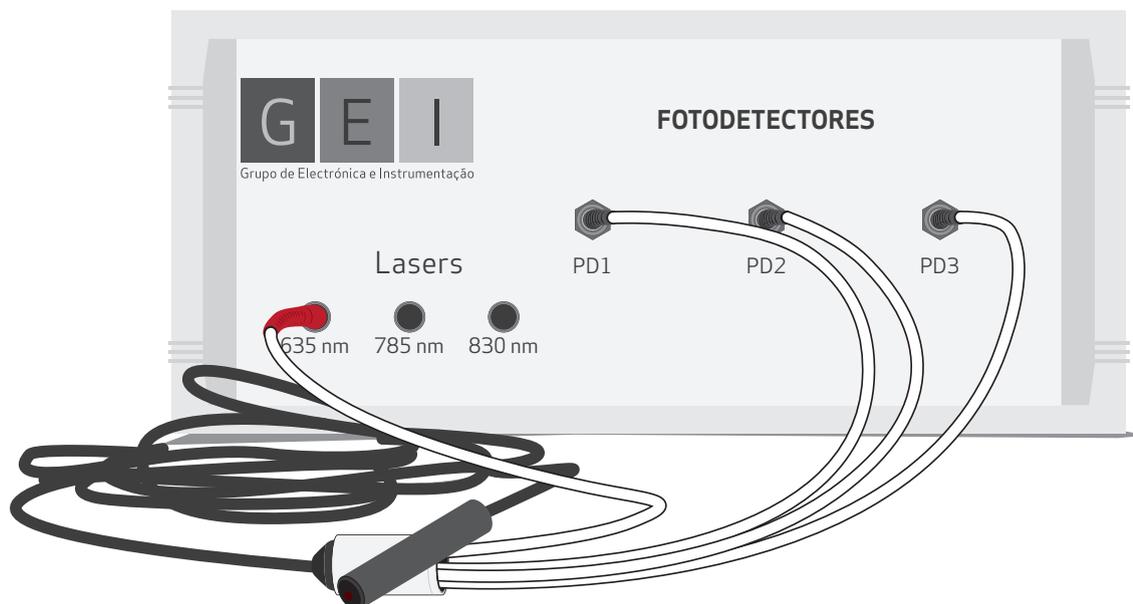


FIGURA 5.1: Protótipo não-invasivo.

O protótipo, representado esquematicamente na figura 5.2, é constituído pelo sistema de actuação [figura 5.2 (a)], pelo sistema de calibração [figura 5.2 (b)] e pelo sistema de aquisição, responsável pela detecção e digitalização do sinal [figura 5.2 (c)] [105, 106]. O controlo digital é feito através de um microcontrolador.

O sistema de actuação [figura 5.2 (a)] é constituído por uma fonte de corrente da Thorlabs® (refs. LD1100 ou LD1101), utilizada para a alimentação dos díodos laser. Esta fonte garante a manutenção da potência irradiada pelos díodos laser em valores constantes, evitando flutuações causadas, por exemplo, por variações de temperatura. No entanto, utilização das fontes de corrente de Thorlabs® impossibilitou a implementação de detecção *self-mixing* neste protótipo, uma vez que o fotodíodo de monitorização do díodo laser é utilizado como *feedback* para regular a potência da luz laser.

Uma representação detalhada do sistema de actuação pode ser vista na figura 5.3. Os blocos com fundo azul representam a interacção do sistema com o microcontrolador, sendo que *Dig* representa uma saída digital do microcontrolador. A componente central do circuito é a fonte de corrente, que pode ser ligada/desligada digitalmente em modo *stand-by* através do DG419L, ou totalmente através do corte da alimentação. A corrente de alimentação do díodo laser é monitorizada digitalmente e o sistema pode receber duas configurações diferentes de díodos laser - configurações A e B - conforme o tipo de fonte de corrente utilizada. O protótipo é constituído por três sistemas de actuação semelhantes, utilizados para alimentar cada um dos três díodos laser presentes no protótipo. Os

comprimentos de onda utilizados são: 635 (CO635), 785 (CO785) e 830 (CO830) nm (refs. DL5038-021, DL4140-001 e HL8325G, respectivamente).

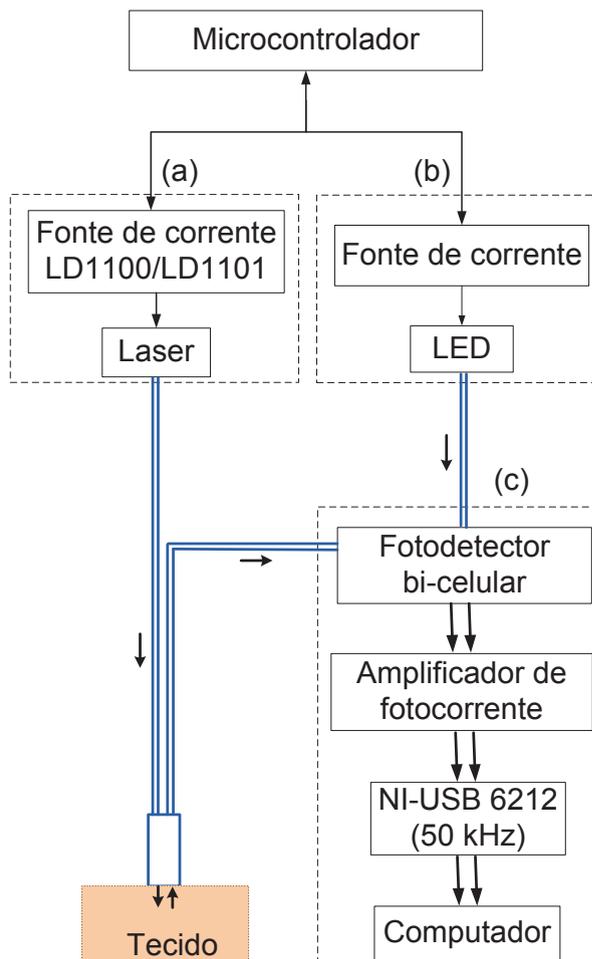


FIGURA 5.2: Desenho esquemático do protótipo não-invasivo, constituído pelos sistemas: (a) de actuação; (b) de calibração e (c) de aquisição.

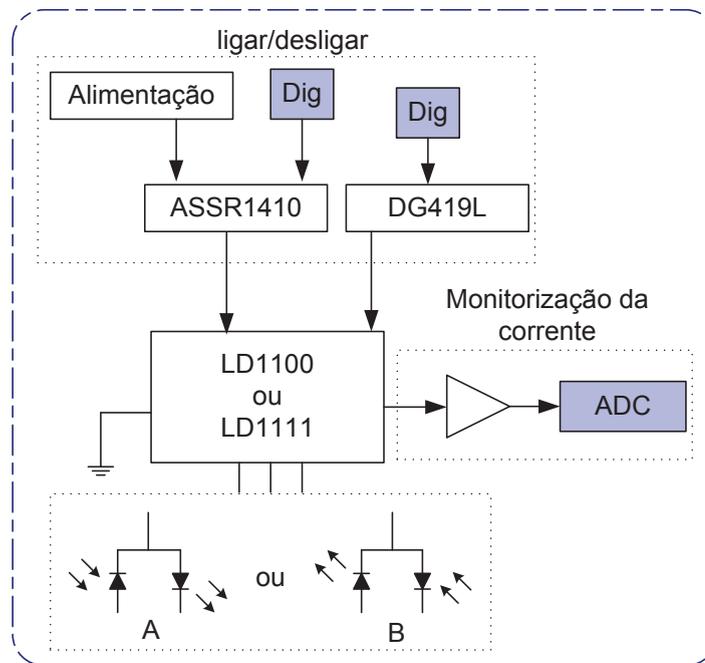


FIGURA 5.3: Representação detalhada do sistema de actuação. Os blocos com fundo azul representam a interação do sistema com o microcontrolador, sendo que *Dig* representa uma saída digital do microcontrolador.

O sistema de calibração está representado na figura 5.2 (b). Uma representação detalhada deste sistema pode ser vista na figura 5.4 onde os blocos com fundo azul representam a interação do sistema com o microcontrolador. É constituído por três díodos emissores de luz (LEDs), com 630, 780 e 830 nm de comprimento de onda. Um DAC de 12 bits, o ADN8810, permite o controlo digital da corrente de alimentação dos LEDs de calibração. Apesar de ligado a três LEDs, é apenas ligado um LED de cada vez, através do controlo digital de um *relay* (ref. ASSR1410). Três canais de calibração foram utilizados, cada um para excitar cada um dos canais de detecção existentes no protótipo. A comunicação entre os DACs e o microcontrolador é feita por SPI sendo que cada DAC é identificado através de três pinos identificadores, reconhecidos pela comunicação SPI. Dois controladores digitais permitem desligar ou pôr o DAC em modo *stand-by*.

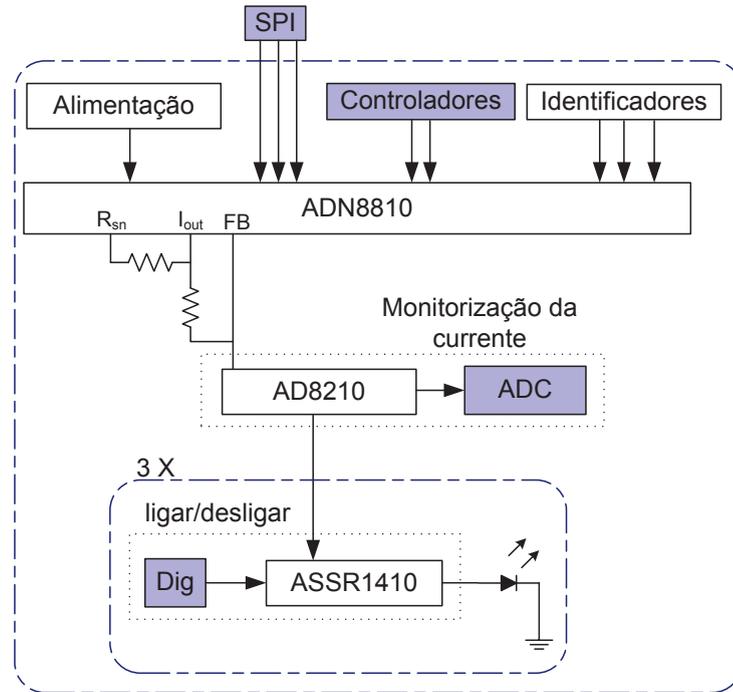


FIGURA 5.4: Representação detalhada do sistema de calibração. Os blocos com fundo azul representam a interação do sistema com o microcontrolador e *Dig* representa uma saída digital do microcontrolador.

A detecção do sinal [figura 5.2 (c)] é feita por três fotodetectores (FDs) bi-celulares, FD1, FD2 e FD3 (ref. SD066-24-21-011 da *Advanced Photonix Inc.*), que podem ser excitados pela luz proveniente dos LEDs de calibração ou pela luz laser recolhida pela sonda. A utilização de um canal bi-celular de detecção foi avaliada por Salerud e Oberg [107], que provaram que a redução de ruído é mais eficaz neste caso, do que quando é utilizado apenas um canal uni-celular. Uma representação detalhada deste sistema pode ser vista na figura 5.5. A corrente gerada pelos fotodetectores é amplificada, convertida em tensão e digitalizada, a 50 kHz, por um sistema de aquisição de dados da National Instruments®, a NI-USB 6212. O sinal é enviado para o computador, onde é armazenado e processado em software Matlab®. Três canais de detecção foram implementados, sendo que cada um está ligado a uma fibra receptora: DF0.14 está conectada a FD1, FD2 recebe luz da DF0.25 e DF1.2 está conectada a FD3.

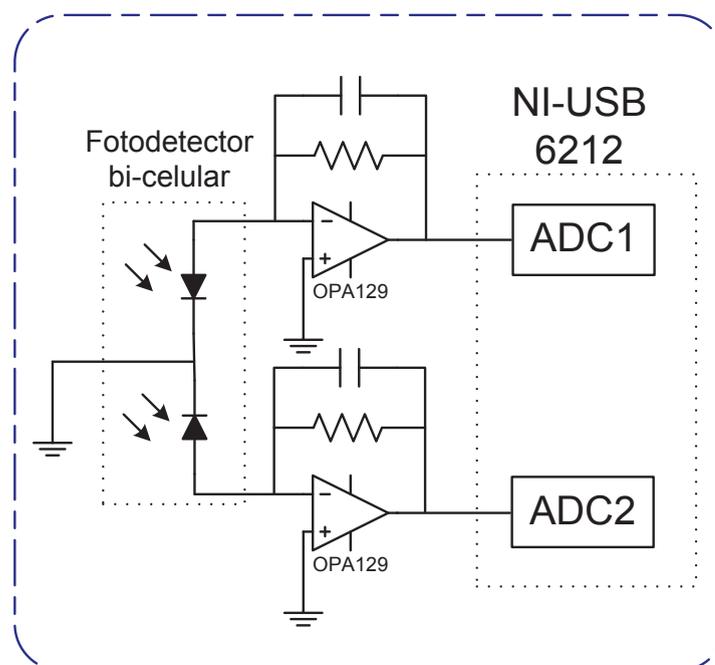


FIGURA 5.5: Representação detalhada do sistema de detecção.

Um esquemático do conector de um canal de aquisição, pode ser visto na figura 5.6. O fotodiodo bi-celular (figura 5.6 C) está inserido no conector (figura 5.6 B), onde consegue “ver” luz proveniente da sonda (figura 5.6 A) e luz proveniente dos três LEDs de calibração. A luz LED é guiada até aos fotodetectores através de fibras ópticas (figura 5.6 D). Uma caixa metálica (figura 5.6 E) permite o acoplamento entre a fibra óptica e o LED.

O controlo das fontes de corrente e do sistema de calibração, o controlo da variação da corrente dos LEDs e a monitorização da corrente dos lasers e dos LEDs é feito por um microcontrolador, o PIC24FJ128GA010 da Microchip®. Serve também de porta de comunicação entre o circuito e o computador através de uma porta série UART.

Uma sonda da Perimed® (ref. 415-322), composta por fibras ópticas monomodo, é utilizada para guiar a luz laser para o tecido e a luz dispersada para os FDs. A sonda, representada esquematicamente na figura 5.7, é constituída por uma fibra óptica central que guia a luz para o tecido, e várias fibras de detecção que recolhem a luz dispersada no tecido. Uma fibra de detecção está localizada a 0,14 mm da fibra central, outra a 0,25 mm, e um grupo de 12 fibras concêntricas estão localizadas a 1,2 mm da fibra central. Estes canais de detecção vão ser referidos posteriormente como DF0.14, DF0.25

e DF1.20, respectivamente. A potência da luz laser na sonda é de 5,6; 6,4 e 12,2 mW para o CO635, o CO785 e o CO830, respectivamente.

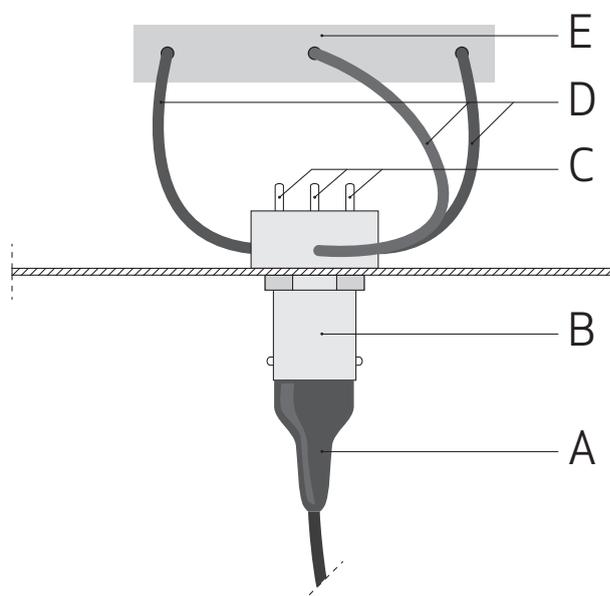


FIGURA 5.6: Representação do conector de um canal de detecção, onde se podem ver: *A* a sonda; *B* o conector; *C* o fotodetector bi-celular; *D* as fibras ópticas; e *E* a caixa metálica onde estão posicionados os LEDs.

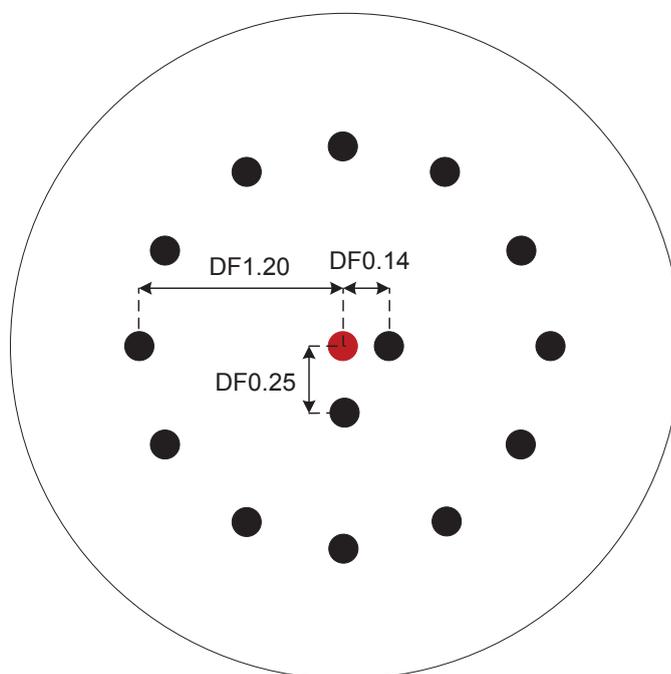


FIGURA 5.7: Desenho esquemático da disposição das fibras ópticas na sonda: círculo vermelho - fibra emissora; círculo preto - fibras detetoras; DF0.14 - fibra detetora localizada a 0,14 mm da fibra central; DF0.25 - fibra detetora localizada a 0,25 mm da fibra central; e DF1.20 - fibras detetoras localizada a 1,20 mm da fibra central.

A inclusão de três tipos de díodos laser e três canais de detecção no mesmo sistema permite que os feixes de luz laser sejam guiados para o tecido através da mesma sonda, e que a luz dispersada e recolhida em cada fibra seja detectada sempre pelo mesmo fotodetector. Isto permite ultrapassar problemas como diferentes processamentos de sinal e diferentes sistemas de calibração utilizados por diferentes fluxómetros, permitindo que a perfusão sanguínea obtida com diferentes comprimentos de onda possam ser comparados. Para além disso, e com o objectivo de evitar os factores de instrumentação cujos efeitos não podem ser correctamente julgados, alterações dinâmicas como o teste da oclusão arterial, em vez da medição continua da perfusão sanguínea, em conjunto com comparações relativas do fluxo, em vez de comparações de valores absolutos de fluxo, vão ser avaliados na validação do protótipo. Outro factor que é necessário ter em conta quando são utilizados diferentes comprimentos de onda, é o facto de que comparações absolutas podem induzir em erro, visto que a luz penetra diferentes profundidades, podendo atingir vasos sanguíneos com diferentes calibres [108]. Diferentes comprimentos de onda podem também ter zeros biológico e eléctrico diferentes [108].

### 5.1.1 Segurança laser

Na tabela 5.1, estão descritas as irradiâncias máximas permitidas na pele, para um tempo de exposição entre  $10^3$  e  $3 \times 10^4$ , calculadas com base nos índices de exposição máxima permitidos (MPE) da norma IEC 60825 - ICNIRP [109].

TABELA 5.1: Valores MPE para os comprimentos de onda utilizados para um tempo de exposição entre  $10^3$  e  $3 \times 10^4$ .

CO635 ( $w/m^2$ )	CO785 ( $w/m^2$ )	CO830 ( $w/m^2$ )	PF5000 ( $w/m^2$ )
2000	2958	3639	2891

As irradiâncias calculadas para as fibras ópticas existentes na sonda, fibras essas com diâmetro externo igual a  $125 \mu m$  e abertura numérica (NA) igual 0,37; para as potências laser referidas, estão apresentadas na tabela 5.2. Foi considerada uma separação de 2 mm entre a sonda e a pele.

TABELA 5.2: Irradiâncias calculadas para os díodos laser utilizados no protótipo.

CO635 ( $w/m^2$ )	CO785 ( $w/m^2$ )	CO830 ( $w/m^2$ )	PF5000 ( $w/m^2$ )
2200	2515	4794	393*

Para alguns casos os valores de irradiância dos lasers ultrapassam o limite da MPE. No entanto, os lasers não foram considerados perigosos uma vez que estes comprimentos de onda apenas podem afectar a temperatura da pele. Foi efectuada a medição da temperatura cutânea (na região irradiada) num voluntário ao longo das medições para cada comprimento de onda e para o PF5000 e não foi registada qualquer alteração da temperatura local no decorrer da medição.

## 5.2 Software - controlo digital

O controlo digital dos DACs, dos lasers, e dos LEDs, assim como a monitorização dos valores das correntes de alimentação dos DACs e dos lasers (conversão analógica-digital), são feitos pelo microcontrolador PIC24FJ128GA010 da Microchip®. Foi definido um conjunto de identificadores para os vários tipos de dispositivos (DACs, lasers, *etc.*), compostos por 8 bits, onde os dois bits mais significativos correspondem ao tipo de dispositivo e os bits 5 e 4 correspondem a um determinado dispositivo de um determinado tipo. Neste circuito electrónico existem três dispositivos do tipo DAC, três dispositivos do tipo laser, três dispositivos do tipo LED e quatro dispositivos de monitorização da corrente.

A tabela 5.3 apresenta os vários identificadores para os vários tipos de dispositivos, onde *XX* representa um determinado dispositivo.

TABELA 5.3: Representação binária dos vários tipos de dispositivos.

Identificador	Tipo de dispositivo
0b00XX0000	DAC
0b01XX0000	LED
0b10XX0000	Laser
0b11XX0000	Monitorização da corrente

\*Potência laser de 1 mW

O dispositivo a ser controlado é definido pelo utilizador e enviado para o microcontrolador através da comunicação porta série. O protocolo de comunicação desenvolvido para estabelecer a comunicação, descrito na tabela 5.4, define as tarefas a serem executadas pelo microcontrolador em função dos comandos recebidos.

TABELA 5.4: Descrição das funções dos comandos utilizados no protocolo de comunicação.

Comando (Identificação binária)	Função
0b00110000	Liga todos os DACs
0b00000000	Liga o DAC 1
0b00010000	Liga o DAC 2
0b00100000	Liga o DAC 3
0b10000000	Liga todos os lasers
0b10010000	Liga o laser 1
0b10100000	Liga o laser 2
0b10110000	Liga o laser 3
0b01000000	Desliga todos os LEDs
0b01010000	Liga os LEDs de 635 nm
0b01100000	Liga os LEDs de 785 nm
0b01110000	Liga os LEDs de 830 nm
0b11000000	Conversão da corrente debitada pelos DACs
0b11010000	Conversão da corrente que alimenta o laser 1
0b11100000	Conversão da corrente que alimenta o laser 2
0b11110000	Conversão da corrente que alimenta o laser 3
0b01010010	Reset - desliga os lasers, os DACs e os LEDs

O funcionamento do microcontrolador está descrito no diagrama representado na figura 5.8. Uma vez identificado o dispositivo, o microcontrolador executa a função correspondente ao comando enviado.

Foi desenvolvido um interface gráfico que permite ao utilizador fazer a calibração do sistema, a aquisição de dados e o processamento de dados sem ter que perceber a complexidade do sistema.

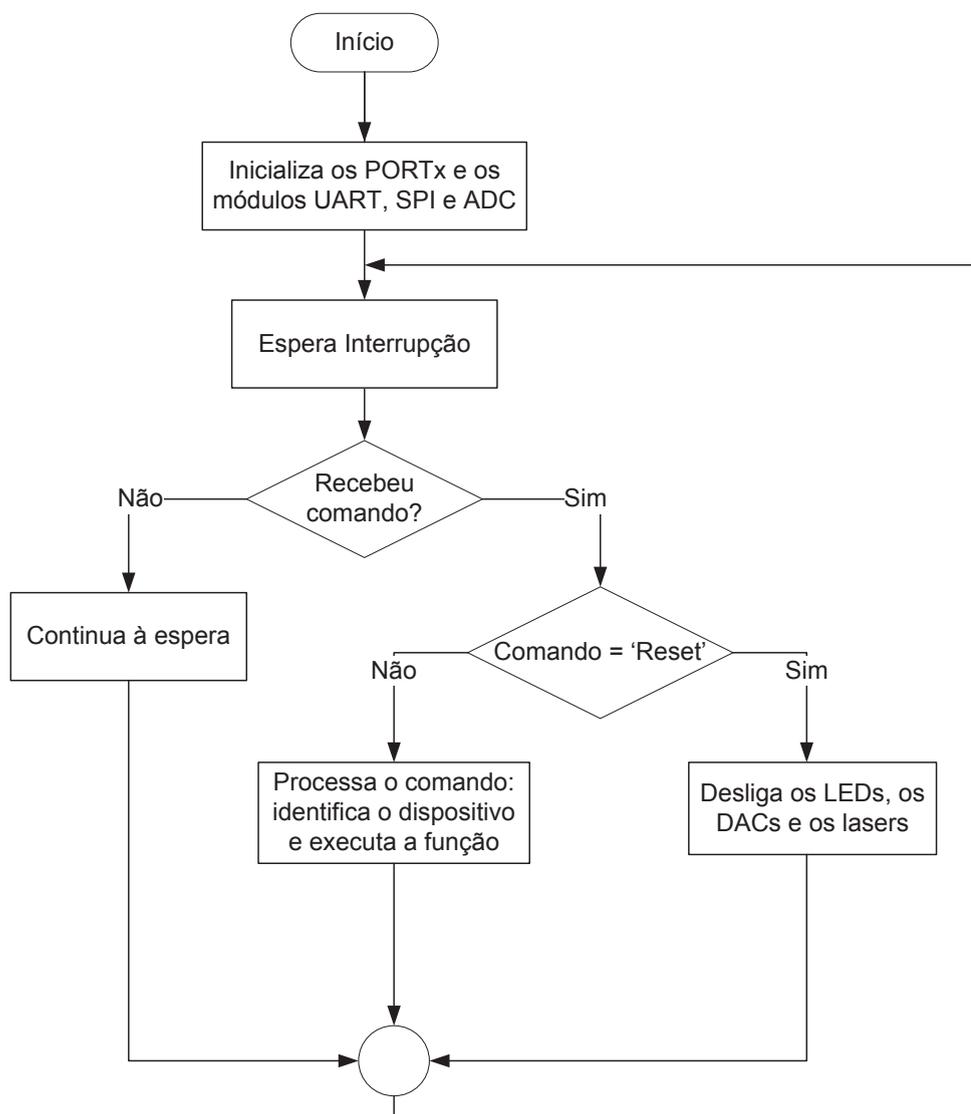


FIGURA 5.8: Fluxograma representativo das funções executadas pelo microcontrolador.

### 5.3 Processamento de sinal

As duas fotocorrentes obtidas em cada um dos FDs bi-celulares, depois de amplificadas e convertidas em tensão, são digitalizadas a 50 kHz e armazenadas. As etapas para a obtenção do primeiro momento do espectro, e para a obtenção da tensão DC produzida pela intensidade média da luz que incidiu no FD, estão ilustradas na figura 5.9 [106].

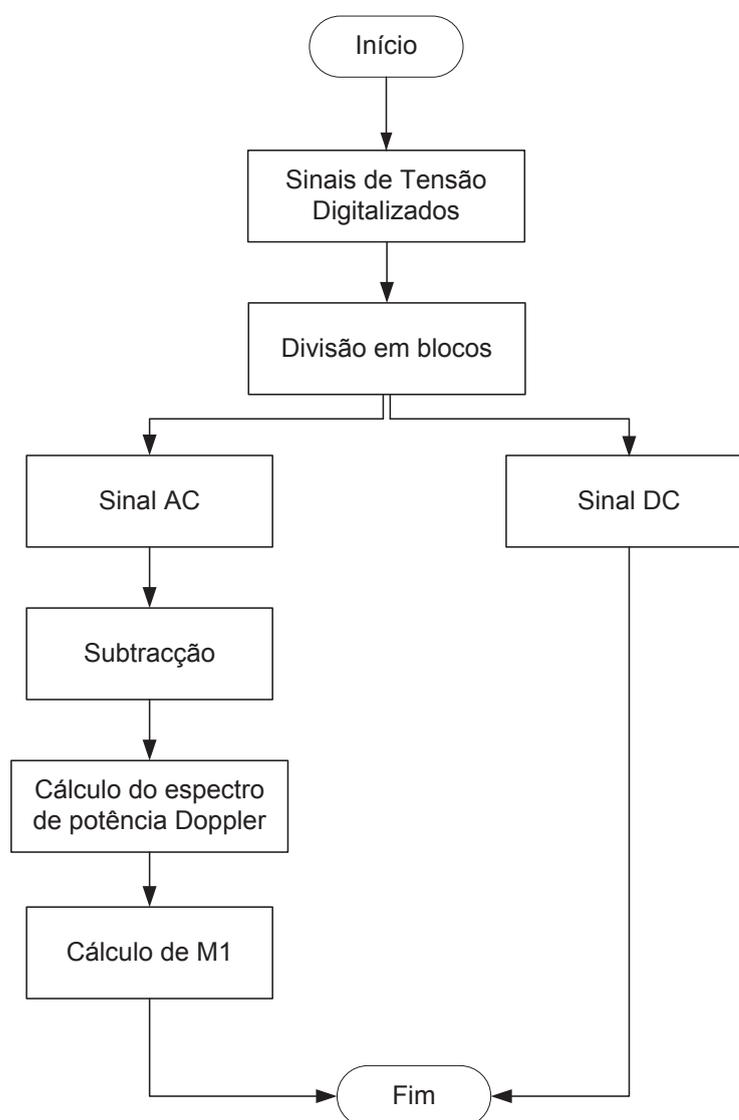


FIGURA 5.9: Fluxograma representativo do processamento de sinal realizado.

O primeiro passo, consiste na divisão dos sinais em segmentos. Posteriormente é feita a separação do sinal DC e do sinal AC, com filtros passa baixo e passa alto, respectivamente. De seguida é feita a subtracção das duas tensões obtidas em cada FD, de modo a eliminar as correntes comuns às duas áreas fotosensíveis, provenientes de variações da intensidade da luz circundante ou variações da intensidade da luz laser. Finalmente são calculados o espectro de potência Doppler e o primeiro momento do espectro de potência Doppler. É também aplicado um filtro passa-banda com as frequências de corte inferior e superior de 25 Hz e de 16 kHz, respectivamente. A frequência de corte inferior ( $f_{c_i}$ ) tem como propósito eliminar contribuições da componente DC (luz não desviada) [110],

enquanto que a frequência de corte superior está relacionada com factores biológicos. A frequência máxima esperada nas medições da perfusão microcirculatória é de 25 kHz se considerarmos que  $\alpha = 180^\circ$ , e  $\theta = 0^\circ$  ou  $\theta = 0^\circ$ , para velocidades de GVM inferiores a 2 mm/s e para os comprimentos de onda utilizados, de acordo com a equação 3.4. No entanto, uma vez que os GV são células que desviam a luz para a frente [58],  $\alpha$  será bastante inferior a  $45^\circ$ . Nesse caso o espectro de potência resultante exibirá um decaimento exponencial que não ultrapassa os 16 kHz [110].

A resolução em frequência do espectro de potência, dada pela expressão:

$$R_f = \frac{F_a}{nfft}, \quad (5.1)$$

é igual a aproximadamente 12 Hz. Esta resolução é suficiente para a aplicação da frequência de corte inferior de 25 Hz.

A perfusão primária é então calculada, de acordo com a equação 3.16, através da expressão:

$$Perf_{prima} = \int_{f_{c_i}}^{f_{c_s}} \omega P(\omega) d\omega. \quad (5.2)$$

Para a estimação do espectro de potência é utilizada a função *pwelch* do Matlab® que utiliza o método de Welch. Este método é composto por várias etapas, nomeadamente:

- Divisão do sinal em segmentos;
- Escolha da percentagem de sobreposição;
- Aplicação de uma janela a cada segmento;
- Cálculo da transformada discreta de Fourier de cada segmento;
- Cálculo do periodograma de cada segmento;
- Cálculo da média dos periodogramas.

O método de Welch permite reduzir o ruído do espectro de potência de forma eficiente, uma vez que é baseado no cálculo da média de espectros. A janela utilizada para a redução da fuga espectral, foi a janela de *Hamming* [110].

A taxa de perfusão (TP) é determinada através da expressão:

$$TP = \frac{F_a}{nfft(1 - \%sobreposicao)}, \quad (5.3)$$

onde  $F_a$  representa a frequência de amostragem,  $nfft$  é o número de pontos do espectro de potência, e  $\%sobreposicao$  representa a percentagem de sobreposição dos segmentos de sinal. O esquema representado na figure 5.10 ilustra o modo como é utilizada a sobreposição no cálculo da perfusão. Uma sobreposição de 25% e a utilização de segmentos com 4096 pontos são os parâmetros que permitem a obtenção de uma TP de 16 Hz, quando o sinal é digitalizado a 50 kHz:

$$TP = \frac{50000}{2^{12}(1 - 0,25)} = 16 \text{ Hz.} \quad (5.4)$$

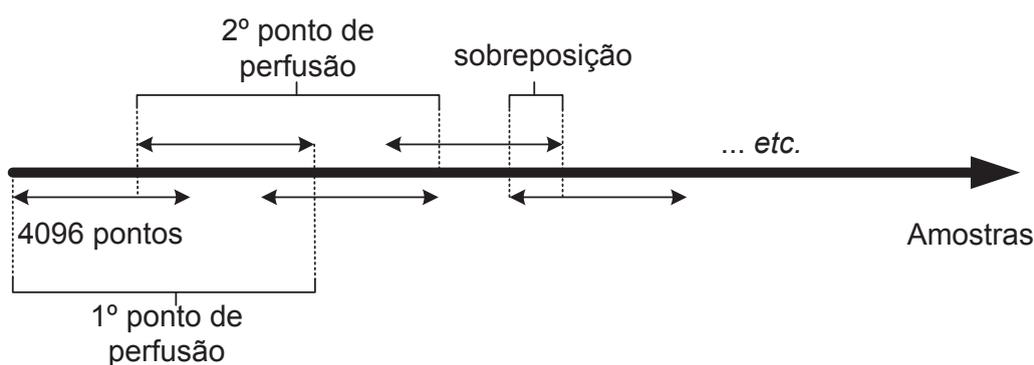


FIGURA 5.10: Esquema representativo da janela de sobreposição utilizada no cálculo da perfusão.

Esta taxa de perfusão é suficiente para as medições da perfusão sanguínea cutânea em humanos, uma vez que é 10 vezes maior que a maior frequência contida nos sinais de FLD, referida anteriormente 5.6.2.4.

## 5.4 Calibração

### 5.4.1 Protocolo

A calibração é feita em duas fases: na primeira fase é calculada a recta de ruído dos fotodetectores para diferentes intensidades de luz, e na segunda fase o sistema é calibrado numa solução padrão [106].

Para a determinação da recta de ruído são utilizados LEDs com o objectivo de registar a resposta dos fotodetectores a diferentes níveis DC de intensidade de luz. A corrente de alimentação dos LEDs é ajustada por *software*, de modo a produzir degraus de resposta com altura constante, sendo que para isso a resposta do fotodetector é utilizado

como *feedback* do sistema de controlo do nível de corrente dos LEDs. As etapas deste procedimento estão resumidas no fluxograma apresentado na figura 5.11. A calibração começa com a excitação do fotodetector quando o LED é alimentado com a corrente  $I_{min}$ , seguindo-se a leitura da resposta do fotodetector. A corrente de excitação do LED é incrementada e o segundo degrau de tensão é registado. A diferença entre os dois degraus é calculada ( $D$ ) e utilizada como referência para os degraus seguintes que devem ter uma altura semelhante. A corrente é novamente incrementada e a resposta do PD é registada. A diferença entre a tensão obtida e a tensão obtida no degrau anterior,  $D_1$  é comparada com  $D$ . Caso sejam idênticos, com uma margem de 10% de variação, a resposta é guardada e é feito um novo incremento na corrente. Por outro lado, se  $D$  for diferente de  $D_1$  a corrente é reduzida ou aumentada, conforme  $D > D_1$  ou  $D < D_1$ , respectivamente. A calibração acaba, quando é atingida a  $I_{max}$ . Os parâmetros utilizados foram:  $I_{min} = 1$  mA,  $I_{max} = 20$  mA e o incremento da corrente foi de 1 mA.

Um conjunto de 2048 pontos, é adquirido a 50 kHz em cada degrau de intensidade e a perfusão primária (ver expressão 5.2) é calculada para cada degrau. A perfusão obtida durante os vários degraus é ajustada a um polinómio de primeiro grau, o qual denominamos de recta de ruído do detector representado pela expressão:

$$Perf_{ruído} = d_c \times DC + b, \quad (5.5)$$

onde  $d_c$  é o declive da curva,  $b$  é a intersecção com o eixo dos  $yy$  e  $DC$  é o valor da tensão DC. Nesta expressão  $b$  representa o ruído no escuro do detector e  $d_c$  o ruído de disparo, este último dependente do nível DC de intensidade luminosa.

Três LEDs com três comprimentos de onda diferentes, 630 (LED630E da Thorlabs), 780 (LED780E da Thorlabs) e 830 nm (TSHG8200 da Vishay), com 7,2; 18 e 17 mW de potência radiante, respectivamente, foram utilizados para a determinação da recta de ruído. A escolha destes três comprimentos de onda deveu-se ao facto de se querer excitar os fotodetectores com uma luz de comprimento de onda similar ao dos díodos lasers existentes no protótipo.

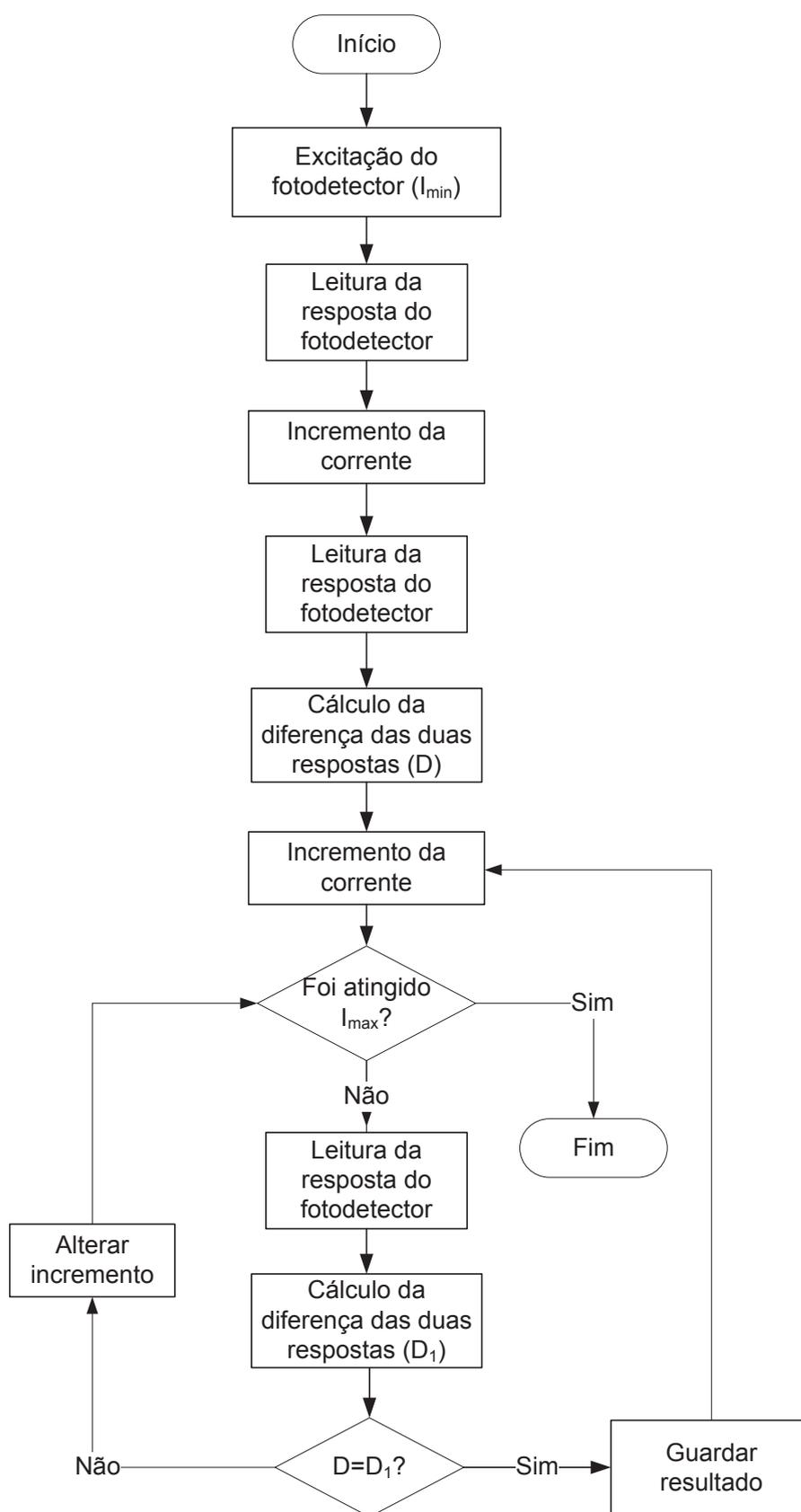


FIGURA 5.11: Fluxograma representativo das etapas da calibração.

Na segunda fase da calibração, a perfusão obtida na solução padrão de motilidade, uma suspensão coloidal de partículas de látex da Perimed® (empresa Sueca), é multiplicada pela constante  $M$  de modo a obterem-se 250 unidades de perfusão (UP). A solução padrão de motilidade é utilizada na calibração de fluxómetros comerciais e serve como referência para se poderem comparar valores de perfusão obtidos com diferentes dispositivos. De acordo com o manual do fluxómetro Periflux 5000 (PF5000) da Perimed® o movimento Browniano das partículas de látex proporciona um valor padrão de perfusão equivalente à perfusão de 250 UP a 22 °C [33]. De acordo com o mesmo manual, a sedimentação de partículas na solução padrão ocorre a uma taxa infinitesimal devido ao seu tamanho reduzido. Um desvio de 7 UP/°C é estimado na medição da perfusão para temperaturas diferentes de 22 °C [33].

A expressão final utilizada para o cálculo da perfusão no tecidos biológicos é:

$$Perf = \frac{M}{DC^2}(Perf_{prima} - Perf_{ruído}). \quad (5.6)$$

A normalização ao factor  $1/DC^2$  tem como objectivo tornar a perfusão independente da intensidade de luz que atinge a superfície do fotodetector.

Depois destas etapas, a perfusão medida num disco de Delrin® deve ser igual a zero, segundo o procedimento de calibração utilizado pelos fluxómetros da Perimed® [33].

#### 5.4.2 Resultados e discussão

Na tabela 5.5 estão apresentados os parâmetros ( $d_c$  e  $b$ ) da recta de ruído obtida com os três LEDs de calibração em cada um dos canais de detecção.

Uma vez que as curvas obtidas com os três comprimentos de onda são muito parecidas, foi apenas utilizado o LED de 830 nm para o cálculo da recta de ruído. Outros factores que também contribuíram para esta escolha foram as dificuldades de alinhamento entre os três LEDs e o fotodetector, e o tempo de calibração que demora o triplo do tempo quando a calibração é feita para três comprimentos de onda. Para além disso, a resposta espectral do fotodetector é maior para o comprimento de onda de 830 nm.

TABELA 5.5: Declive ( $d_c$ ) e intersecção com o eixo dos  $yy$  ( $b$ ) das rectas de ruído obtidas com os três LEDs de calibração em cada um dos canais de detecção.

CO (nm)	Parâmetro	FD1	FD2	FD3
630	$d_c$	$-6,90 \times 10^{-5}$	$-6,75 \times 10^{-5}$	$-6,72 \times 10^{-5}$
	$b$	$0,162 \times 10^{-3}$	$0,169 \times 10^{-3}$	$0,163 \times 10^{-3}$
780	$d_c$	$-6,86 \times 10^{-5}$	$-6,80 \times 10^{-5}$	$-6,57 \times 10^{-5}$
	$b$	$0,136 \times 10^{-3}$	$0,120 \times 10^{-3}$	$0,141 \times 10^{-3}$
830	$d_c$	$-6,86 \times 10^{-5}$	$-6,67 \times 10^{-5}$	$-6,73 \times 10^{-5}$
	$b$	$0,157 \times 10^{-3}$	$0,165 \times 10^{-3}$	$0,162 \times 10^{-3}$

Os degraus obtidos com o protótipo durante a calibração estão representados na figura 5.12 (a), onde se podem ver os pares de sinais obtidos em cada fotodetector. O nível de intensidade de cada par diverge com o aumento da tensão devido a falhas de alinhamento entre cada fotodetector bi-celular e o respectivo LED. Para além disso, diferentes níveis de intensidade foram detectados com os diferentes fotodetectores para a mesma luz LED porque há perda de luz pelas fibras ópticas de recepção presentes na sonda (nota: é preciso ter em conta que a sonda está acoplada aos conectores dos canais de detecção durante a calibração). Apesar destas diferenças as curvas de ruído obtidas são semelhantes.

As curvas de ruído obtidas com o LED de 830 nm, estão apresentadas na figura 5.12 (b). O coeficiente de determinação,  $R^2$  é igual a 0,993; 0,996 e 0,980, para a FD1, FD2 e FD3, respectivamente.

A perfusão obtida na solução padrão de motilidade, depois do cálculo da constante  $M$ , pode ser vista na figura 5.13. O gráfico apresentado na figura 5.13, detalhe (a), apresenta a perfusão obtida com o CO635, onde foram obtidos valores médios de perfusão iguais a  $250,3 \pm 5,5$ ;  $250,2 \pm 5,5$  e  $250,4 \pm 6,3$  UP (perfusão média  $\pm$  desvio padrão) para DF0.14, DF0.25 e DF1.20, respectivamente.

Para o CO785 os valores médios de perfusão obtidos foram de  $250,6 \pm 6,8$ ;  $250,5 \pm 6,1$  e  $250,4 \pm 6,0$  UP para DF0.14, DF0.25 e DF1.20, respectivamente. Finalmente, para o CO830 os valores médios de perfusão obtidos foram de  $250,5 \pm 6,6$ ;  $250,3 \pm 6,2$  e  $250,2 \pm 4,7$  UP para DF0.14, DF0.25 e DF1.20, respectivamente. Estes resultados estão na gama dos valores obtidos com os fluxómetros da Perimed® que podem ser de  $250 \pm 15$  UP [33]. No gráfico representado na figura 5.13, detalhe (b), pode ver-se a

perfusão obtida com o PF5000, onde foram obtidos os valores médios de  $245,7 \pm 5,6$ ;  $246,1 \pm 5,9$  e  $251,0 \pm 5,7$  UP para DF0.14, DF0.25 e DF1.20, respectivamente.

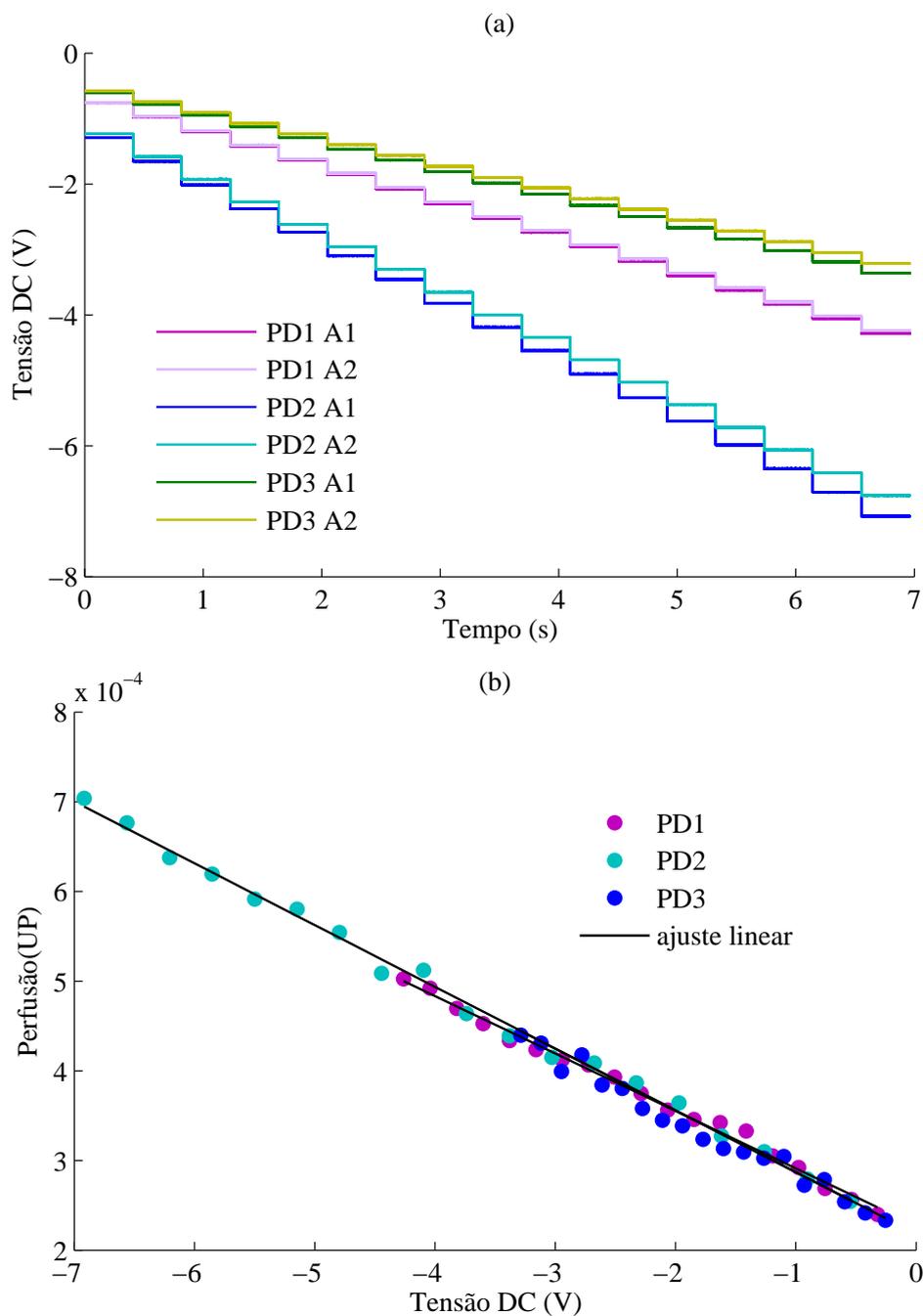


FIGURA 5.12: Determinação da recta de ruído: (a) resposta em tensão dos três fotodetectores quando excitados com níveis crescentes de intensidade de luz, onde A1 e A2 representam as duas áreas foto-sensíveis do fotodetector bi-celular; e (b) recta de ruído de cada fotodetector.

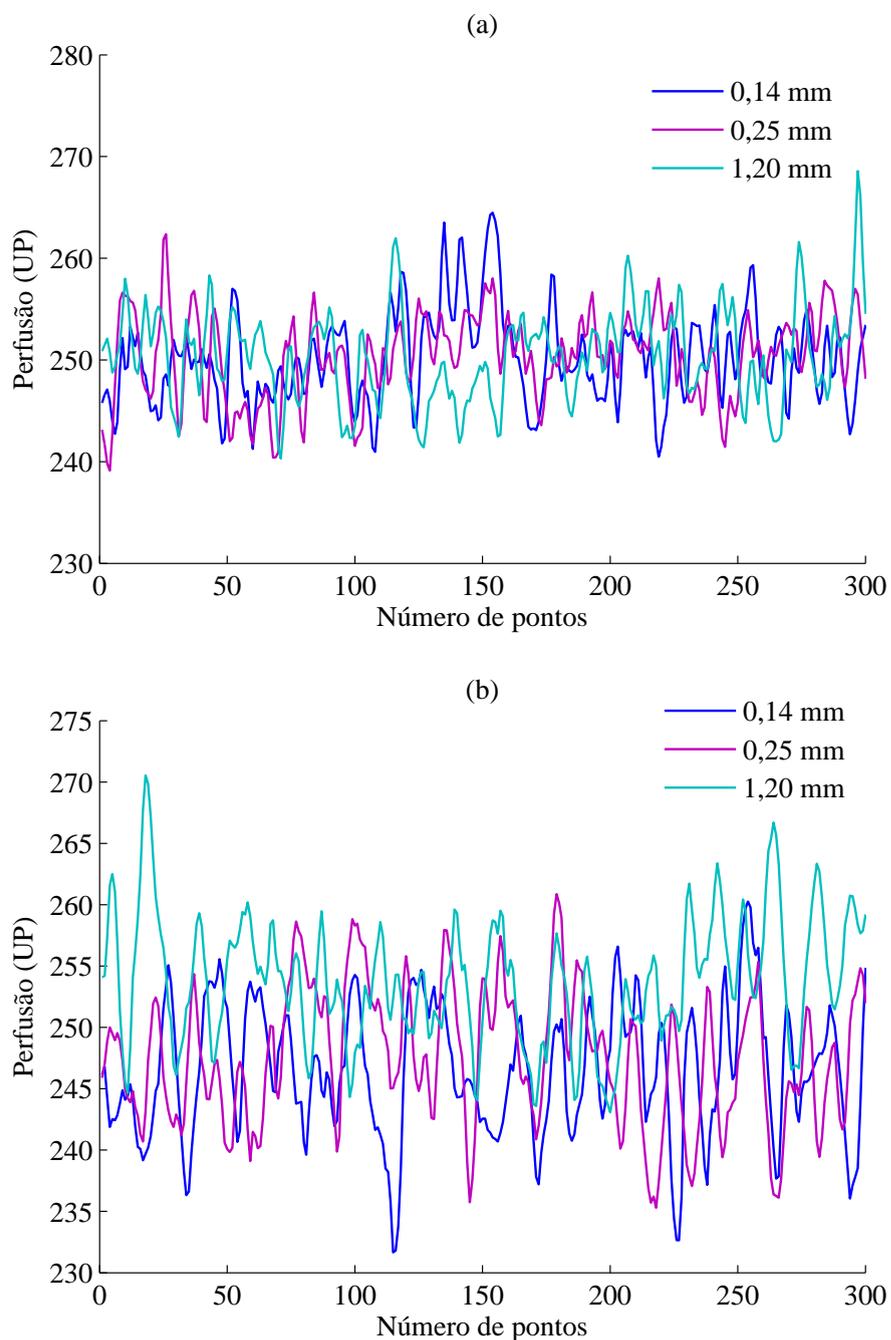


FIGURA 5.13: Perfusão obtida na solução padrão de motilidade depois da calibração para: (a) o díodo laser de 635 nm; e (b) o PF5000, nos três canais de detecção.

A perfusão obtida no disco de calibração, depois de calculados todos os parâmetros de calibração, pode ser vista na figura 5.14. No gráfico representado na figura 5.14, detalhe (a), pode ver-se a perfusão obtida para o CO830, onde foram obtidos os valores médios de  $3,3 \pm 0,2$ ;  $3,3 \pm 0,3$  e  $1,4 \pm 0,2$  UP para DF0.14, DF0.25 e DF1.20, respectivamente. Para o CO635, os valores médios obtidos foram de  $8,9 \pm 1,9$ ;  $1,5 \pm 0,7$  e  $8,4 \pm 1,6$  UP

para DF0.14, DF0.25 e DF1.20. Finalmente, para o CO785 os valores médios de perfusão obtidos foram de  $3,8 \pm 0,2$ ;  $2,4 \pm 0,1$  e  $0,8 \pm 0,1$  UP para DF0.14, DF0.25 e DF1.20. No gráfico representado na figura 5.14, detalhe (b), pode ver-se a perfusão obtida no zero da calibração com o PF5000. Os valores médios obtidos foram de  $0,7 \pm 1,4$ ;  $4,2 \pm 2,7$  and  $1,4 \pm 1,1$  UP para DF0.14; DF0.25 e DF1.20, respectivamente.

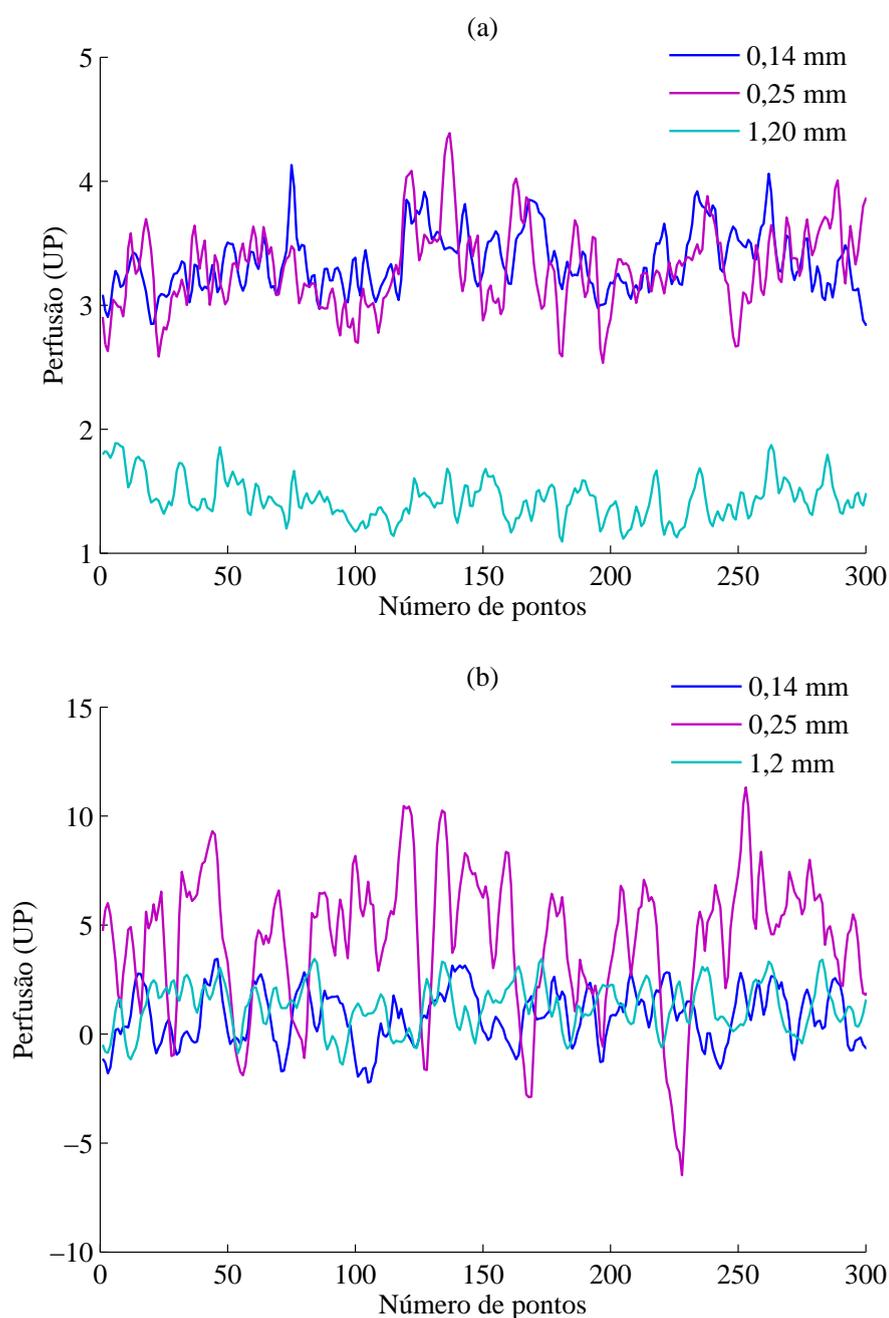


FIGURA 5.14: Perfusão obtida no disco de Delrin<sup>®</sup>, depois da calibração, para: (a) o diódo laser de 830 nm; e (b) o PF5000, nos três canais de detecção.

As rotinas de calibração baseadas no movimento browniano de microsferas brancas em solução aquosa tem vários inconvenientes, nomeadamente, o volume e forma das microsferas ser diferente do volume e forma dos glóbulos vermelhos. Adicionalmente, nesta solução não existem dispersores estáticos o que promove a dispersão múltipla, responsável pela componente homodínica do sinal [3]. Apesar destas limitações a solução padrão de motilidade permite a comparação de sinais de perfusão obtidos com fibras receptoras a diferentes distâncias da fibra emissora [3]. O mesmo não pode ser assumido, quando diferentes comprimentos de onda são comparados uma vez que os cromóforos da pele tem diferentes propriedades ópticas para os diferentes comprimentos de onda, e portanto, vão desviar-se da reflectância da solução padrão. Por isso testes dinâmicos são os mais apropriados quando se trata da comparação de sinais de perfusão obtidos com diferentes comprimentos de onda. Para além disso, testes dinâmicos e comparações relativas permitem que o desvio de 7 UP/°C, para temperaturas diferentes de 22 °C, não afectem as conclusões.

## 5.5 Estudos *in vitro*

A linearidade da resposta do protótipo foi estudada *in vitro* em dois modelos físicos (fantomas). Um dos fantomas é constituído por micro-tubo de teflon® e o outro por placas de acrílico. Os fantomas foram construídos com o objectivo de avaliar a resposta do protótipo não-invasivo a variações de velocidade e concentração de dispersores a diferentes profundidades, imitando aquilo que acontece na pele [111].

Como fluido dispersor, optou-se por leite magro de uma determinada marca. O leite contém várias componentes dispersoras, nomeadamente hidratos de carbono, gordura e proteínas. Para além disso, o leite não sedimenta, como acontece com as soluções aquosas de microsferas e tem um comportamento semelhante às soluções intra-lipídicas [112]. Outra vantagem, é de que o leite é mais fácil de ser manuseado do que o sangue. Por outro lado, o leite é instável, e por isso, a mesma solução é utilizada apenas durante um dia. Outros estudos publicados [113] também utilizaram como fluido dispersor leite em vez de sangue.

- Fantoma de teflon®

O fantoma, representado esquematicamente na figura 5.15, consiste num micro-tubo de teflon® enrolado em torno de uma peça de alumínio perfazendo um total de seis camadas. O micro-tubo utilizado tem 0,76 e 0,30 mm de diâmetro externo e interno, respectivamente. O fluido dispersor é injectado no micro-tubo com uma seringa motorizada com velocidades constantes de 1,56; 3,12; 4,68; 6,25; 7,78 e 9,35 mm/s.

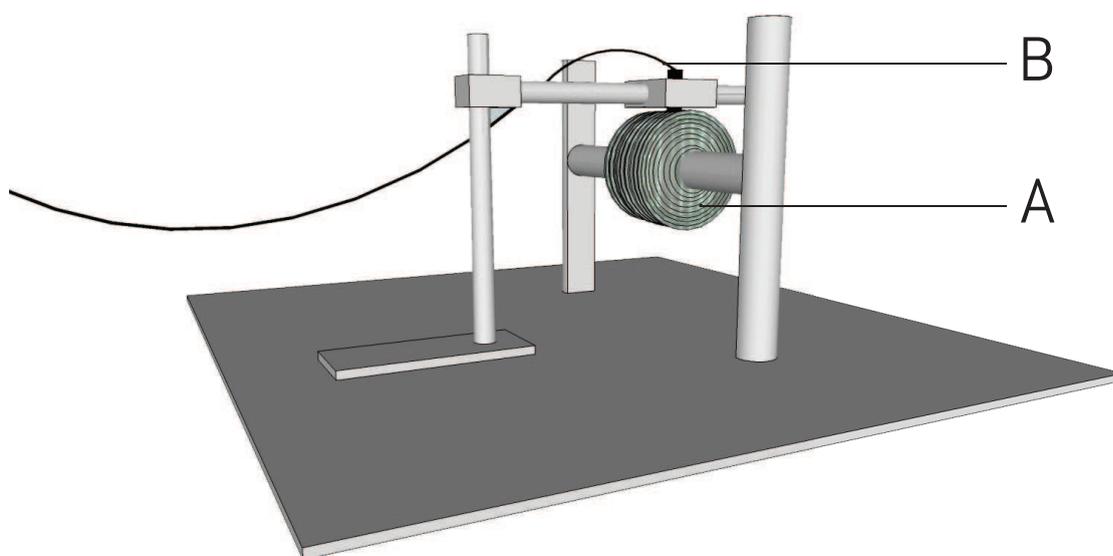


FIGURA 5.15: Esquemático do fantoma constituído por um micro-tubo de teflon® enrolado em torno de uma peça de alumínio onde se podem ver: A o micro-tubo de teflon®; e B a sonda laser Doppler.

- Fantoma de acrílico

O fantoma de acrílico é constituído por duas placas de acrílico coladas com uma depressão interior de  $5 \times 4 \text{ mm}^2$  (ver figura 5.16). Este fantoma foi construído de modo a ultrapassar as dificuldades encontradas no posicionamento da sonda na superfície do fantoma de teflon®. O leite foi injectado no fantoma com uma seringa motorizada, com as velocidades de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 mm/s.

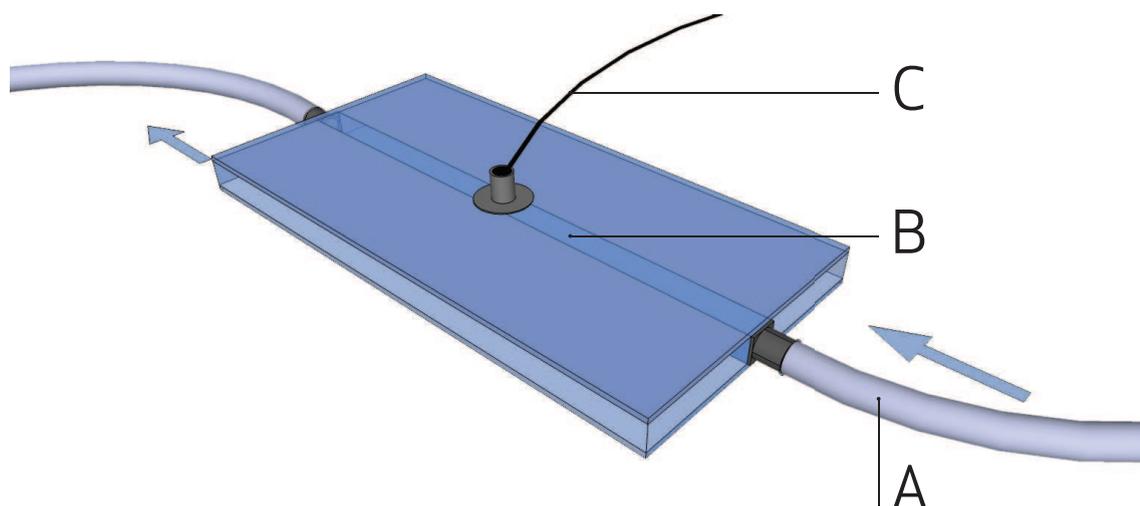


FIGURA 5.16: Esquemático do fantoma de acrílico onde se podem ver: *A* o tubo de látex; *B* o canal de passagem do fluido dispersor (5x4 mm); e *C* a sonda.

## 5.5.1 Simulações Monte Carlo

### 5.5.1.1 Descrição

O modelo simulado, que pretende modelar o fantoma de teflon<sup>®</sup>, está organizado em 3 camadas principais como se pode ver na figura 5.17. A camada mais superficial (detalhe a) da figura 5.17) é composta por um conjunto de objectos equivalentes às seis camadas de micro-tubo e tem uma profundidade total de 5 mm. As camadas mais profundas modelam a peça de alumínio e têm uma espessura de 0,1 mm cada uma: a primeira camada [detalhe b) da figura 5.17] simula um dispersor isotrópico semi-esférico e a segunda camada [detalhe c) da figura 5.17] é uma camada totalmente reflectora. A luz laser é injectada na superfície do modelo sob a forma de feixe focado [detalhe d) da figura 5.17].

As simulações foram realizadas apenas para o comprimento de onda de 635 nm, devido à falta de informação acerca das propriedades ópticas do leite e do teflon<sup>®</sup> para os outros comprimentos de onda presentes no protótipo. Foram simuladas fibras detectoras localizadas a: 0,00; 0,14; 0,25 e 1,20 mm da fibra emissora, que serão referenciadas como DF0.00, DF0.14, DF0.25 e DF1.20. A distância entre as fibras emissora e detectora de 0,00 mm representa a detecção *self-mixing*, que apesar de não ter sido implementada no protótipo pelos motivos já referidos, foi considerada nas simulações Monte Carlo [94]. As propriedades ópticas ( $n$ ,  $\mu_a$ ,  $\mu'_s$ ,  $\mu_s$ ,  $g$ ) do leite e do micro-tubo estão sumariadas na tabela 5.6 [96, 112, 114]. A função de fase de Henyey-Greenstein, apresentada na equação

4.21, foi utilizada para modelar o micro-tubo e o leite, com  $g = 0,90$ ; e a função de fase isotrópica, apresentada na equação 4.43, foi utilizada para modelar a peça metálica.

TABELA 5.6: Propriedades ópticas do leite e do teflon® para o comprimento de onda de 635 nm.

	$n$	$\mu_a$ ( $mm^{-1}$ )	$\mu'_s$ ( $mm^{-1}$ )	$\mu_s$ ( $mm^{-1}$ )	$g$
Leite	1,346	0,00052	5,2	52	0,9
Teflon®	1,367	0,001	16,7	167	0,9

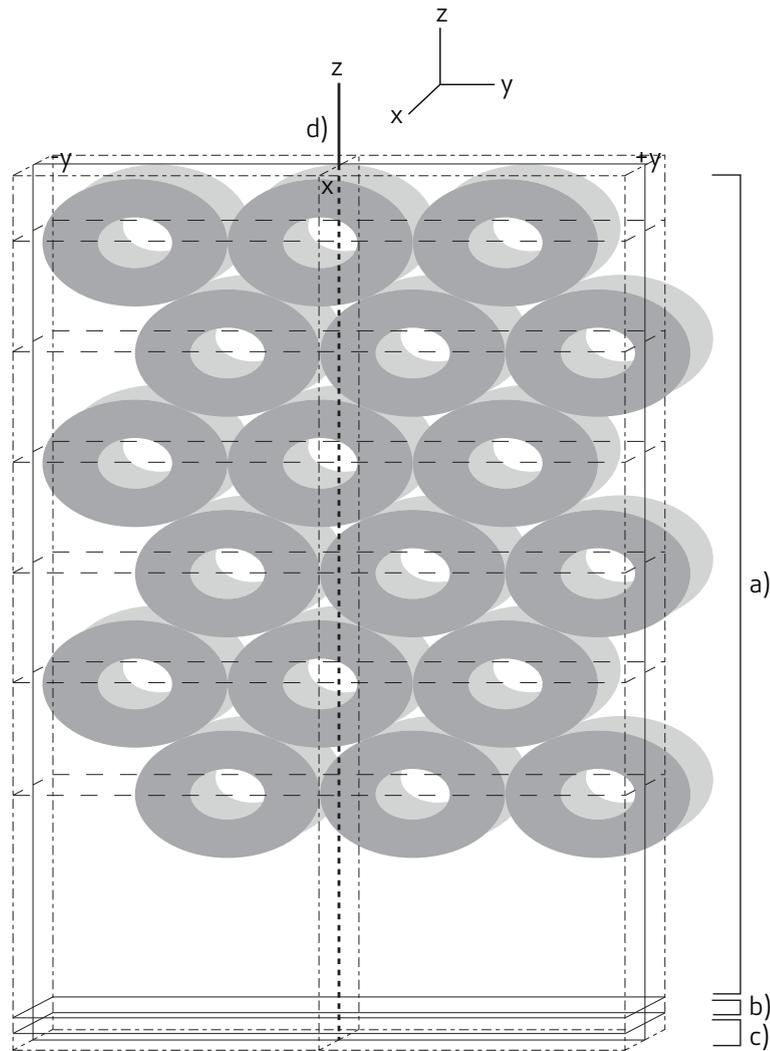


FIGURA 5.17: Modelo simulado, equivalente ao fantoma de teflon® construído, constituído por 3 camadas: a) a camada superficial, constituída por micro-tubos preenchidos com leite magro; e b) e c) as camadas mais internas, que modelam a placa de alumínio. d) representa o feixe laser.

As simulações foram realizadas para as 6 velocidades já mencionadas, para o leite e para duas soluções aquosas com 25% (S25%) e 50% (S50%) de leite, e para as quatro

distâncias entre fibras emissora e receptora, o que resultou num total de 72 simulações com 5.000.000 fótons detectados em cada simulação.

### 5.5.1.2 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com o modelo simulado, nomeadamente a profundidade média dos fótons que sofreram desvio Doppler, a percentagem de fótons que sofreram desvio Doppler e o número médio de dispersões Doppler sofridas por cada fóton, para a velocidade de 1,56 mm/s; estão apresentados na tabela 5.7.

TABELA 5.7: Profundidade média dos fótons que sofreram desvio Doppler, percentagem de fótons que sofreram dispersão Doppler e número médio de dispersões Doppler por fóton quando é injectado leite no micro-tubo com 1,56 mm/s de velocidade.

Solução	DF (mm)	<Profundidade> (mm)	Percentagem Doppler (%)	<Dispersão Doppler>
25%	0,00	0,36	4,77	3,48
	0,14	0,41	26,00	4,29
	0,25	0,43	41,23	4,37
	1,20	0,56	82,00	6,47
50%	0,00	0,34	6,73	5,85
	0,14	0,39	32,35	7,30
	0,25	0,40	47,76	7,78
	1,20	0,55	86,00	12,65
Leite	0,00	0,32	10,27	10,08
	0,14	0,35	41,26	12,66
	0,25	0,37	56,45	14,27
	1,20	0,53	87,47	26,63

A distância entre as fibras emissora e receptora influencia as medições de tal modo que com separações maiores são detectados fótons que atravessaram um maior volume de tecido. Portanto, aumentando a distância entre fibras, os fótons viajam até zonas mais profundas do meio dispersor, aumentando a profundidade média dos fótons que sofreram desvio Doppler. Simulações realizadas em estudos anteriores [31, 34] estão de acordo com estes resultados. A percentagem de fótons detectados que sofreram desvio Doppler e a

média de eventos Doppler por fotão também aumentam com o aumento da distância entre as fibras para cada velocidade, uma vez que o aumento do volume amostrado traduz-se no aumento da probabilidade de os fotões encontrarem um ou mais glóbulo vermelho em movimento.

A concentração de leite também influencia a profundidade média amostrada, pois esta decresce com o aumento da concentração de leite. Pelo contrário, a percentagem de fotões detectados que sofrem desvio Doppler e a quantidade de desvios Doppler por fotão aumentam quando a concentração de leite aumenta. Quanto maior a concentração de leite, maior o número de dispersores presentes no mesmo volume do modelo simulado, e conseqüentemente, a profundidade atingida pelos fotões é menor, e o número de fotões que sofrem desvio Doppler e a quantidade de desvios Doppler por fotão é maior.

Os resultados obtidos para todas as velocidades estão apresentados no apêndice A nas tabelas A.1, A.2 e A.3. Resultados semelhantes foram obtidos para todas as velocidades no que diz respeito à profundidade média dos eventos Doppler por fotão, à percentagem de fotões desviados que foram detectados e ao número de eventos de dispersão Doppler por fotão, pois estes parâmetros são independentes da velocidade dos dispersores.

O momento de ordem um (M1) do espectro de potência Doppler também foi avaliado. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 5.8, onde se pode ver que M1 aumenta, de modo geral, com a concentração de leite. Isto está de acordo com os conceitos teóricos, uma vez que M1 é proporcional ao produto da velocidade média e da concentração dos dispersores em movimento. No entanto, para alguns casos M1 não aumenta com a velocidade, especialmente para as duas velocidades mais elevadas quando são detectados fotões a 1,20 mm da fibra emissora. Particularmente, na figura 5.18 pode ver-se o efeito do aumento da distância entre as fibras emissora e receptora no M1, para todas as velocidades simuladas e para a concentração de 25% de leite. Pode ver-se claramente que M1 aumenta com o aumento da distância entre fibras e com o aumento da velocidade dos dispersores.

TABELA 5.8: Momento de ordem um do espectro de potência Doppler (M1) obtido no modelo simulado, para as concentrações e velocidades de fluido dispersor, e para as diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora simuladas.

DF (mm)	Velocidade (mm/s)	leite (Hz)	50% (Hz)	25% (Hz)
0,00	1,56	$1,79 \times 10^{20}$	$1,09 \times 10^{20}$	$6,26 \times 10^{19}$
	3,12	$3,55 \times 10^{20}$	$2,16 \times 10^{20}$	$1,20 \times 10^{20}$
	4,68	$4,93 \times 10^{20}$	$3,13 \times 10^{20}$	$1,76 \times 10^{20}$
	6,25	$6,13 \times 10^{20}$	$3,77 \times 10^{20}$	$2,21 \times 10^{20}$
	7,78	$6,54 \times 10^{20}$	$4,13 \times 10^{20}$	$2,56 \times 10^{20}$
	9,35	$6,71 \times 10^{20}$	$4,18 \times 10^{20}$	$2,72 \times 10^{20}$
0,14	1,56	$7,08 \times 10^{20}$	$5,35 \times 10^{20}$	$3,52 \times 10^{20}$
	3,12	$1,39 \times 10^{21}$	$1,01 \times 10^{21}$	$6,75 \times 10^{20}$
	4,68	$1,95 \times 10^{21}$	$1,44 \times 10^{21}$	$9,74 \times 10^{20}$
	6,25	$2,28 \times 10^{21}$	$1,70 \times 10^{21}$	$1,18 \times 10^{21}$
	7,78	$2,41 \times 10^{21}$	$1,85 \times 10^{21}$	$1,31 \times 10^{21}$
	9,35	$2,45 \times 10^{21}$	$1,91 \times 10^{21}$	$1,39 \times 10^{21}$
0,25	1,56	$9,68 \times 10^{20}$	$7,65 \times 10^{20}$	$5,20 \times 10^{20}$
	3,12	$1,87 \times 10^{21}$	$1,44 \times 10^{21}$	$9,90 \times 10^{20}$
	4,68	$2,58 \times 10^{21}$	$2,02 \times 10^{21}$	$1,43 \times 10^{21}$
	6,25	$2,99 \times 10^{21}$	$2,38 \times 10^{21}$	$1,74 \times 10^{21}$
	7,78	$3,11 \times 10^{21}$	$2,55 \times 10^{21}$	$1,92 \times 10^{21}$
	9,35	$3,13 \times 10^{21}$	$2,61 \times 10^{21}$	$2,03 \times 10^{21}$
1,2	1,56	$1,87 \times 10^{21}$	$1,51 \times 10^{21}$	$1,10 \times 10^{21}$
	3,12	$3,29 \times 10^{21}$	$3,70 \times 10^{21}$	$2,02 \times 10^{21}$
	4,68	$4,05 \times 10^{21}$	$3,53 \times 10^{21}$	$2,77 \times 10^{21}$
	6,25	$4,20 \times 10^{21}$	$3,89 \times 10^{21}$	$3,23 \times 10^{21}$
	7,78	$4,06 \times 10^{21}$	$3,94 \times 10^{21}$	$3,44 \times 10^{21}$
	9,35	$3,78 \times 10^{21}$	$3,80 \times 10^{21}$	$3,54 \times 10^{21}$

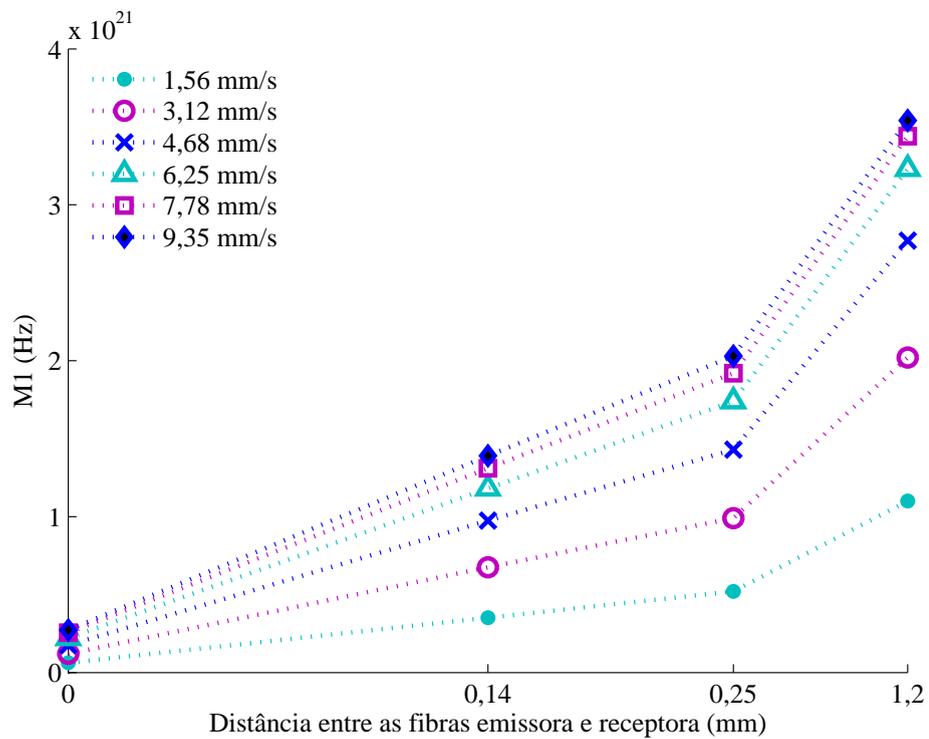


FIGURA 5.18: M1 vs. distância entre as fibras emissora e receptora, obtidos no modelo simulado para uma solução aquosa com 25% de leite para as velocidades de: 1,56; 3,12; 4,68; 6,25; 7,78 e 9,35 mm/s.

As trajetórias percorridas pelos fótons podem ser seguidas no software Monte Carlo durante as simulações. Nas figuras 5.19 e 5.20 podem ser vistas as trajetórias percorridas por 25 e 13128 fótons que foram injectados no modelo, respectivamente. Na figura 5.20 podem ver-se claramente as três camadas que constituem o modelo simulado.

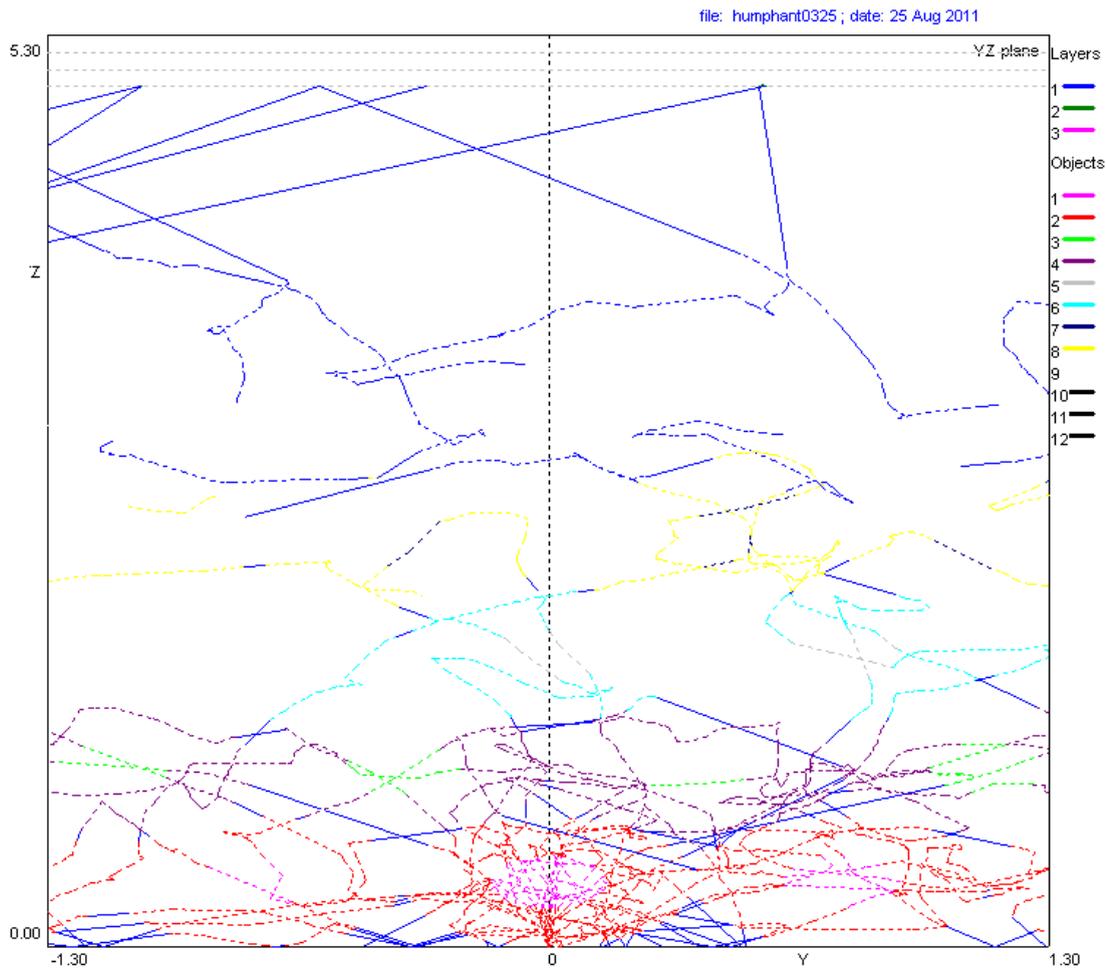


FIGURA 5.19: Trajetórias percorridas por 25 fótons que foram injectados no modelo simulado.

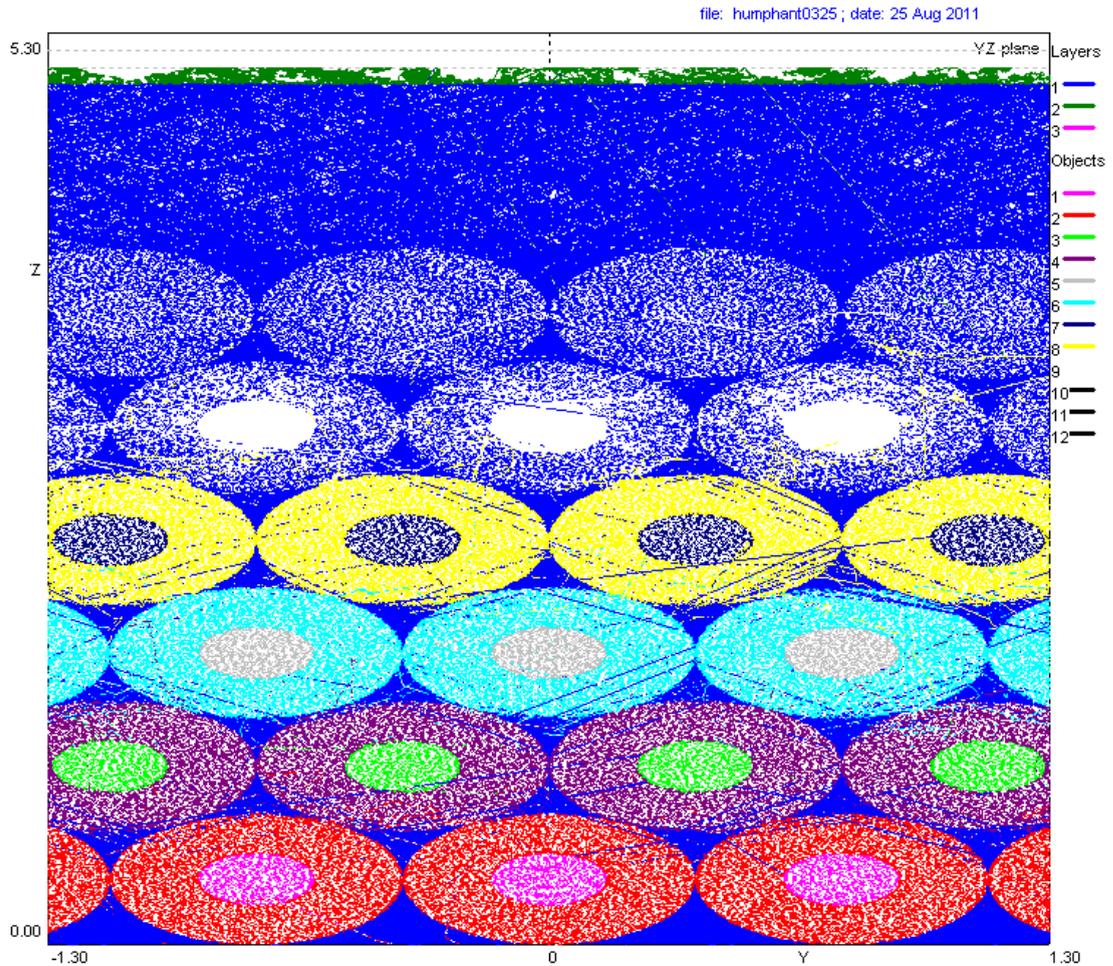


FIGURA 5.20: Trajectórias percorridas por 13128 fótons que foram injectados no modelo simulado.

O número médio de trajectórias percorridas por cada fóton e a respectiva profundidade média foram calculados. O comprimento médio das trajectórias percorridas por cada fóton também foi analisado. Por trajectória entende-se o caminho percorrido pelo fóton entre dois eventos de dispersão, reflexão ou refacção. Os resultados obtidos para 1,56 mm/s estão apresentados na tabela 5.9. Os resultados foram semelhantes para todas as velocidades pois os parâmetros avaliados são independentes da velocidade a que se movimentam os dispersores (consultar apêndice A tabelas A.4, A.5 e A.6).

No que diz respeito à variação do número de trajectórias percorridas com a concentração de dispersores não foi encontrada uma tendência clara. No entanto, o número médio de trajectórias percorridas por cada fóton aumenta com a distância entre as fibras emissora e receptora, uma vez que, uma distância grande entre fibras permite a monitorização de um volume maior do meio dispersor e portanto, há uma maior probabilidade de os

fotões encontrarem um ou mais glóbulo vermelho em movimento. A profundidade média atingida e o comprimento médio das trajetórias percorridas por fotão são maiores para a fibra DF0.00, e são menores para DF0.14 e DF0.25. A origem desta não linearidade está por clarificar.

TABELA 5.9: Número médio, profundidade média e comprimento médio das trajetórias percorridos por cada fotão, para diferentes concentrações de leite e distâncias entre fibras emissora e receptora simuladas, para a velocidade de 1,56 mm/s .

Concentração de leite	DF	<Nº de Trajectórias>	<Profundidade> (mm)	<Comprimento> (mm)
S25%	0,00	3,31	1,45	10,66
	0,14	7,00	0,23	2,53
	0,25	9,66	0,23	2,55
	1,20	25,67	0,47	5,95
S50%	0,00	3,37	1,41	10,74
	0,14	7,06	0,24	2,58
	0,25	9,51	0,22	2,45
	1,20	25,91	0,47	6,07
Leite	0,00	3,49	1,41	10,43
	0,14	7,04	0,22	2,53
	0,25	9,53	0,21	2,43
	1,20	27,67	0,45	6,24

## 5.5.2 Validação

### 5.5.2.1 Protocolo de aquisição

As medições foram feitas com leite e duas soluções aquosas com 50 e 25% de leite nos dois fantasmas descritos, com a sonda da Perimed® posicionada de forma perpendicular ao fantoma. A aquisição durou 10 minutos para cada concentração e velocidade de dispersores. Para a análise dos resultados foi considerada a média de segmentos de sinal de perfusão com 3 minutos de duração, e a linearidade da variação da perfusão com a variação da velocidade dos dispersores foi estudada. O mesmo protocolo foi executado com o PF5000 e com os três comprimentos de onda do protótipo desenvolvido.

### 5.5.2.2 Resultados e discussão

- **Fantoma de teflon®**

Os resultados obtidos com o fantoma de teflon®, nas medições realizadas com o PF5000, e com o CO830, para a solução aquosa com 25% de leite estão apresentados na figura 5.21, detalhes (a) e (b), respectivamente. Todos os resultados obtidos com este fantoma foram apresentados noutra trabalho [115] e podem ser consultados no apêndice B, nas figuras B.1, B.2, B.3, B.4 e na tabela B.1.

De um modo geral, nas medições com o PF5000 (ver figura B.1), a perfusão aumenta com a velocidade do fluido dispersor, com a distância entre as fibras emissora e detectora e com a concentração de dispersores. Para algumas situações limítrofes a perfusão satura (*e.g.* para a velocidade de 6,25 mm/s para a DF1.20) e não aumenta com a concentração (*e.g.* para as velocidades mais baixas para a DF0.25 e a DF1.20, nas soluções aquosas de leite). Na análise da regressão linear foi obtido um bom ajuste entre o modelo linear e os resultados obtidos, pois o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é sempre superior a 0,92 e o valor  $p$  é, de modo geral, inferior a 0,01 (ver tabela B.1).

A perfusão obtida com o C0635, com o CO785 e com o CO830, ver figuras B.2, B.3 e B.4, aumenta com a velocidade dos dispersores, com a distância entre as fibras emisoras e receptoras e com a concentração de dispersores. No que diz respeito aos resultados obtidos com o C0635, a perfusão aumenta com a velocidade dos dispersores para a solução aquosa com 25% de leite. Para as outras concentrações a perfusão satura para as velocidades mais altas. Com este laser não houve uma tendência clara da perfusão com a alteração da concentração da solução de leite. Um bom ajuste entre o modelo linear e os resultados foram obtidos, pois  $R^2 > 0,94$  e o valor  $p$  é inferior a 0,01 excepto para DF1.20 e S50% (ver tabela B.1).

O posicionamento da sonda no topo do fantoma revelou-se difícil devido à curvatura da superfície do fantoma. Isto em conjunto com o pequeno volume de leite dentro dos microtubos, quando comparado com o volume ocupado pela parede do tubo, leva a sub-estimativas e incertezas nas medições da perfusão. Estes factores são a razão para as não linearidades obtidas com o fluxómetro comercial e com o protótipo. No que diz respeito ao protótipo, as dificuldades foram mais difíceis de

ultrapassar devido ao facto de o processamento de sinal em tempo real não estar ainda implementado. Por estas razões um fantoma de acrílico com uma superfície plana foi desenvolvido, facilitando o contacto entre a sonda e o fantoma. Para além disso, o fantoma de acrílico comporta um maior volume de fluido dispersor.

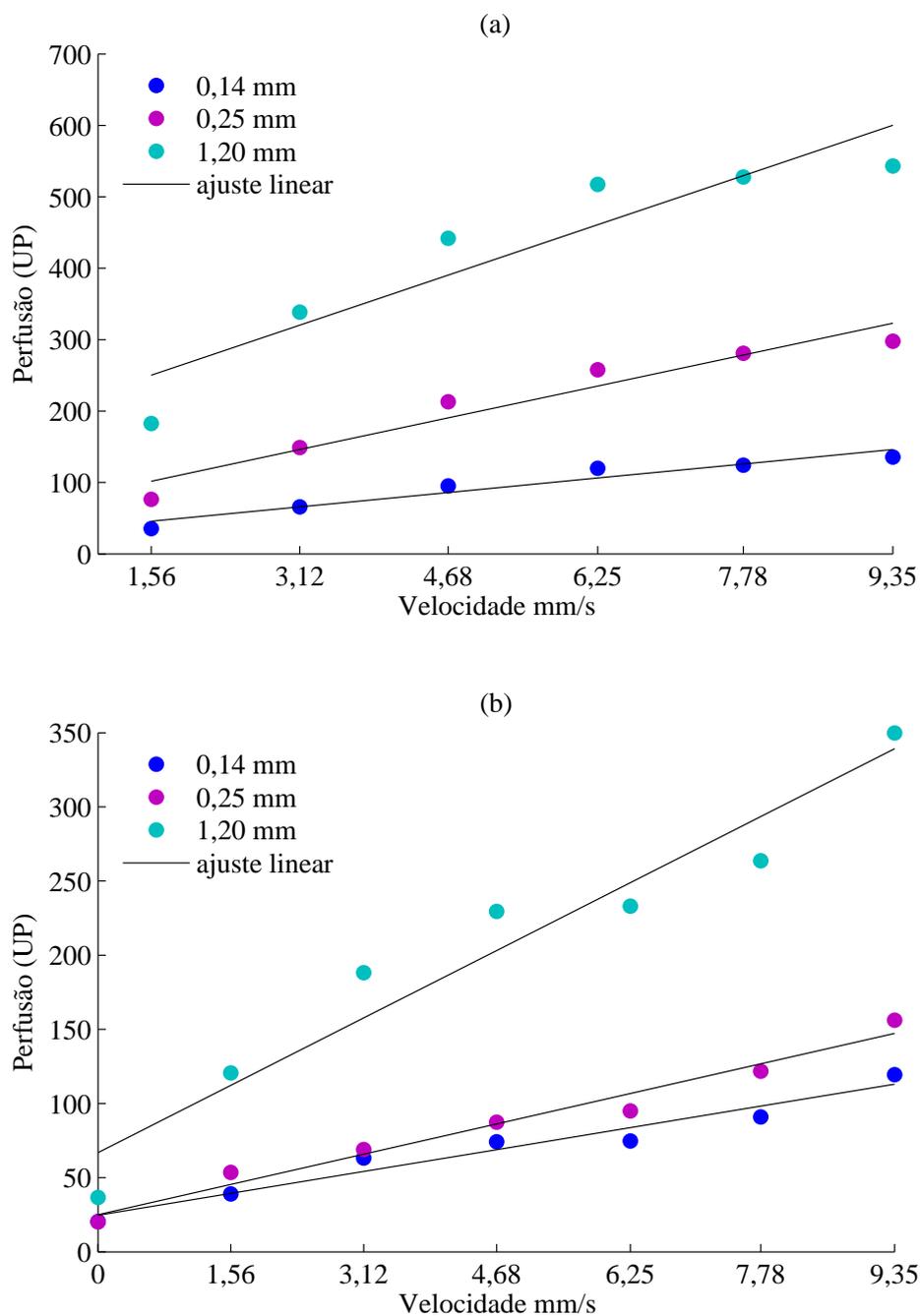


FIGURA 5.21: Perfusão obtida no fantoma de teflon<sup>®</sup> com: (a) o PF5000, e (b) o CO830, para S25% e para as três distâncias entre as fibras colectora e receptora.

- **Fantoma de acrílico**

Na figura 5.22 podem ver-se os resultados obtidos com o PF5000 e com o CO785 para todas as velocidades de dispersores, obtidas com a DF1.20. Todos os resultados obtidos com este fantoma foram apresentados noutro trabalho [115] e podem ser consultados no anexo B, nas figuras B.5, B.6, B.7, B.8 e na tabela B.2.

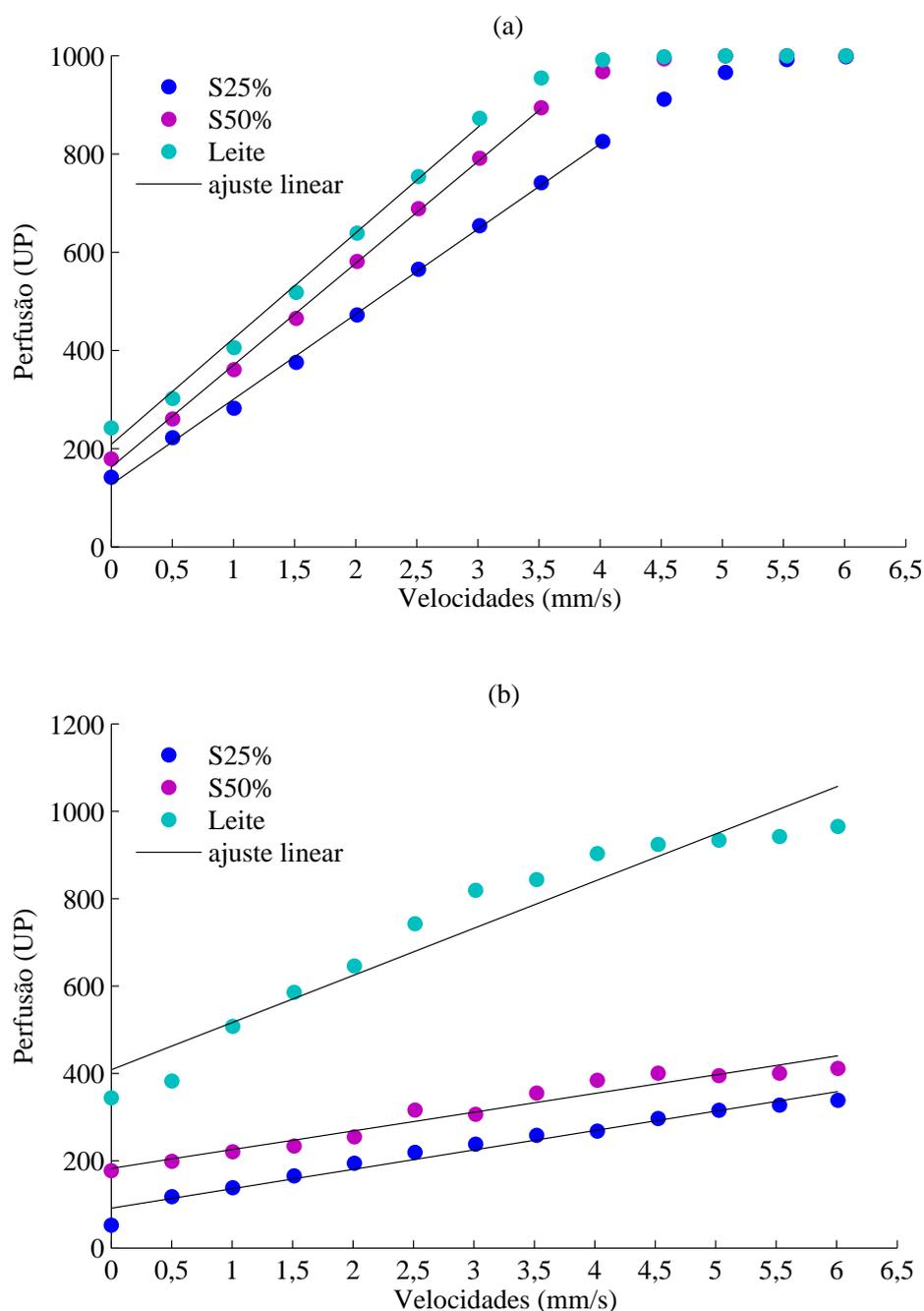


FIGURA 5.22: Perfusão obtida no fantoma de acrílico com: (a) o PF5000, e (b) o CO785, com a DF1.20 para as três soluções testadas.

Nos resultados obtidos com o PF5000, ver figura B.5, a perfusão aumenta com a velocidade e com a concentração dos dispersores, para cada fibra colectora. Para além disso, a perfusão também aumenta com o aumento da distância entre as fibras. Para a DF1.20 (ver detalhe (a) da figura 5.22) a perfusão satura para as velocidades mais altas, sendo que a velocidade em que ocorre a saturação diminui com o aumento da concentração de leite. Uma boa correlação entre o modelo linear e os resultados foram obtidas uma vez que  $R^2 > 0,99$  e o valor  $p$  é sempre inferior a 0,01. Deste modo podemos concluir que a relação entre a perfusão e a velocidade dos dispersores é linear para os parâmetros estudados (ver tabela B.2).

Nos resultados obtidos com o protótipo, ver figuras B.6, B.7 e B.8, a perfusão aumenta com a velocidade e concentração de leite e com a distância entre as fibras emissora e receptora para todos os comprimentos de onda, tal como era esperado. Uma boa correlação entre o modelo linear e os resultados foi obtida uma vez que  $R^2 > 0,94$ ; excepto para DF1.20 e S50%, e DF0.14 e S25% e o valores  $p$  é sempre inferior a 0,001 (ver tabela B.2).

## 5.6 Estudos *in vivo*

Testes *in vivo* foram realizados na pele humana com o protótipo não-invasivo. Numa primeira fase, foi analisada a resposta do protótipo em ambiente de simulação, seguindo-se as medições efectuadas em voluntários saudáveis.

### 5.6.1 Simulações Monte Carlo

#### 5.6.1.1 Descrição

No que diz respeito às simulações efectuadas num modelo de pele humana, foram estudadas as interações de três comprimentos de onda diferentes (635, 785 e 830 nm) num modelo da pele humana. Foram registados fotões emergentes a 0,00; 0,14; 0,25 e 1,20 mm da fibra emissora [94].

Para a modelação da pele humana foi utilizado o modelo apresentado por Fredriksson *et al.* (2008; 2009) [31, 34]. Este modelo é constituído por 6 camadas com diferentes espessuras e com diferentes concentrações de sangue a deslocarem-se com três velocidades diferentes (0,3 mm/s; 3 mm/s e 30 mm/s) (ver tabela 5.10). O fluxo sanguíneo foi

simulado com direcções aleatórias e com uma distribuição parabólica de velocidades. Os glóbulos vermelhos simulados com a velocidade menor estão associados ao fluxo sanguíneo nos capilares, os simulados com a velocidade intermédia representam o fluxo sanguíneo nas vénulas e arteríolas, e os simulados com a velocidade mais alta estão associado ao fluxo sanguíneo nas veias e artérias [31]. Foi utilizado sangue oxigenado com um hematócrito de 42% (os valores normais do hematócrito são: 36-44% para as mulheres e 39-50% para os homens).

TABELA 5.10: Camadas de pele, espessura das camadas de pele e concentração de sangue para as três velocidades presentes em cada camada.

Camada	Espessura (mm)	Concentração de sangue (%)		
		0,3 mm/s	3,0 mm/s	30,0 mm/s
Epiderme	0,075	0,0	0,0	0,0
Derme papilar	0,15	0,2	0,0	0,0
Plexo subpapilar	0,15	0,6	0,05	0,001
Derme reticular	0,80	0,1	0,01	0,0006
Plexo cutâneo	0,40	0,25	0,035	0,006
Tecido subcutâneo	10,00	0,1	0,01	0,001

As propriedades ópticas ( $n$ ,  $\mu_a$ ,  $\mu'_s$ ,  $\mu_s$ ,  $g$ , albedo) para as várias camadas de pele, para o sangue e para a melanina para os três comprimentos de onda simulados, estão sumariadas nas tabelas 5.11 e 5.12. As propriedades ópticas para o C0635 e o CO785 foram baseadas no modelo apresentado por Fredriksson *et al.* [34], enquanto que para o CO830 elas foram baseadas no trabalho de Simpson *et al.* (1998) e Prahl (1999) [96, 116]. Os índices de refração da sonda e do ar foram considerados iguais a 1,58 e a 1, respectivamente.

TABELA 5.11: Propriedades ópticas ( $n$ ,  $\mu_a$  e  $\mu_s$ ) para as seis camadas de pele, para o sangue (hematócrito de 42%) e para a melanina.

Comprimento de onda (mm)	n	$\mu_a$ ( $mm^{-1}$ )			$\mu_s$ ( $mm^{-1}$ )		
		635	785	830	635	785	830
Epiderme	1,4	0,15	0,1	0,0122	32	23	18
Derme papilar	1,4	0,15	0,1	0,0122	20	13	18
Plexo subpapilar	1,4	0,15	0,1	0,0122	20	13	18
Derme reticular	1,4	0,15	0,1	0,0122	20	13	18
Plexo cutâneo	1,4	0,15	0,1	0,0122	20	13	18
Tecido subcutâneo	1,4	0,15	0,1	0,0086	16	13	11
Sangue oxigenado	1,4	0,34	0,5	0,52	237	222	222
Melanina	0	30	15	0	0	0	0

TABELA 5.12: Propriedades ópticas ( $g$  e albedo) para as seis camadas de pele, para o sangue (hematócrito de 42%) e para a melanina.

Comprimento de onda (mm)	g			albedo		
	635	785	830	635	785	830
Epiderme	0,85	0,85	0,9	0,995	0,996	0,999
Derme papilar	0,85	0,85	0,9	0,993	0,992	0,999
Plexo subpapilar	0,85	0,85	0,9	0,993	0,992	0,999
Derme reticular	0,85	0,85	0,9	0,993	0,992	0,999
Plexo cutâneo	0,85	0,85	0,9	0,993	0,992	0,999
Tecido subcutâneo	0,85	0,85	0,9	0,991	0,992	0,999
Sangue oxigenado	0,991	0,991	0,991	0,999	0,998	0,998
Melanina	0	0	0	0	0	0

No que diz respeito à função de fase utilizada, o sangue foi modelado com a função de fase de dispersão de Gegenbauer kernel (ver equação 4.22) e a pele (considerada tecido estático) foi modelada com a função de fase modificada de Henyey-Greenstein (ver equação 4.21) [34]. Os parâmetros da função de fase de dispersão de Gegenbauer kernel podem ser consultados na tabela 5.13

TABELA 5.13: Parâmetros da função de fase de dispersão de Gegenbauer kernel.

Função de fase	$\alpha$	$g_k$		
		635 nm	785 nm	830 nm
Gegenbauer kernel	1	0,95	0,948	0,948

A luz laser foi simulada como um feixe externo de fótons, com o formato *pencil beam*, injectada de forma perpendicular à superfície do modelo e com uma abertura numérica de 0,37. A trajetória percorrida pelos fótons foi armazenada com uma resolução de  $1/\mu'_s$ . Um total de  $3 \times 4$  simulações foram realizadas, sendo que 10.000.000 fótons foram detectados em cada simulação.

### 5.6.1.2 Resultados e Discussão

Histogramas da profundidade média atingida pelos fótons detectados nas simulações Monte Carlo podem ser vistos nas figuras 5.23, 5.24 e 5.25 para o CO635, o CO785 e o CO830, respectivamente, onde se observa que o número de fótons que atingem camadas mais profundas aumenta com o aumento da distância entre fibras e com o aumento do comprimento de onda

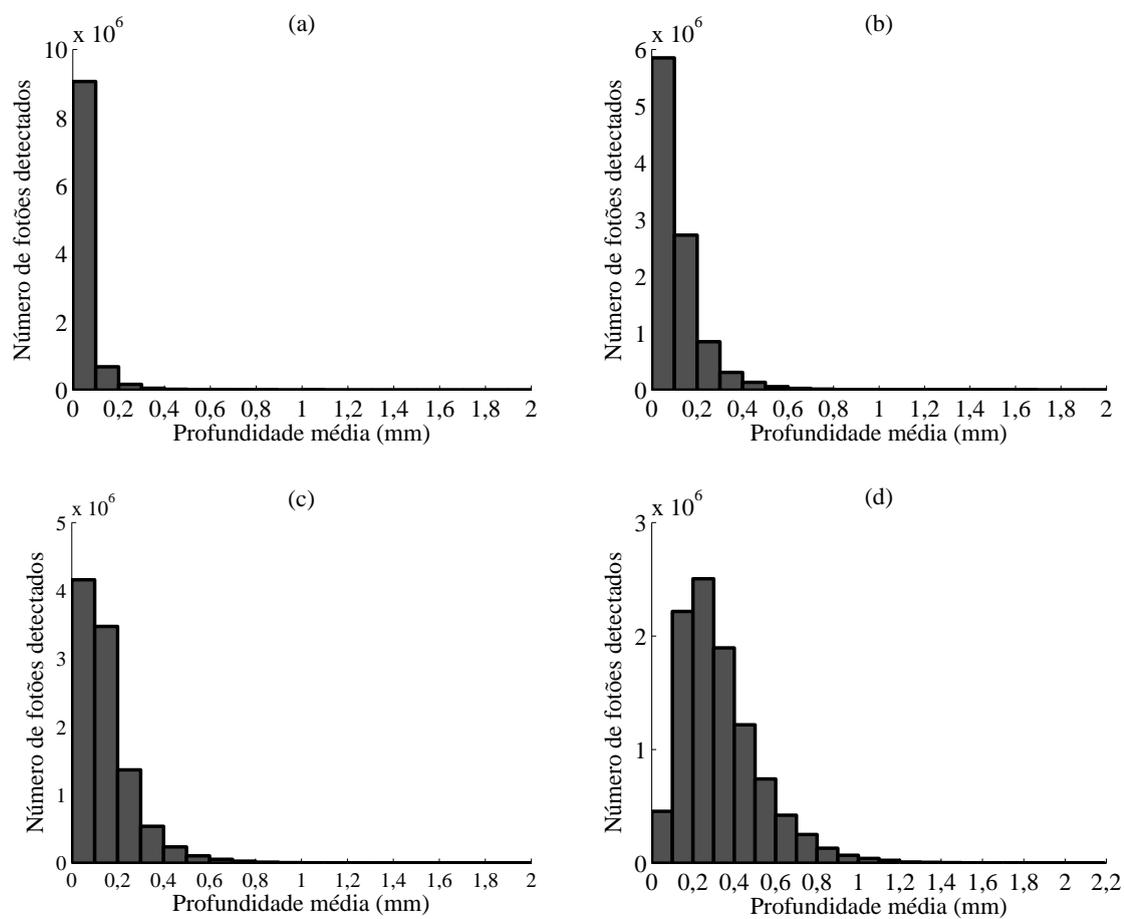


FIGURA 5.23: Histograma da profundidade média atingida pelos fótons detectados nas simulações Monte Carlo, quando o modelo é iluminado com luz laser de 635 nm de comprimento de onda, para as distâncias entre fibras emissora e receptora de: (a) 0,00 mm, (b) 0,14 mm, (c) 0,25 mm, e (d) 1,20 mm.

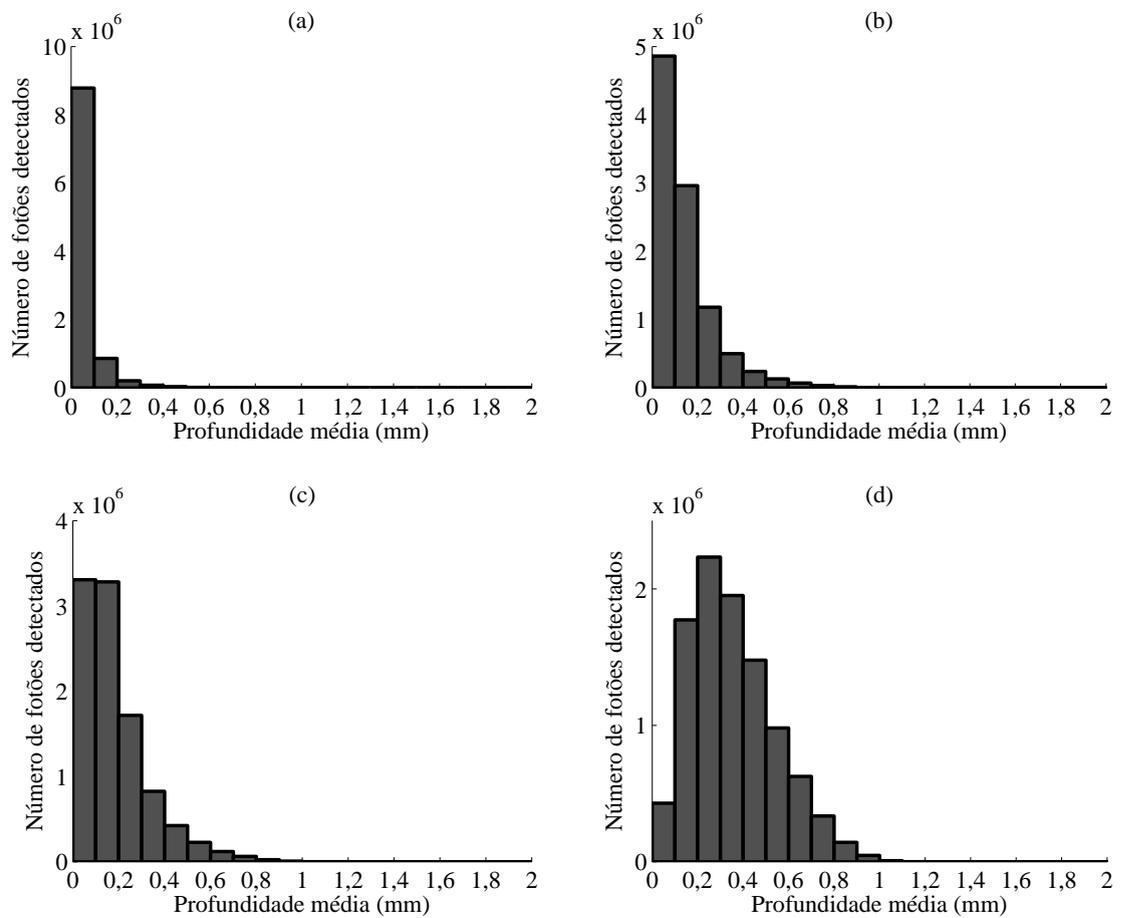


FIGURA 5.24: Histograma da profundidade média atingida pelos fótons detectados nas simulações Monte Carlo, quando o modelo é iluminado com luz laser de 785 nm de comprimento de onda, para as distâncias entre fibras emissora e receptora de: (a) 0,00 mm, (b) 0,14 mm, (c) 0,25 mm, e (d) 1,20 mm.

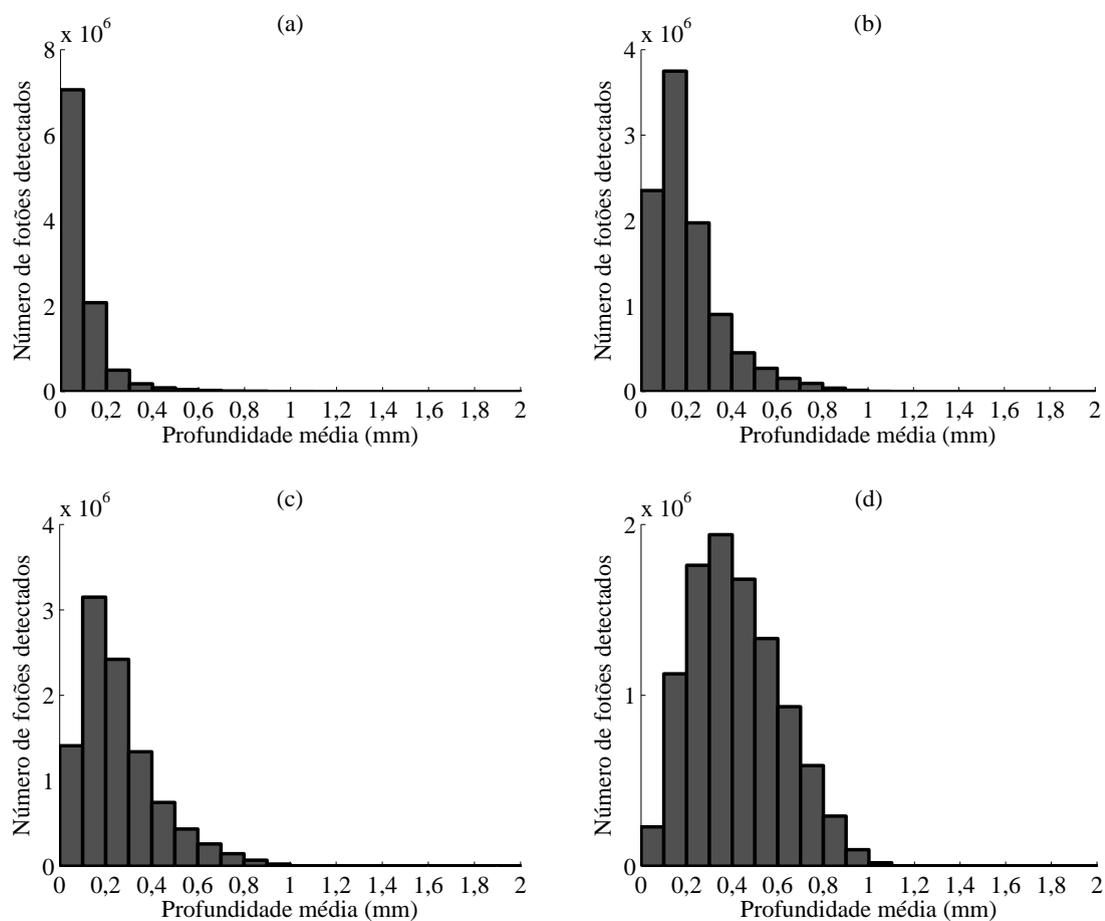


FIGURA 5.25: Histograma da profundidade média atingida pelos fótons detectados nas simulações Monte Carlo, quando o modelo é iluminado com luz laser de 830 nm de comprimento de onda, para as distâncias entre fibras emissora e receptora de: (a) 0,00 mm, (b) 0,14 mm, (c) 0,25 mm, e (d) 1,20 mm.

Os resultados obtidos nas simulações, nomeadamente a profundidade média dos fótons que sofreram desvio Doppler, a percentagem de fótons que sofreram desvio Doppler e o número médio de dispersões Doppler sofridas por cada fóton nas simulações Monte Carlo para o modelo da pele, estão descritos na tabela 5.14.

TABELA 5.14: Profundidade média dos fotões que sofreram desvio Doppler, percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e número médio de dispersões Doppler sofridas por cada fotão nas simulações realizadas no modelo da pele humana.

CO (nm)	DF (mm)	<Profundidade> (mm)	Percentagem Doppler (%)	Nº de dispersões Doppler
635	0,00	0,24	1,94	1,19
	0,14	0,27	9,62	1,23
	0,25	0,28	15,45	1,26
	1,20	0,37	47,70	1,49
785	0,00	0,25	1,97	1,16
	0,14	0,29	10,71	1,22
	0,25	0,30	16,29	1,23
	1,20	0,38	41,89	1,41
830	0,00	0,27	3,54	1,15
	0,14	0,31	14,54	1,23
	0,25	0,33	20,39	1,25
	1,20	0,41	43,45	1,46

A profundidade média dos fotões que sofreram desvio Doppler, a percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e o número médio de dispersões Doppler por fotão aumentam com a distância entre as fibras emissora e receptora, tal como se verificou nas simulações com modelo do fantoma. Isto deve-se ao maior volume de tecido atravessado pelos fotões detectados a distâncias maiores da fibra emissora.

O comprimento de onda também influencia a profundidade média amostrada, uma vez que esta aumenta o comprimento de onda. Isto deve-se ao facto dos coeficientes de absorção e dispersão das diferentes camadas de pele diminuírem com o aumento do comprimento de onda, permitindo que os fotões viagem trajectórias mais extensas. Resultados semelhantes foram obtidos por Fredriksson *et al.* (2009) [34], onde foram obtidas profundidades de medição ligeiramente inferiores, embora com a mesma ordem de grandeza das aqui apresentadas. É de notar que a profundidade média atingida pelos dos fotões que sofreram desvio Doppler nunca atinge a derme reticular ou as camadas localizadas abaixo desta, pois a profundidade média é sempre inferior a 1,175 mm. O plexo subpapilar só é atingido por fotões detectados a 1,20 mm da fibra emissora.

A percentagem de fotões detectados que sofreram desvio Doppler também aumenta com o comprimento de onda, excepto para a DF1.20. Esta não linearidade pode estar relacionada com a percentagem de eventos Doppler sofridos em cada camada pelos fotões detectados (ver tabela 5.15). Como se pode ver a derme reticular é a segunda camada com uma maior percentagem de eventos Doppler para a distância entre fibras emissora e receptora de 1,20 mm, para os comprimentos de onda de 785 e 830 nm. Por outro lado, para as outras distâncias entre fibras a segunda camada com mais eventos Doppler é a derme papilar. Isto indica que há um maior número de fotões detectados com a DF1.20 que atravessaram um maior volume do modelo simulado. Para além disso, a percentagem de eventos Doppler no plexo subcutâneo, para essa mesma distância de detecção, diminui de 635 para 785 nm e aumenta de 785 para 830 nm. Esta camada tem a segunda maior concentração de sangue quando comparada com as outras camadas, o que juntamente com o maior volume de sangue atravessado pelos fotões poderá ser a causa desta não linearidade.

TABELA 5.15: Percentagem de eventos Doppler sofridos, em cada camada de pele, pelos fotões detectados a 0,00; 0,14; 0,25 e 1,20 mm da fibra emissora para os três comprimentos de onda simulados.

CO (nm)	DF (mm)	Camadas da pele					
		Epiderme	Derme papilar	Plexo subpapilar	Derme reticular	Plexo cutâneo	Tecido subcutâneo
635	0,00	0,00	41,07	51,19	7,24	0,50	0,00
	0,14	0,00	35,10	53,23	10,31	1,37	0,17
	0,25	0,00	31,98	55,26	11,10	1,49	0,21
	1,20	0,00	19,43	56,49	19,51	4,08	0,77
785	0,00	0,00	41,73	48,84	8,93	0,51	0,00
	0,14	0,00	30,85	54,86	12,97	1,33	0,00
	0,25	0,00	27,69	56,42	14,38	1,51	0,00
	1,20	0,00	18,81	55,44	22,24	3,51	0,00
830	0,00	0,00	38,76	49,36	10,35	1,54	0,00
	0,14	0,00	26,66	55,91	15,09	2,33	0,00
	0,25	0,00	23,09	57,05	17,27	2,59	0,00
	1,20	0,00	16,57	53,06	25,15	5,21	0,00

Por outro lado, o número médio de dispersões Doppler sofridas por cada fóton não segue nenhuma tendência quando o comprimento de onda da luz incidente aumenta, mas é sempre inferior a 1.5, o que indica que não existe uma grande taxa de dispersão múltipla. Os resultados obtidos nas simulações Monte Carlo revelaram que M1 aumenta com o aumento da distância entre as fibras emissora e detectora, como pode ser visto na tabela 5.16. Isto deve-se ao facto de M1 ser proporcional à concentração e velocidade média dos GVM, e estes dois parâmetros aumentarem com a distância entre as fibras devido ao aumento do volume monitorizado. Quando se analisa o comportamento de M1 obtido para os diferentes comprimentos de onda, pode ver-se que este diminui entre o CO635 e o CO785 e aumenta, entre o CO785 e o CO830. Esta não linearidade pode ser causada pela percentagem de fótons que atingem o plexo e o tecido cutâneo. Esta percentagem é alta para o CO830 nm, intermédia para CO635 e mais baixa para CO785, com a excepção da DF0.00 (ver tabela 5.15). Como o plexo cutâneo é a camada com maior concentração de glóbulos vermelhos a deslocar-se à velocidade mais alta (30 mm/s), os fótons com comprimentos de onda de 635 nm vão sofrer um desvio Doppler maior do que os de 785 nm.

TABELA 5.16: Momento de ordem um do espectro de potência Doppler (M1) obtido no modelo da pele para os comprimentos de onda e distâncias entre fibras emissora e receptora simulados.

CO (mm)	DF (mm)	M1 (Hz)
635	0,00	$3,57 \times 10^{18}$
	0,14	$2,51 \times 10^{19}$
	0,25	$3,71 \times 10^{19}$
	1,20	$1,63 \times 10^{20}$
785	0,00	$3,45 \times 10^{18}$
	0,14	$2,13 \times 10^{19}$
	0,25	$3,23 \times 10^{19}$
	1,20	$1,05 \times 10^{20}$
830	0,00	$5,30 \times 10^{18}$
	0,14	$2,66 \times 10^{19}$
	0,25	$3,93 \times 10^{19}$
	1,20	$1,06 \times 10^{20}$

Na tabela 5.17 estão sumariados os resultados obtidos relativos às trajetórias percorridas por cada fóton no modelo da pele. Pode ser observado que o número médio, a profundidade média e o comprimento médio das trajetórias percorrido por cada fóton aumentam com a distância entre as fibras emissoras e receptoras. Isto acontece porque com o aumento da distância entre fibras um volume maior é monitorizado, o que aumenta a probabilidade dos fótons encontrarem dispersores em movimento. O número de trajetórias percorridas não segue uma tendência geral quando são comparados diferentes comprimento de onda. Por outro lado, a profundidade média das trajetórias percorridas aumenta com o comprimento de onda. Estes resultados estão de acordo com a profundidade média dos eventos Doppler, apresentados na tabela 5.14. O comprimento médio da trajetória percorrida por cada fóton aumenta com o comprimento de onda, excepto para DF1.20. Esta não linearidade pode ser causada pela distribuição da percentagem de eventos Doppler sofridos em cada camada de pele (tabela 5.15), discutida anteriormente quando a percentagem de fótons que sofreram desvio Doppler foi analisada.

TABELA 5.17: Número médio, profundidade média e comprimento médio das trajetórias percorridas pelos fótons no modelo da pele humana simulado.

CO (nm)	DF (mm)	<Nº de trajetórias>	<Profundidade> (mm)	<Comprimento> (mm)
635	0,00	3,16	0,02	0,23
	0,14	6,20	0,08	0,78
	0,25	7,99	0,11	1,16
	1,20	19,77	0,27	4,11
785	0,00	3,08	0,02	0,23
	0,14	5,98	0,09	0,86
	0,25	7,46	0,12	1,26
	1,20	14,71	0,26	3,65
830	0,00	3,77	0,04	0,34
	0,14	6,93	0,12	1,12
	0,25	8,34	0,16	1,57
	1,20	14,86	0,28	4,01

## 5.6.2 Validação

### 5.6.2.1 Protocolo de medição

Medições da perfusão sanguínea cutânea foram realizadas face ventral do braço direito e na palma da mão direita com o objectivo de se compararem os resultados obtidos nestas duas áreas. As regiões referidas apresentam diferenças fisiológicas, principalmente o facto da presença de uma elevada densidade de *shunts* arteriovenosos na palma da mão, contrariamente ao que acontece na região do braço (ver secção 6.1.1).

Na primeira fase foi monitorizada a perfusão sanguínea cutânea em 20 participantes deitados numa marquesa, com o braço posicionado ao nível do coração, com idades médias de  $24,7 \pm 4,2$  anos (idade média  $\pm$  desvio padrão) compreendidas entre os 19 e os 39 anos, sendo que 11 eram mulheres. A pressão arterial média dos participantes, registada antes das medições, foi de  $7,1 \pm 0,8$  mmHg (pressão arterial mínima) e de  $11,4 \pm 1,0$  (pressão arterial máxima), e o índice de massa corporal foi de  $22,1 \pm 2,3$  Kg/m<sup>2</sup>. Todos os participantes eram caucasianos, excepto uma participante.

Na segunda fase foi monitorizada a perfusão sanguínea em duas regiões cutâneas diferentes em 16 participantes deitados numa marquesa, com o braço posicionado ao nível do coração, com idades médias de  $24,3 \pm 4,8$  anos, compreendidas entre os 19 e os 39 anos, sendo que 7 eram mulheres. A pressão arterial média dos participantes, registada antes das medições, foi de  $7,5 \pm 0,6$  mmHg (pressão arterial mínima) e de  $11,5 \pm 1,1$  (pressão arterial máxima), e o índice de massa corporal foi de  $21,6 \pm 2,0$  Kg/m<sup>2</sup>. Todos os participantes eram caucasianos, excepto uma participante.

Todos os participantes eram saudáveis e não fumadores, não tomavam medicação vaso-activa e no dia da medição não beberam bebidas com cafeína.

O protocolo de medição consistiu na monitorização da perfusão sanguínea cutânea durante 33 minutos, sendo que durante a medição foi realizado um teste da oclusão arterial, conhecido como hiperemia reactiva pós-oclusiva (HRPO). Especificamente, nos primeiros 20 minutos foi monitorizada a perfusão em repouso (fluxo basal), seguindo-se o teste da oclusão arterial realizado com uma braçadeira colocada no antebraço, que foi insuflada durante 3 minutos a 200 mmHg, de modo a permitir o registo do zero biológico (ZB) ou hipóxia. A braçadeira foi depois esvaziada, provocando um pico de perfusão (pico da hiperemia reactiva pós-oclusiva - pHRPO) e finalmente a perfusão é monitorizada

durante mais 10 minutos até estabilizar novamente no fluxo basal.

O protocolo foi repetido com o PF5000 e com os três comprimentos de onda presentes no protótipo, com a sonda fixa na pele na mesma posição para todas as medições. A calibração na solução padrão de motilidade foi realizada nos dois fluxómetros antes das medições.

Os dois testes foram efectuados numa sala sem ruído, com uma temperatura que variou entre os 22 e os 25 °C. O Comité de Ética do Centro Cirúrgico de Coimbra aprovou este estudo e foi obtido consentimento por parte dos participantes para a realização das medições, antes das mesmas.

### 5.6.2.2 Protocolo de investigação

Na análise dos resultados foram comparadas as perfusões sanguíneas cutâneas obtidas durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO. No entanto, como diferentes comprimentos de onda e diferentes distâncias entre fibras podem monitorizar diferentes aspectos da microcirculação e tem zeros biológicos diferentes, quantidades relativas também foram avaliadas. Para a análise estatística, foram avaliados valores médios da perfusão sanguínea obtidos em segmentos com 2 minutos de sinal obtidos no fluxo basal e no ZB, para cada participante, para os três comprimentos de onda e PF5000, e para as três distâncias entre fibras emissora e receptora. A perfusão sanguínea cutânea obtida no pHRPO também foi analisada.

Um conjunto de relações foram testadas, nomeadamente a percentagem de abaixamento, definida pela expressão:

$$\%Abaixamento = \frac{\text{linha de base} - ZB}{\text{linha de base}} \times 100, \quad (5.7)$$

e a percentagem de aumento, definida pela expressão:

$$\%Aumento = \frac{pHRPO - \text{linha de base}}{\text{linha de base}} \times 100, \quad (5.8)$$

onde *linhadabase* e *ZB* representam a perfusão sanguínea cutânea média obtida durante o fluxo basal e o ZB respectivamente, e *pHRPO* representa a perfusão obtida no pHRPO.

A fracção de perfusão (FP), definida como:

$$\frac{Perf_{(m,k)}}{Perf_{(j,i)}} \text{ para } \begin{cases} m = \{CO635, CO785, CO830 \text{ e } PF5000\} \\ j = \{CO635, CO785, CO830\} \text{ e } j < m \cup (j = m \cap k > i), \\ k, i = \{DF0.14; DF0.25 \text{ e } DF1.2\} \end{cases}$$

foi avaliada.  $P_{perf}(x, y)$  representa a perfusão obtida com o comprimento de onda ou o PF5000  $x$  e com a distância entre as fibras emissora e receptora  $y$ , durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO. A FP foi utilizada pela primeira vez por Morales [29].

Os tempos de subida e de descida do pHRPO foram também calculados:

$$\text{tempo de subida} = \text{tempo pHRPO} - \text{tempo RO} \text{ e} \quad (5.9)$$

$$\text{tempo de descida} = \text{tempo FB} - \text{tempo pHRPO}, \quad (5.10)$$

onde  $\text{tempo pHRPO}$  representa o instante em que ocorre o pHRPO,  $\text{tempo RO}$  é o momento em que é removida a oclusão e o  $\text{tempo FB}$  é o instante em que a perfusão estabiliza no fluxo basal.

Um teste da normalidade (teste estatístico de Shapiro-Wilk) foi aplicado às perfusões médias obtidas para todos os participantes. Como a maioria dos conjuntos de dados não apresentaram uma distribuição normal os resultados vão ser expressos no formato mediana (1º quartil; 3º quartil). O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para avaliar a diferença estatística entre perfusões obtidas: com diferentes comprimentos de onda ou com o PF5000; com diferentes distâncias entre as fibras emissora e receptora; e em diferentes regiões de pele. A análise foi realizada em SPSS v17.0 (SPSS Inc®, Chicago, IL, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para valores  $p$  inferiores a 0,05.

### 5.6.2.3 Análise no domínio das frequências

Com o objectivo de confirmar a presença das oscilações do fluxo microcirculatório nos sinais de perfusão sanguínea cutânea registados com o protótipo (ver secção 5.6.2.4), foi calculada a transformada de Fourier discreta (FFT) da perfusão recolhida durante o fluxo basal na palma da mão e na face ventral do braço [117]. Foram utilizados segmentos

de sinal de perfusão com 100 s obtidos com as três distâncias de fibras e com os três comprimentos de onda presentes no protótipo.

Para a análise no domínio das frequências, foram considerados sinais de perfusão sanguínea obtidos em 6 participantes, escolhidos entre os 16 voluntários que participaram no teste em que foi monitorizada a perfusão em duas regiões cutâneas distintas [117].

A potência média dos intervalos de frequência presentes nos sinais de perfusão sanguínea medidos durante o fluxo basal foi avaliada. Foram considerados segmentos de perfusão com 300 s aos quais foi aplicado um filtro de média móvel com 200 s com o objectivo de calcular a tendência, que foi depois subtraída ao segmento original [118]. A componente DC também foi removida. O espectro de potência foi calculado através do método de Welch tendo sido utilizada uma janela de Hanning com 200 s e com 50% de sobreposição entre os segmentos [118]. Finalmente, foi calculada a potência média de cada intervalo de frequência.

Para o estudo da dependência linear entre dois sinais pode recorrer-se à função de coerência. Esta função compara a correlação do espectro de potência de dois sinais com o produto dos seus espectros de potência ao longo de um determinado intervalo de frequência e é definido pela expressão:

$$C_{uy} = \frac{|P_{uy}(f)|^2}{P_{uu}(f)P_{yy}(f)}, \quad (5.11)$$

onde  $P_{uu}$  e  $P_{yy}$  representam o auto espectro de potência e  $P_{uy}$  representam o espectro do potência cruzado entre dois sinais. A magnitude da função de coerência pode ter valores entre 0 e 1, que indicam o quanto um sinal  $u$  se parece com o sinal  $y$  em cada frequência. A coerência média obtida entre perfusões medidas com diferentes fibras colectoras foi calculada para os intervalos de frequências analisados. Foram avaliadas as seguintes relações entre fibras: D0.14 e D0.25; D0.25 e D1.20; e D0.25 e D1.20 para cada diodo laser. Foi também avaliada a coerência média entre sinais da perfusão sanguínea obtidos com diferentes comprimentos de onda, *i. e.* relações entre: CO635 e CO785; CO785 e CO830; e CO635 e CO830 para cada fibra detectora. Para o cálculo da coerência foram considerados segmentos com 3 minutos obtidos durante o fluxo basal e segmentos de 1 minuto obtidos durante o zero biológico.

### 5.6.2.4 Resultados e discussão

- Face ventral do braço

Na figura 5.26 podem ver-se os espectros de potência obtidos dos sinais de tensão registados na face ventral do braço de um participante com o CO785 e com a DF1.20, durante fluxo basal, o ZB e o pHRPO. Nos espectros de potência pode ver-se um espalhamento nas baixas frequências que é maior para o sinal obtido durante o pHRPO e menor para o sinal obtido durante o ZB, o que está de acordo com a teoria. O espectro apresentado foi obtido da média de 2 espectros de potência, com  $2^{12}$  pontos cada um, adquiridos durante os respectivos períodos analisados (fluxo basal, ZB e pHRPO). Uma sobreposição de 25% foi utilizada e os espectros foram normalizados à intensidade de luz e multiplicados pela constante de calibração  $M$ .

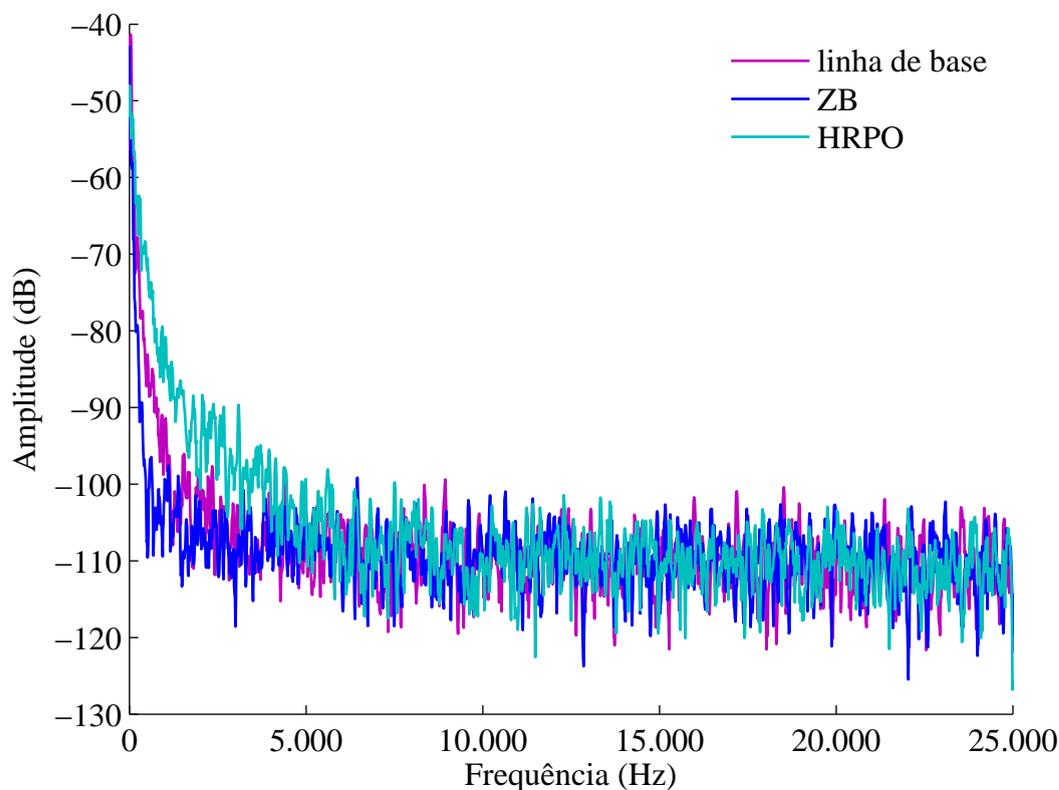


FIGURA 5.26: Espectros de potência obtidos durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO, com o díodo laser de 785 nm e a distância entre fibras emissora e receptora de 1,20 mm.

Os sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na face ventral do braço estão apresentado nas figuras 5.27, 5.28, 5.29 e 5.30. Os resultados obtidos com o protótipo têm um perfil semelhante aos resultados obtidos com o PF5000. Nos primeiros

20 minutos o fluxo basal é monitorizado e quando é insuflada a braçadeira a perfusão diminui devido à redução do fluxo microcirculatório provocado pela oclusão arterial. Nos instantes seguintes ao esvaziamento da braçadeira ocorre o pHRPO e finalmente, nos últimos 10 min de aquisição a perfusão regressa ao fluxo basal. Nos sinais apresentados pode ver-se que o decréscimo da perfusão durante o BZ é menor para o CO635, que o pHRPO aumenta com o comprimento de onda e que as oscilações na amplitude parecem também aumentar com o comprimento de onda.

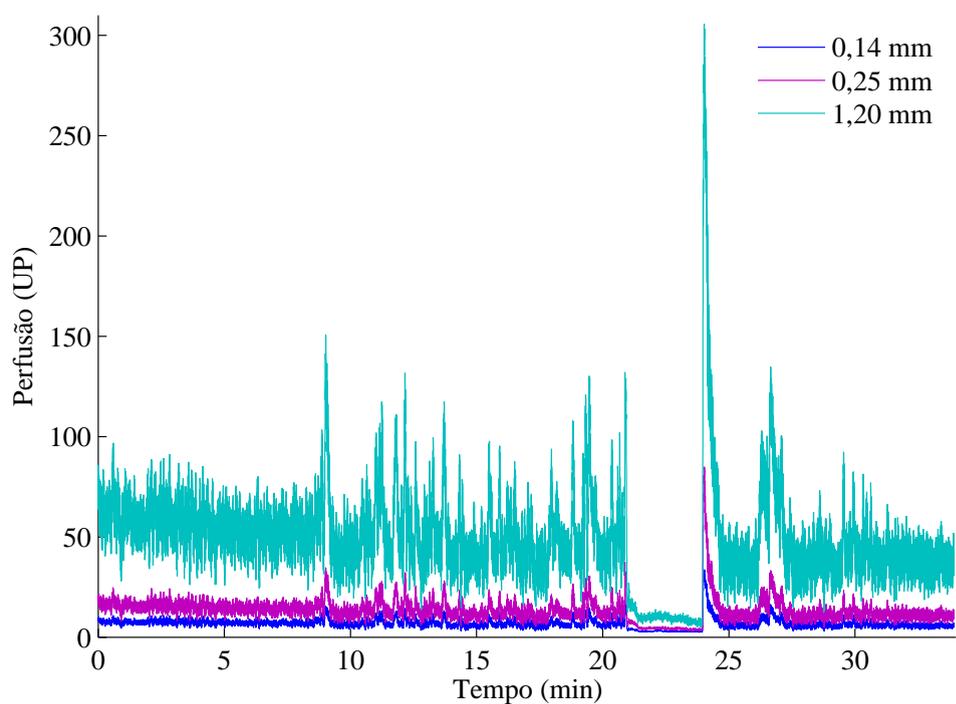


FIGURA 5.27: Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na face ventral do braço de um participante, com o PF5000, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora.

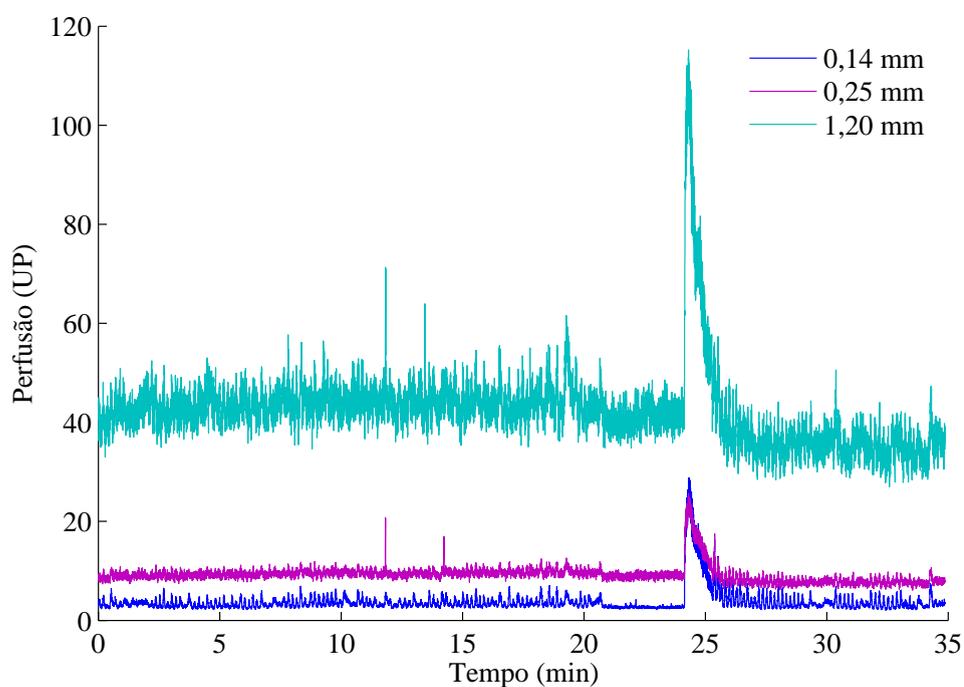


FIGURA 5.28: Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na face ventral do braço de um participante, com o CO635, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora.

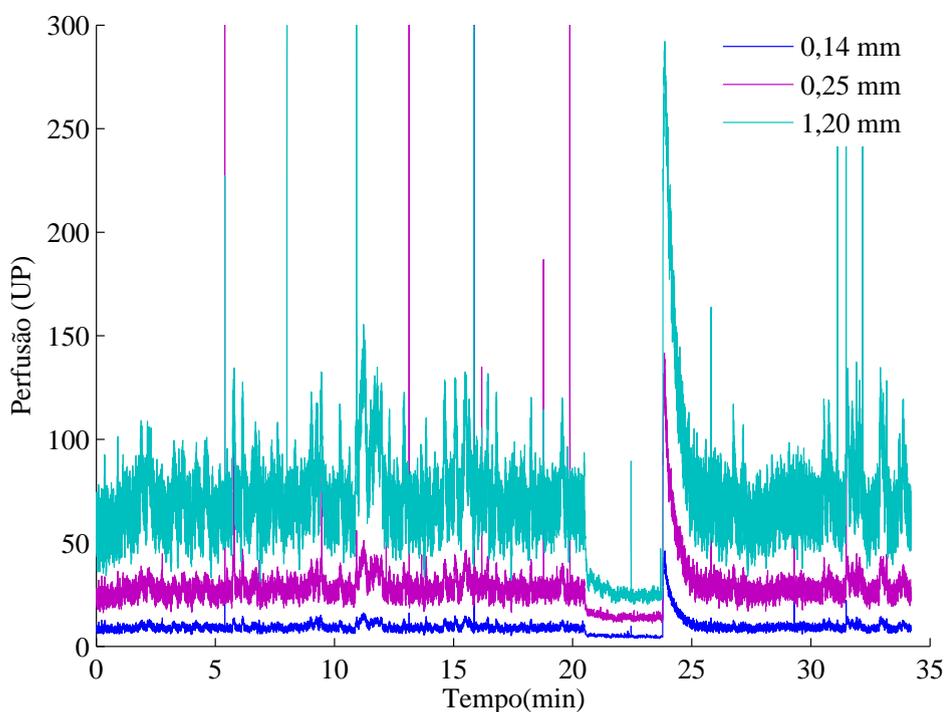


FIGURA 5.29: Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na face ventral do braço de um participante, com o CO785, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora.

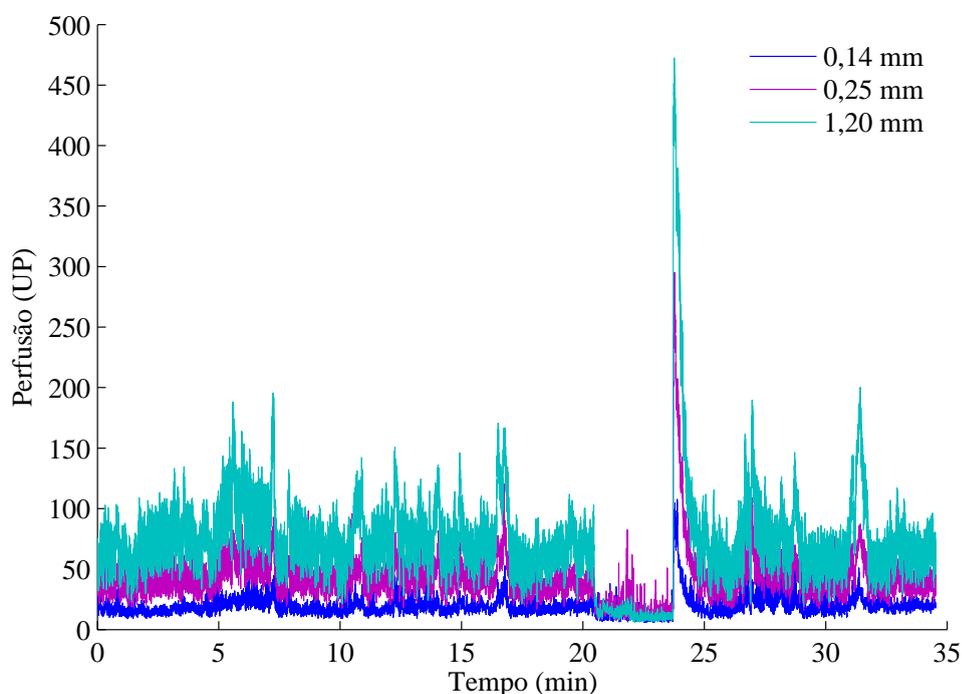


FIGURA 5.30: Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na face ventral do braço de um participante, com o CO830, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora.

Os valores medianos de perfusão sanguínea obtidos durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO estão apresentados na tabela 5.18. A perfusão aumenta com a distância entre as fibras emissora e receptora para cada comprimento de onda e para o PF5000, excepto durante o ZB para o CO830. Este aumento reflecte o maior volume de tecido monitorizado pelas separações maiores. Os resultados obtidos com o PF5000 e com o protótipo, durante o fluxo basal e o pHRPO, estão dentro da mesma gama de valores, no entanto o mesmo não acontece para o zero biológico onde valores de perfusão mais baixos foram obtidos com o PF5000. Uma diferença significativa foi obtida entre as perfusões medidas com diferentes distâncias entre fibras durante o fluxo basal ( $p < 0,03$ ) e o pHRPO ( $p < 0,023$ ), para todos os comprimentos de onda e o PF5000. Durante o ZB também foi obtida uma diferença significativa ( $p < 0,003$ ), excepto para o CO830.

Quando são comparadas as perfusões obtidas com diferentes comprimentos de onda para uma determinada distância entre fibras emissora e colectora, durante o fluxo basal, a perfusão sanguínea aumenta com o comprimento de onda para DF0.14 e DF0.25, mas diminui para DF1.20. A perfusão medida durante o pHRPO diminui

entre CO785 e CO830 para a DF0.25 e a DF1.20. Estas não linearidades podem ser o resultado da dispersão múltipla que ocorre quando o volume de sangue atravessado pelos fotões é maior, o que acontece quando são utilizadas maiores distâncias entre fibras e maiores comprimentos de onda. As dispersões múltiplas resultam numa grande componente homodínica no sinal de tensão, que por sua vez levam a relações não lineares entre a CGVM e a perfusão. Isto resulta na subestimação dos níveis da perfusão durante o fluxo basal para DF1.20 ou durante o pHRPO para DF0.25 e DF1.20 para CO830. A dispersão múltipla pode ser evitada através do uso de um factor de correcção proposto por Nilsson [39], mas testes *in vitro* com a utilização de sangue e fantasmas complexos são necessários para a sua implementação. Não foi encontrada nenhuma tendência para as perfusões medidas durante o ZB quando diferentes comprimentos de onda são comparados.

TABELA 5.18: Perfusão sanguínea mediana (1º quartil; 3º quartil) obtida durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO, na face ventral do braço.

	DF (mm)	Fluxo Basal (UP)	ZB (UP)	PORH (UP)
CO635	0,14	5,2 (3,5; 11,5)	4,5 (2,9; 8,8)	19,7 (13,6; 52,7)
	0,25	13,7 (9,2; 23,1)	13,5 (8,6; 20,3)	37,4 (23,3; 57,2)
	1,20	55,8 (37,5; 100,0)	49,0 (33,8; 88,1)	116,8 (98,0; 198,6)
CO785	0,14	7,8 (5,3; 10,3)	5,1 (4,2; 7,7)	39,6 (29,4; 66,0)
	0,25	14,1 (10,6; 17,9)	8,8 (6,8; 12,4)	91,9 (48,0; 140,0)
	1,20	38,2 (27,9; 47,8)	22,6 (16,3; 24,9)	227,5 (144,7; 304,9)
CO830	0,14	17,2 (3,0; 58,3)	13,3 (2,0; 31,8)	80,0 (12,7; 246,2)
	0,25	25,8 (3,2; 62,3)	15,2 (2,0; 30,7)	81,5 (20,4; 303,8)
	1,20	31,7 (7,2; 90,3)	13,5 (1,8; 43,0)	187,5 (63,0; 371,4)
PF5000	0,14	5,7 (4,5; 6,9)	3,0 (2,8; 3,4)	32,4 (22,0; 51,3)
	0,25	9,3 (6,8; 13,5)	3,9 (3,0; 4,7)	64,5 (41,4; 88,2)
	1,20	25,5 (22,2; 40,0)	6,3 (5,6; 8,5)	207,4 (149,7; 254,3)

A perfusão sanguínea monitorizada durante o ZB tem origem nos movimentos Brownianos dos glóbulos vermelhos em conjunto com outras contribuições biológicas, sobrepostas ao zero instrumental [19]. O zero instrumental deve ser constante

para cada comprimento de onda e fibra receptora, por isso, não é motivo para preocupações desde que os resultados sejam comparados em termos relativos. Os valores mais baixos obtidos com o PF5000 revelam uma redução mais eficaz do ruído do que a obtida no protótipo. Para o CO830, as medições da perfusão no ZB não seguem nenhuma tendência e para além disso, não foi encontrada diferença estatística entre diferentes distâncias de fibras, para esse comprimento de onda, durante o ZB.

As percentagens de abaixamento e de aumento da perfusão sanguínea obtidas para diferentes comprimentos de onda e para o PF5000, e para diferentes distâncias entre fibras estão apresentadas na tabela 5.19.

TABELA 5.19: Percentagem de abaixamento e de aumento medianos (1º quartil; 3º quartil) obtidos nos sinais de perfusão sanguínea recolhidos na face ventral do braço.

	DF (mm)	Percentagem de abaixamento (%)	Percentagem de aumento (%)
CO635	0,14	15,4 (11,3; 19,3)	235,2 (163,8; 301,1)
	0,25	7,3 (4,2; 13,1)	159,5 (112,4; 213,2)
	1,20	8,0 (4,4; 14,9)	125,0 (84,9; 169,8)
CO785	0,14	26,5 (16,4; 40,2)	416,8 (299,3; 609,8)
	0,25	32,3 (20,9; 40,4)	514,0 (361,9; 643,7)
	1,20	38,3 (34,1; 56,3)	496,9 (391,8; 543,4)
CO830	0,14	30,2 (20,9; 40,0)	248,4 (202,2; 373,8)
	0,25	43,5 (35,6; 59,0)	358,6 (189,0; 608,7)
	1,20	66,7 (52,8; 77,8)	525,7 (283,0; 804,6)
PF5000	0,14	44,6 (33,1; 52,5)	522,5 (339,8; 694,4)
	0,25	55,2 (46,6; 61,5)	612,5 (356,6; 788,2)
	1,20	75,6 (68,6; 80,4)	623,5 (392,0; 839,8)

A percentagem de diminuição é sempre menor do que 100% uma vez que a perfusão sanguínea durante o ZB é sempre menor do que a perfusão durante o fluxo basal. Esta percentagem é também mais pronunciada quando o comprimento de onda aumenta, para a mesma distância entre fibras emissora e receptora, e quando a distância entre as fibras aumenta, para o mesmo comprimento de onda, excepto

para o CO635. Isto revela que a diminuição da perfusão durante a oclusão é maior para os comprimentos de onda e distâncias entre fibras maiores, o que é um reflexo do maior volume de tecido monitorizado durante o fluxo basal pelos mesmos. Para além disso, a percentagem de abaixamento é estatisticamente diferente entre diferentes distâncias entre fibras para o mesmo comprimento de onda, excepto para o CO635. A inconsistência nas medições feitas com o CO635 é destacada pela ausência de diferença estatística nos resultados obtidos com esse comprimento de onda.

A percentagem de aumento é sempre superior a 100%, visto que a perfusão sanguínea registada durante o pHRPO é sempre superior à da perfusão medida durante o fluxo basal. No entanto, não foi encontrada nenhuma tendência dos resultados com a variação da distância entre as fibras emissora e receptora ou com o comprimento de onda.

Os valores mais elevados de percentagem de aumento e de diminuição foram obtidos com o PF5000. Este resultado é um reflexo dos valores mais baixos obtidos com o PF5000 durante o ZB pois os valores de perfusão sanguínea obtidos durante o fluxo basal e o pHRPO estão na mesma ordem de grandeza dos resultados obtidos com o protótipo.

A fracção de perfusão foi apresentada por Morales [29], como um método útil para ser utilizado em investigação na área da FLD, uma vez que pode complementar os métodos existentes ao permitir a comparação entre perfusões registadas em diferentes fluxómetros e estudos. Neste trabalho foram calculadas fracções de perfusão entre perfusões monitorizadas com: comprimentos de onda maiores e comprimentos de onda menores; e distâncias entre fibras maiores e distâncias entre fibras menores, permitindo a avaliação de como o fluxo detectado com os comprimentos de onda ou distâncias entre fibras maiores é também detectado pelos comprimentos de onda e distâncias entre fibras menores.

As fracções de perfusão obtidas quando se compara a perfusão sanguínea monitorizada com diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO podem ser consultadas na tabela 5.20. Foram obtidas fracções superiores a 1 uma vez que a perfusão aumenta sempre com o aumento da distância entre as fibras. As FP são maiores para o CO635 e mais baixas para o CO830 o que indica que há uma maior diferença entre a perfusão medida por

diferentes distâncias entre fibras para o CO635 do que para o CO830. Os resultados obtidos com o PF5000 são semelhantes aos obtidos com o CO785 durante o fluxo basal e o pHRPO, o que pode indicar que fenómenos semelhantes estão a ser medidos. Os resultados são estatisticamente diferentes para fracções de perfusão obtidas durante o fluxo basal ( $p < 0,012$ ) e o pHRPO ( $p < 0,033$ ), quando são comparadas as FP obtidas para o mesmo comprimento de onda, como por exemplo:

$$\frac{Perf_{CO785,DF1.2}}{Perf_{CO785,DF0.25}} \neq \frac{Perf_{CO785,DF0.25}}{Perf_{CO785,DF0.14}}. \quad (5.12)$$

No que diz respeito às fracções de perfusão obtidas durante o ZB, estas são estatisticamente diferentes ( $p < 0,04$ ), excepto para o CO830, onde as FP são próximas da unidade. Isto pode indicar que diferentes distâncias entre fibras medem o mesmo fenómeno durante o ZB. No entanto este comprimento de onda não segue a mesma tendência dos outros comprimentos de onda, e não apresenta diferença estatística. Estes resultados são um reflexo dos resultados obtidos na análise das perfusões medianas, discutidos no início desta secção.

TABELA 5.20: Fracções de perfusão medianas (1º quartil; 3º quartil) entre diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora, obtidas na face ventral do braço durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO.

	Fracção de Perfusão	Fluxo Basal (UP)	ZB (UP)	pPORH (UP)
CO635	DF0.25/DF0.14	2,3 (2,0; 2,7)	2,5 (2,2; 2,3)	1,6 (1,4; 1,9)
	DF1.2/DF0.25	3,9 (3,5; 4,7)	4,2 (3,0; 4,9)	3,8 (3,1; 4,7)
	DF1.2/DF0.14	9,7 (6,8; 15,3)	11,4 (7,0; 16,4)	6,0 (5,0; 8,4)
CO785	DF0.25/DF0.14	1,8 (1,5; 2,3)	1,7 (1,4; 2,0)	1,9 (1,5; 2,7)
	DF1.2/DF0.25	2,8 (2,5; 3,1)	2,3 (2,0; 2,7)	2,7 (2,2; 3,6)
	DF1.2/DF0.14	5,2 (4,0; 6,7)	4,1 (3,0; 4,8)	5,7 (4,7; 7,4)
CO830	DF0.25/DF0.14	1,2 (1,1; 1,3)	1,0 (0,8; 1,2)	1,4 (1,1; 1,8)
	DF1.2/DF0.25	1,8 (1,2; 2,2)	1,1 (0,8; 1,4)	2,2 (1,7; 2,9)
	DF1.2/DF0.14	2,1 (1,5; 2,7)	1,0 (0,7; 1,4)	3,7 (2,4; 4,3)
PF5000	DF0.25/DF0.14	1,5 (1,4; 2,0)	1,2 (1,1; 1,5)	1,8 (1,5; 2,5)
	DF1.2/DF0.25	3,1 (2,7; 3,4)	1,7 (1,5; 2,0)	3,0 (2,7; 3,9)
	DF1.2/DF0.14	5,2 (4,3; 6,2)	2,3 (1,8; 3,0)	5,6 (4,7; 7,3)

As fracções de perfusão obtidas com diferentes comprimentos de onda ou o PF5000, como por exemplo:

$$\frac{Perf_{CO785,DF1.2}}{Perf_{CO785,DF0.25}} \neq \frac{Perf_{CO635,DF1.2}}{Perf_{CO635,DF0.25}}, \quad (5.13)$$

são estatisticamente diferentes durante o ZB ( $p < 0,009$ ). Isto pode ser o resultado da existência de diferentes zeros instrumentais para cada comprimento de onda e para o PF5000 ou pode indicar que diferentes fenómenos estão a ser medidos por diferentes comprimentos de onda.

As fracções de perfusão obtidas quando se compara a perfusão sanguínea monitorizada com diferentes comprimentos de onda estão resumidas na tabela 5.21. As FP diminuem com a distância entre fibras emissora e receptora durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO, excepto quando o CO785 é comparado com o CO635 durante o pHRPO. Isto pode indicar que o efeito da variação do comprimento de onda, nas medições da perfusão, é mais evidente para as distâncias entre fibras menores. Diferença significativa foi obtida durante o fluxo basal ( $p < 0,025$ ) e o ZB ( $p < 0,004$ ). Para além disso, a FP não é sempre superior a 1, o que reflecte as não linearidades apresentadas na tabela 5.18.

TABELA 5.21: Fracções de perfusão medianas (1º quartil; 3º quartil) entre diferentes comprimentos de onda, obtidas na face ventral do braço durante o fluxo basal, o ZB e o pHRPO.

Fracção de Perfusão	DF (mm)	Fluxo Basal (UP)	ZB (UP)	pPORH (UP)
CO785/CO635	0,14	1,6 (0,4; 2,2)	1,3 (0,3; 2,1)	2,6 (0,6; 3,2)
	0,25	1,0 (0,5; 2,0)	0,7 (0,4; 1,2)	2,8 (1,2; 3,6)
	1,20	0,8 (0,4; 1,3)	0,5 (0,2; 0,6)	1,9 (0,7; 3,1)
CO830/CO635	0,14	1,2 (0,6; 10,5)	0,9 (0,5; 7,0)	1,2 (0,6; 10,0)
	0,25	0,8 (0,3; 5,0)	0,6 (0,1; 3,1)	1,2 (0,5; 8,1)
	1,20	0,3 (0,1; 2,1)	0,1 (0,0; 1,0)	0,7 (0,3; 4,3)
CO830/CO785	0,14	3,1 (0,4; 6,9)	2,9 (0,4; 4,2)	2,0 (0,4; 3,4)
	0,25	2,2 (0,2; 4,0)	1,6 (0,2; 3,1)	1,6 (0,2; 2,9)
	1,20	1,1 (0,1; 2,3)	1,0 (0,1; 1,7)	1,0 (0,2; 2,3)

Na tabela 5.22 estão apresentados os tempos de subida e de descida obtidos nos sinais de perfusão sanguínea cutânea registados na face ventral do braço. No que diz respeito ao tempo de subida, não existe uma tendência, nem foi encontrada diferença estatística, quando a perfusão medida com fibras receptoras localizadas a diferentes distâncias da fibra emissora ou com diferentes comprimentos de onda são comparados. Murray et al. [19], utilizando imagiologia laser Doppler, obteve tempos de subida de aproximadamente o dobro nas perfusões obtidas com um laser vermelho quando comparadas com as perfusões obtidas com um laser verde, sugerindo que diferentes mecanismos de redistribuição da microcirculação são registados com os dois lasers.

Por outro lado, o tempo de descida aumenta com o aumento da distância entre as fibras detectora e emissora para todos os comprimentos de onda e para o PF5000. Os tempo de descida são maiores para o CO785 e menores para o CO830. Estas diferenças obtidas nos tempos de descida para diferentes comprimentos de onda, pode estar relacionada com o facto de diferentes comprimentos de onda monitorizarem diferentes camadas de microcirculação ou diferentes tipos de vasos.

TABELA 5.22: Tempos de subida e de descida medianos (1º quartil; 3º quartil) obtidos na face ventral do braço.

	DF (mm)	Tempo de subida (s)	Tempo de descida (s)
CO635	0,14	8,9 (6,5; 10,6)	20,9 (0,3; 2,1)
	0,25	8,8 (7,6; 10,1)	26,6 (0,4; 1,2)
	1,20	8,6 (5,9; 10,9)	28,4 (19,2; 51,7)
CO785	0,14	9,9 (7,4; 14,0)	41,8 (25,2; 65,1)
	0,25	9,6 (8,7; 11,9)	43,1 (24,9; 64,9)
	1,20	10,2 (8,9; 11,3)	46,3 (25,1; 68,4)
CO830	0,14	7,8 (4,5; 9,3)	16,7 (7,3; 35,2)
	0,25	9,6 (6,0; 10,3)	18,1 (8,4; 32,6)
	1,20	9,7 (6,5; 11,6)	24,8 (17,5; 40,2)
PF5000	0,14	9,2 (5,1; 11,0)	30,8 (24,4; 51,0)
	0,25	8,3 (4,7; 10,2)	30,8 (21,7; 55,4)
	1,20	7,5 (4,6; 9,7)	32,2 (20,6; 52,3)

- Face ventral do braço e palma da mão

Na figura 5.31 podem ver-se os espectros de potência obtidos dos sinais de tensão registados na palma da mão de um participante saudável com o CO830 e com a DF0.25, durante o fluxo basal e o ZB. Pode ver-se claramente que o espalhamento do espectro nas baixas frequências é maior para o sinal obtido no fluxo basal e menor para o sinal obtido no ZB. O espectro apresentado foi obtido da média de 2 espectros de potência, com  $2^{12}$  pontos cada um, adquiridos durante os respectivos períodos analisados (fluxo basal e ZB). Uma sobreposição de 25% foi utilizada e os espectros foram normalizados à intensidade de luz e multiplicados pela constante de calibração  $M$ .

Os sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na palma da mão de um participante saudável estão representados nas figuras 5.32, 5.33, 5.34 e 5.35. A perfusão medida na palma da mão é claramente diferente da perfusão obtida na face ventral do braço, o que reflecte as diferenças fisiológicas entre as duas regiões de pele. No entanto o perfil de perfusão obtido com o protótipo assemelha-se ao perfil obtido com o PF5000.

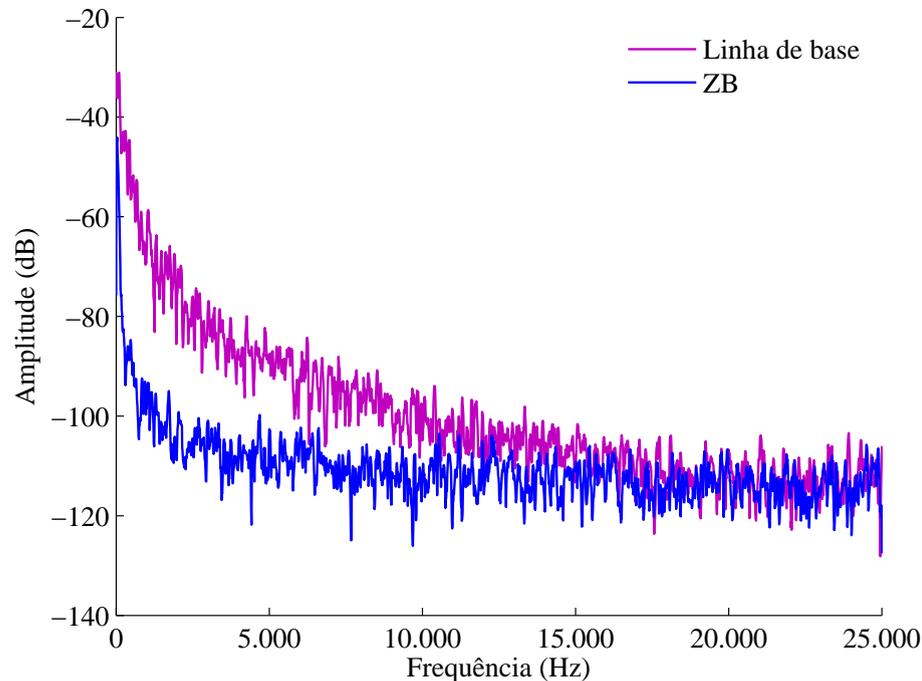


FIGURA 5.31: Espectros de potência obtidos, durante o fluxo basal e o ZB, com o díodo laser de 830 nm e a distância entre fibras receptora e emissora de 0,25 mm.

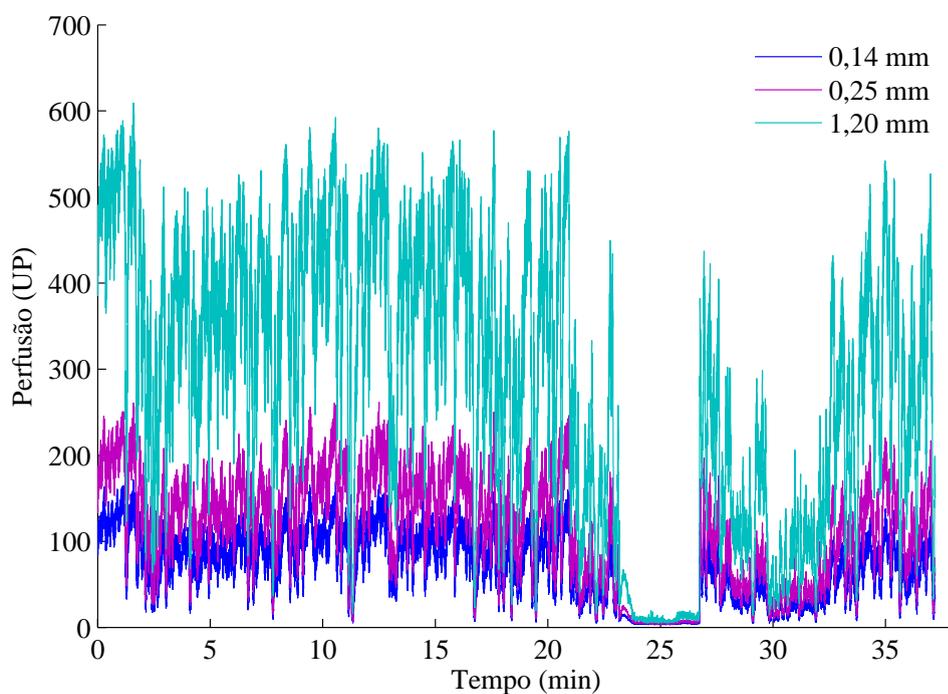


FIGURA 5.32: Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na palma da mão de um participante, com o PF5000, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora.

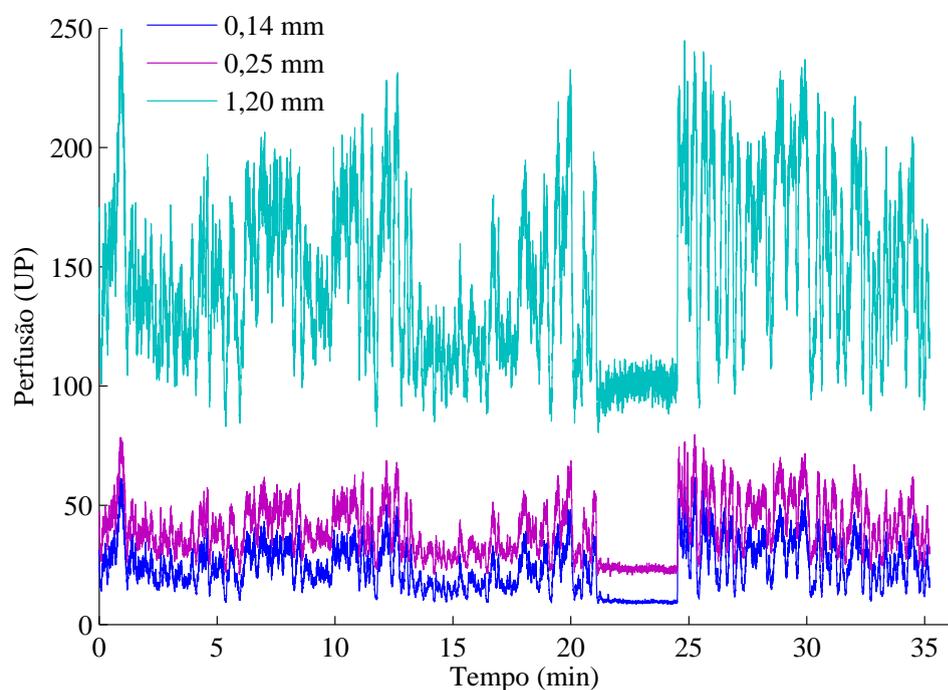


FIGURA 5.33: Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na palma da mão de um participante, com o CO635, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora.

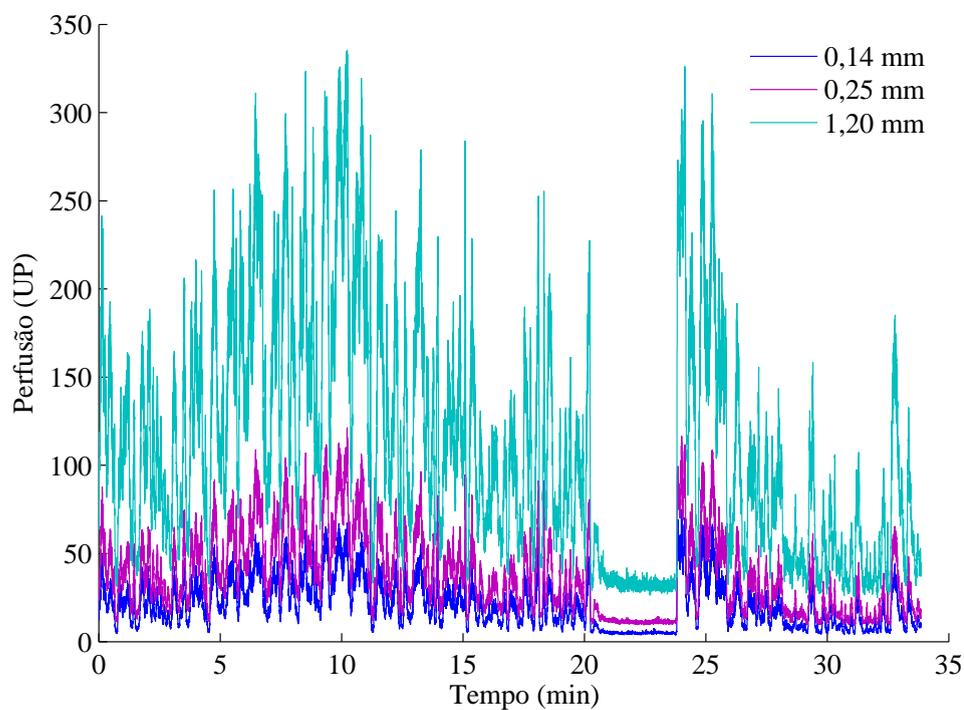


FIGURA 5.34: Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na palma da mão de um participante, com o CO785, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora.

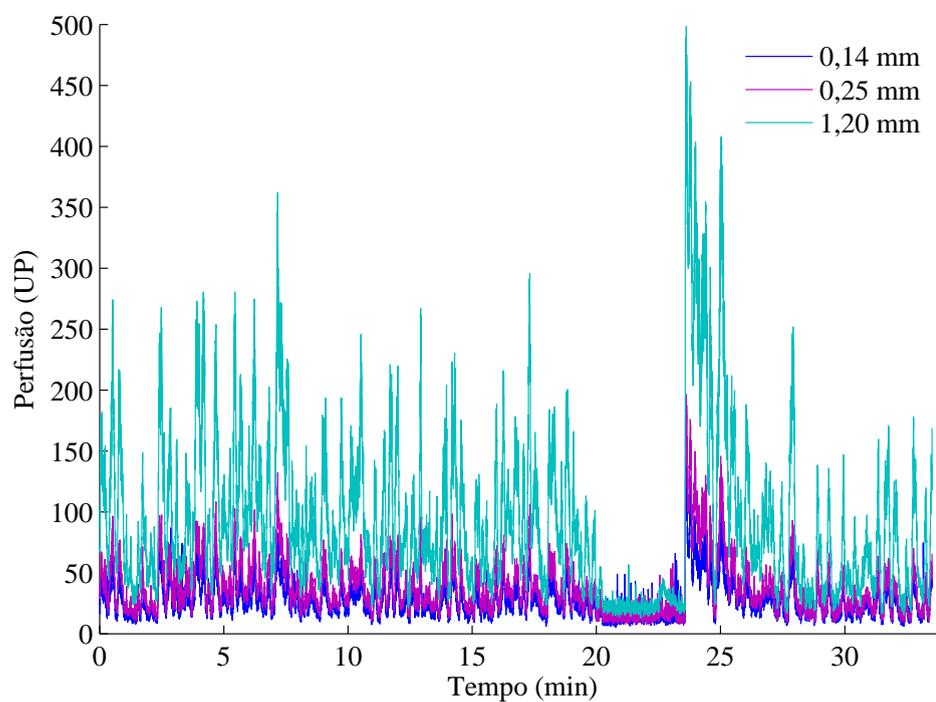


FIGURA 5.35: Sinais de perfusão sanguínea cutânea obtidos na palma da mão de um participante, com o CO830, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora.

A perfusão sanguínea mediana obtida durante o fluxo basal e o ZB, na face ventral do braço e na palma da mão estão apresentadas na tabela 5.23. De modo geral, os valores medianos de perfusão obtidos na palma da mão são superiores aos valores medianos obtidos na face ventral do braço, o que reflecte a elevada densidade de capilares e *shunts* arteriovenosos presentes na palma da mão. Diferença estatística foi obtida na comparação entre as perfusões medidas nas duas regiões durante o fluxo basal ( $p < 0,02$ ). Um aumento maior da perfusão no fluxo basal foi obtida com o CO830 e com o PF5000.

TABELA 5.23: Perfusão sanguínea mediana (1º quartil; 3º quartil) obtida durante o fluxo basal e o ZB, na face ventral do braço e na palma da mão.

	DF (mm)	Fluxo Basal braço (UP)	Fluxo Basal mão (UP)	ZB braço (UP)	ZB mão (UP)
CO635	0,14	6,5 (4,2; 21,8)	33,6 (23,5; 79,4)	6,1 (3,2; 16,2)	13,4 (7,6; 21,7)
	0,25	19,7 (10,0; 30,7)	63,8 (46,6; 117,8)	17,8 (9,5; 23,6)	26,2 (19,2; 32,5)
	1,20	83,7 (38,1; 157,9)	231,5 (171,3; 369,7)	65,5 (34,6; 135,8)	140,5 (95,9; 186,9)
CO785	0,14	9,7 (5,6; 13,0)	33,7 (12,7; 73,7)	6,1 (4,6; 8,8)	5,5 (4,2; 8,9)
	0,25	17,0 (9,1; 25,2)	70,5 (25,6; 97,2)	11,6 (6,5; 13,2)	8,3 (5,5; 19,6)
	1,20	46,6 (36,7; 6,4)	217,4 (88,7; 334,8)	25,5 (21,8; 29,6)	28,7 (16,8; 69,5)
CO830	0,14	14,2 (2,6; 48,0)	90,0 (25,9; 167,7)	9,0 (2,0; 26,8)	16,9 (7,7; 41,7)
	0,25	18,1 (3,2; 54,2)	101,2 (34,6; 225,3)	10,6 (1,6; 27,9)	20,0 (6,6; 46,1)
	1,20	30,2 (7,8; 75,9)	222,9 (82,6; 617,4)	10,4 (1,6; 38,5)	29,1 (10,5; 63,0)
PF5000	0,14	7,0 (4,7; 9,0)	63,5 (37,6; 138,4)	3,1 (2,8; 3,5)	4,7 (3,9; 6,4)
	0,25	9,7 (6,7; 17,0)	126,1 (52,4; 311,3)	3,9 (2,9; 4,4)	7,0 (4,8; 10,5)
	1,20	28,8 (22,6; 9,8)	428,5 (179,4; 683,0)	6,1 (5,4; 8,7)	13,0 (8,9; 18,7)

Na tabela 5.24 são apresentados a percentagem de abaixamento e o tempo de subida medianos (1º quartil; 3º quartil) obtidos nos sinais de perfusão sanguínea recolhidos na face ventral do braço e na palma da mão.

A percentagem de abaixamento é significativamente maior para as perfusões medidas na palma da mão para todos os comprimentos de onda e o PF5000 ( $p < 0,02$ ).

No que diz respeito ao tempo de subida, este é maior para os sinais adquiridos no braço, variando entre 7 e 10 segundos, enquanto que, na palma da mão ele varia entre 1 e 3 segundos (5.24). Isto sugere que diferentes mecanismos estão envolvidos na vasodilatação da rede microcirculatória destas duas regiões analisadas. Como é referido na secção 6.1.1 na palma da mão existe uma densidade de capilares maior

do que noutras partes do corpo. Na ausência de fluxo sanguíneo, como acontece durante o ZB, todos os esfíncteres pré-capilares relaxam, aguardando que o fluxo sanguíneo regresse. Durante o fluxo basal, apenas 25 a 30% dos capilares estão “abertos”. Devido à grande densidade de capilares “abertos” na palma da mão, a resistência periférica capilar será menor na mão do que no braço. Para além disso as duas regiões analisadas têm diferentes anatomias no que diz respeito ao sistema arterial. O antebraço é irrigado por alguns vasos dos ramos da artéria radial ou da artéria ulnar, enquanto que a palma da mão é irrigada por todos os vasos dos dois tipos de ramos. Deste modo, quando é libertada a braçadeira, o sangue flui na direcção da menor resistência periférica, pelos dois ramos arteriais, e o sangue vai ocupar toda a rede capilar da mão antes de preencher a rede capilar do braço.

TABELA 5.24: Percentagem de abaixamento e tempo de subida medianos (1º quartil; 3º quartil) obtidos nos sinais de perfusão sanguínea recolhidos na face ventral do braço e na palma da mão.

	DF (mm)	Percentagem de Abaixamento - braço	Percentagem de Abaixamento - mão	Tempo de subida - braço	Tempo de subida - mão
CO635	0,14	16,1 (12,2; 27,6)	65,4 (45,8; 76,2)	9,3 (6,7; 10,8)	1,3 (0,9; 4,2)
	0,25	11,9 (4,4; 22,7)	58,0 (45,6; 71,3)	9,3 (7,8; 12,4)	2,0 (1,0; 4,8)
	1,20	8,5 (3,3; 21,7)	47,5 (25,9; 59,3)	9,0 (6,1; 11,1)	2,4 (1,0; 10,4)
CO785	0,14	28,7 (15,4; 43,3)	79,8 (44,8; 90,8)	9,5 (6,9; 13,4)	1,1 (0,7; 2,3)
	0,25	35,2 (19,3; 48,9)	80,0 (56,8; 92,1)	9,6 (6,9; 12,0)	1,1 (0,6; 3,9)
	1,20	42,1 (33,1; 62,6)	75,5 (48,4; 88,8)	9,8 (6,9; 13,4)	1,1 (0,8; 2,2)
CO830	0,14	33,4 (20,5; 48,1)	62,5 (45,4; 88,2)	8,1 (3,8; 10,7)	2,6 (0,4; 7,6)
	0,25	48,1 (38,4; 63,2)	73,8 (50,9; 86,4)	10,1 (7,0; 10,4)	2,4 (0,6; 6,2)
	1,20	69,8 (61,9; 81,9)	87,2 (77,0; 93,7)	9,1 (4,8; 11,1)	3,1 (1,0; 8,3)
PF5000	0,14	51,5 (34,0; 60,4)	92,2 (87,2; 95,7)	9,0 (4,9; 10,6)	1,1 (0,6; 4,7)
	0,25	56,9 (47,8; 72,8)	93,9 (87,4; 96,5)	7,0 (4,3; 11,1)	1,0 (0,6; 6,1)
	1,20	78,4 (67,8; 84,1)	96,4 (91,6; 97,8)	7,4 (4,1; 9,6)	1,4 (0,7; 5,9)

- Análise no domínio das frequências

As FFTs obtidas da perfusão sanguínea medida na face ventral do braço durante o fluxo basal com o PF5000 e com os três comprimentos de onda presentes no protótipo, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora, estão representados nas figuras 5.36, 5.37, 5.38 e 5.39.

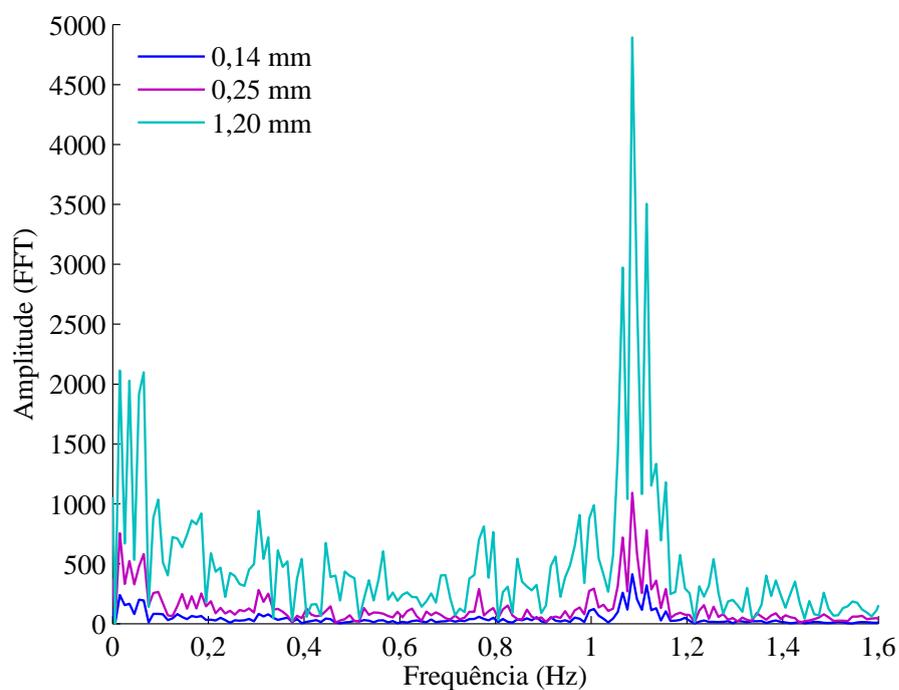


FIGURA 5.36: Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na face ventral do braço de um participante, durante o fluxo basal com o PF5000.

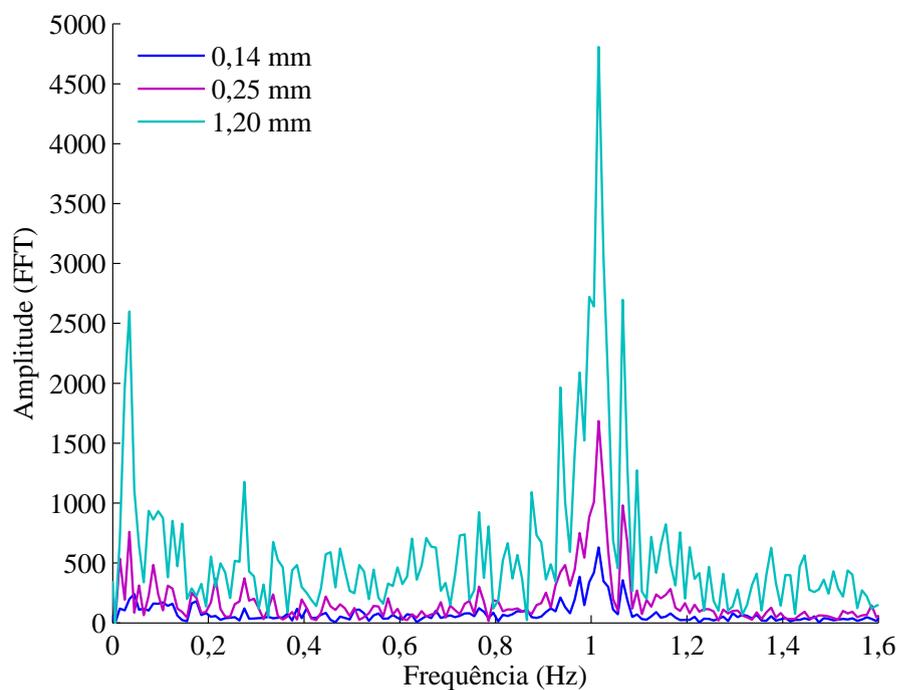


FIGURA 5.37: Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na face ventral do braço de um participante, durante o fluxo basal com o CO635.

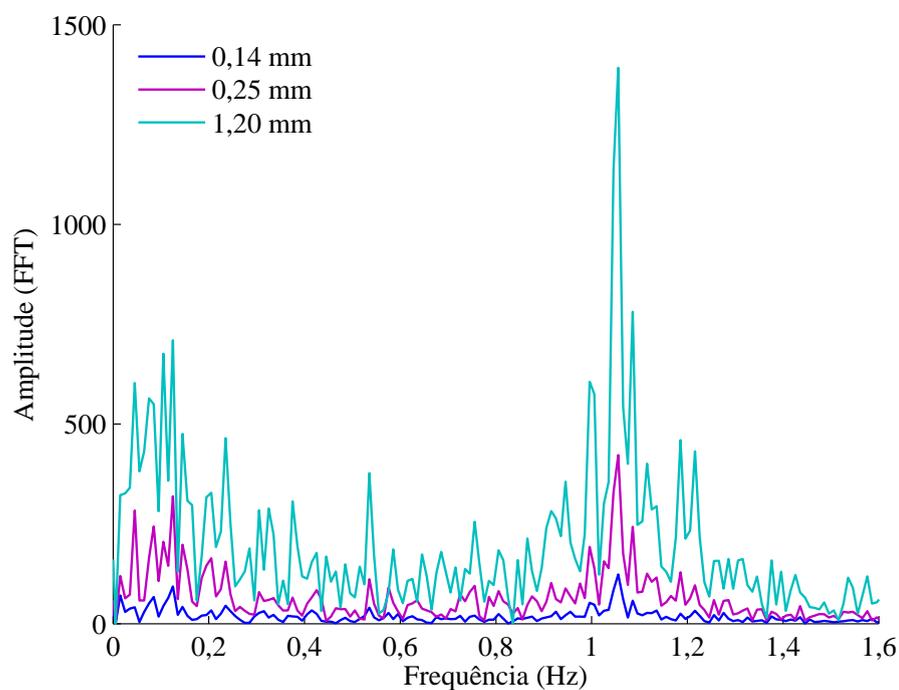


FIGURA 5.38: Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na face ventral do braço de um participante, durante o fluxo basal com o CO785.

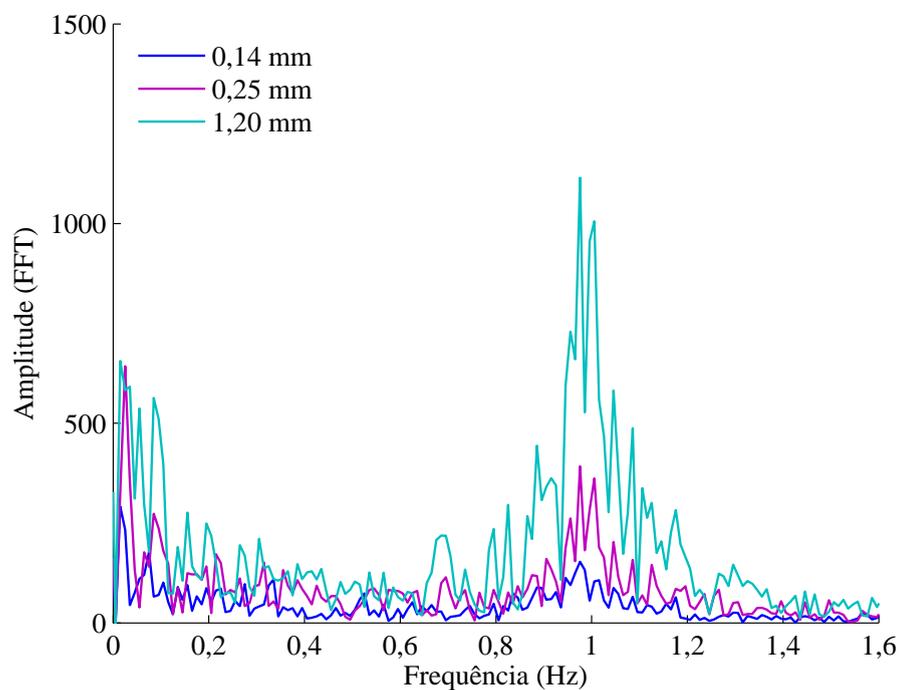


FIGURA 5.39: Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na face ventral do braço de um participante, durante o fluxo basal com o CO830.

Nas quatro figuras pode ver-se claramente o pico correspondente à frequência cardíaca (intervalo entre 0,4 e 1,6 Hz - ver secção ) que para este participante se situa entre 0,8 e 1,2 Hz. Outros picos, que correspondem a outros fenómenos fisiológicos, são visíveis nas frequências mais baixas (entre 0 e 0,4 Hz). Para além disso, constata-se que a amplitude da FFT aumenta com o aumento da distância entre as fibras emissora e receptora para cada comprimento de onda e para o PF5000. Quando são comparados diferentes comprimentos de onda, a amplitude da FFT diminui com o aumento do comprimento de onda para cada distância entre as fibras emissora e receptora.

As FFTs obtidas da perfusão sanguínea medida na palma da mão com o PF5000 e com os três comprimentos de onda do protótipo, para as três distâncias entre as fibras emissora e receptora estão representados nas figuras 5.40, 5.41, 5.42 e 5.43. Nas quatro medições pode ver-se claramente o pico correspondente à frequência cardíaca, que para este participante se situa entre os 0,8 e os 1,0 Hz. Outros picos, que correspondem a outros fenómenos fisiológicos são visíveis nas frequências mais baixas (entre 0,0 e 0,4 Hz). Tal como quando foram comparadas FFTs aplicadas a sinais de perfusão obtidos na face ventral do braço, a amplitude da FFT aumenta com a distância entre as fibras, mas no entanto não diminui com o comprimento de onda.

Da comparação das FFTs obtidas nas duas regiões da pele, constata-se que as frequências mais baixas ( $<0,4$  Hz) têm maiores amplitudes nos sinais de perfusão sanguínea recolhidos na palma da mão do que nos sinais de perfusão recolhidos na face ventral do braço. Esta diferença entre as duas regiões de pele analisadas é uma consequência da diferente arquitectura vascular presente nos dois locais, pois na palma da mão há uma maior densidade de capilares e AVAs do que na face ventral do braço. As amplitudes maiores obtidas nas baixas frequências para a perfusão medida na palma da mão deve-se principalmente ao facto de os AVAs serem muito influenciados pela actividade neurogénica [0,006-0,02] Hz [119].

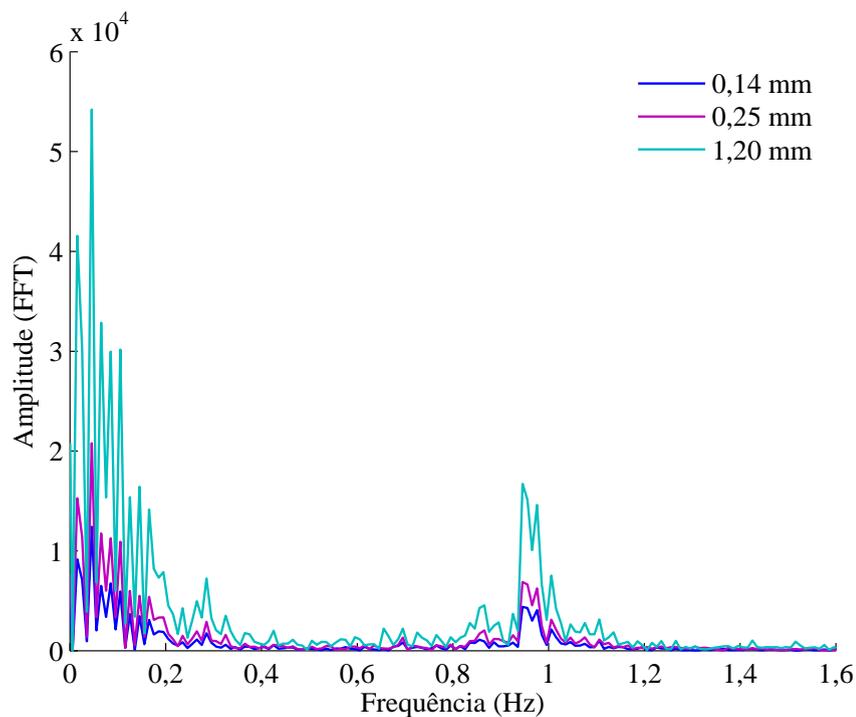


FIGURA 5.40: Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na palma da mão de um participante, durante o fluxo basal com o PF5000.

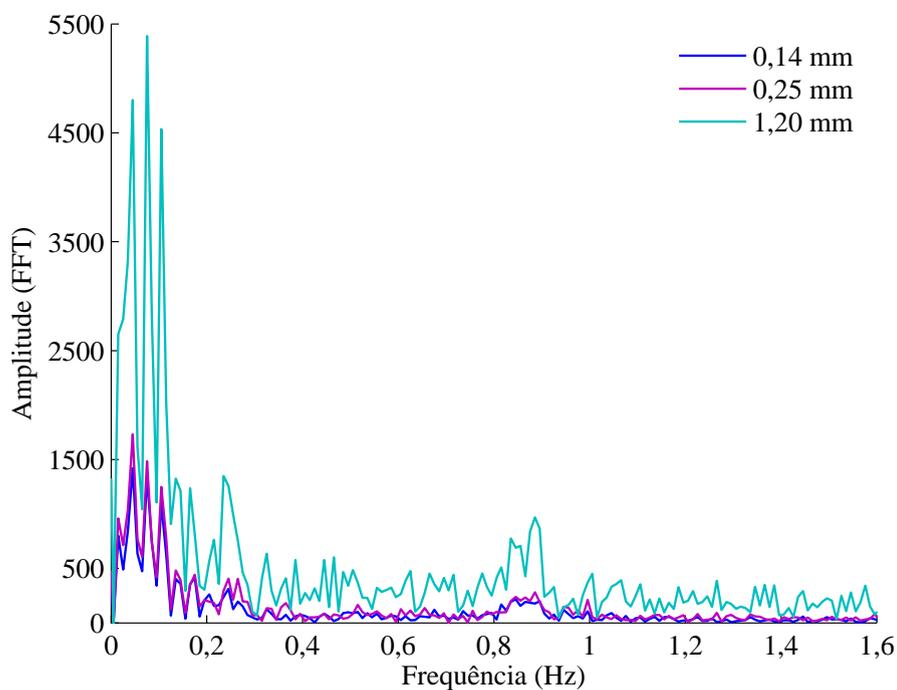


FIGURA 5.41: Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na palma da mão de um participante, durante o fluxo basal com o CO635.

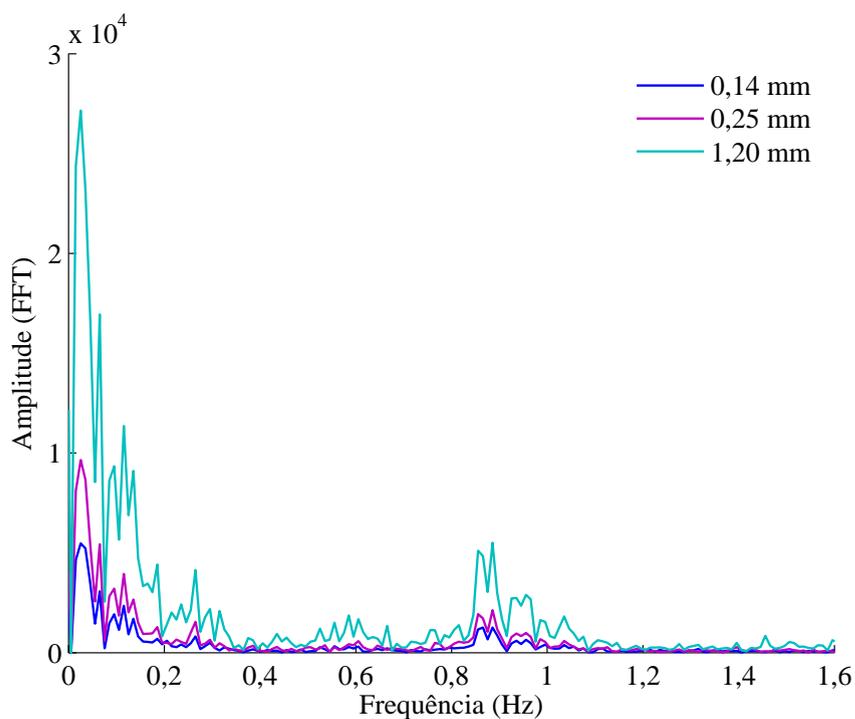


FIGURA 5.42: Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na palma da mão de um participante, durante o fluxo basal com o CO785.

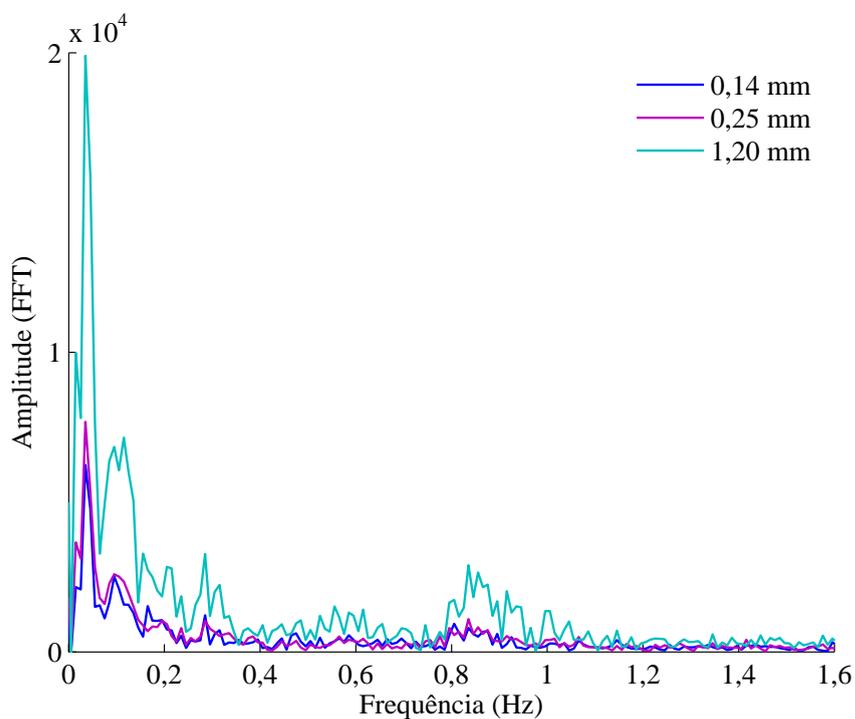


FIGURA 5.43: Transformada de Fourier do sinal de perfusão sanguínea recolhido na palma da mão de um participante, durante o fluxo basal com o CO830.

A potência total e a potência relativa de cada intervalo de frequência, das 5 bandas de frequência que representam o batimento cardíaco (I: 0,4-1,6 Hz), a frequência respiratória (II: 0,15-0,4 Hz), a actividade miogénica (III: 0,006-0,15 Hz), a actividade neurogénica (IV: 0,02-0,06 Hz) e a actividade endotelial (V: 0,0095-0,02 Hz), presentes na perfusão sanguínea medida na face ventral do braço e na palma da mão com o protótipo desenvolvido, estão sumariadas nas tabelas 5.25 e 5.26, respectivamente.

TABELA 5.25: Valores medianos da potência medida nas 5 bandas de frequência analisadas (I, II, III, IV e V), obtidas nos sinais de perfusão sanguínea adquiridos na face ventral do braço, durante o fluxo basal, para as diferentes distâncias entre as fibras emissora e receptora.

CO (nm)	DF (mm)	Potência relativa					Potência total
		V	IV	III	II	I	
635	0,14	0,06	0,15	0,23	0,12	0,45	61,20
	0,25	0,04	0,11	0,15	0,11	0,58	168,05
	1,20	0,09	0,12	0,15	0,17	0,47	5.705,58
785	0,14	0,11	0,14	0,25	0,08	0,42	395,49
	0,25	0,02	0,16	0,24	0,06	0,53	1.571,65
	1,20	0,04	0,12	0,31	0,04	0,49	12.901,71
830	0,14	0,10	0,19	0,20	0,21	0,30	114,86
	0,25	0,17	0,18	0,19	0,12	0,35	128,14
	1,20	0,28	0,15	0,22	0,06	0,29	611,84

Na tabela 5.25 constata-se que o intervalo de frequência I tem a maior contribuição em termos de potência relativa no sinal de perfusão sanguínea registado na face ventral do braço. Também pode ver-se que a potência total aumenta com a distância entre as fibras emissora e receptora para cada comprimento de onda. Uma vez que a potência total para os cinco intervalos está correlacionada com a magnitude da perfusão sanguínea medida [118], o aumento da potência total deve-se provavelmente ao maior volume de tecido (e de sangue) monitorizado com as fibras detectoras localizadas a distâncias maiores da fibra emissora.

TABELA 5.26: Valores medianos da potência medida nas 5 bandas de frequência analisadas (I, II, III, IV e V), obtidas nos sinais de perfusão sanguínea adquiridos na palma da mão, durante o fluxo basal, para as diferentes distâncias entre as fibras emissora e receptora.

CO (nm)	DF (mm)	Potência relativa					Potência total
		V	IV	III	II	I	
635	0,14	0,29	0,50	0,16	0,02	0,03	6.806,29
	0,25	0,36	0,37	0,21	0,01	0,05	19.809,13
	1,20	0,33	0,39	0,22	0,02	0,03	223.190,57
785	0,14	0,17	0,54	0,22	0,02	0,05	7.313,63
	0,25	0,15	0,54	0,21	0,03	0,07	26.803,62
	1,20	0,12	0,62	0,19	0,02	0,05	216.009,14
830	0,14	0,15	0,41	0,22	0,10	0,12	23.151,84
	0,25	0,19	0,37	0,26	0,04	0,13	51.170,69
	1,20	0,20	0,45	0,29	0,02	0,04	415.031,85

Na tabela 5.26, onde são apresentadas a potência total e a potência relativa de cada intervalo de frequência presente na perfusão sanguínea medida na palma da mão, pode ver-se que a banda de frequência com maior potência espectral relativa é a correspondente à actividade neurogénica (IV). Esta diferença está relacionada com as arquitecturas distintas da microcirculação presente nas duas regiões. Como já foi referido, a rede microcirculatória da pele da pele da mão tem uma maior densidade de AVAs, e estas estruturas são influenciadas pela actividade neurogénica [119]. Pelo contrário, na face ventral do braço, existem vasos maiores, onde a frequência cardíaca tem um impacto maior [118, 119]. Tal como acontece para a perfusão medida na face ventral do braço, a potência total aumenta com a distância entre as fibras emissora e receptora para cada comprimento de onda. No entanto, valores diferentes de potência relativa em cada intervalo de frequência foram obtidos para as diferentes distâncias de fibras e comprimentos de onda, na perfusão sanguínea medida no braço e na palma da mão, o que sugere que diferentes magnitude de fluxo sanguíneo são medidas.

A coerência média obtida, durante o fluxo basal e o zero biológico, nos sinais de perfusão sanguínea medidos na face ventral do braço estão apresentados nas tabelas

5.27 e 5.28. Nos dois casos, foi obtida dependência significativa elevada nos sinais de perfusão para o intervalo de frequência mais baixo, correspondente à actividade endotelial, onde valores próximos de 1 foram obtidos. Resultados semelhantes foram apresentados por Clough *et al.* [118].

TABELA 5.27: Coerência média entre os sinais de perfusão sanguínea obtidos com diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora, durante o fluxo basal e o zero biológico, medidos na face ventral do braço.

	CO (nm)	Fluxo Basal					Zero Biológico				
		V	IV	III	II	I	V	IV	III	II	I
D0.14 vs. D0.25	635	1,00	0,85	0,69	0,32	0,28	1,00	1,00	0,88	0,20	0,18
	785	1,00	0,80	0,66	0,30	0,37	0,99	0,99	0,77	0,19	0,16
	830	0,98	0,64	0,39	0,20	0,24	0,96	0,95	0,53	0,20	0,18
D0.25 vs. D1.20	635	1,00	0,89	0,69	0,34	0,24	1,00	1,00	0,93	0,25	0,17
	785	1,00	0,88	0,80	0,37	0,46	1,00	1,00	0,88	0,33	0,18
	830	0,99	0,54	0,11	0,17	0,14	0,99	0,99	0,75	0,19	0,16
D0.14 vs. D1.20	635	1,00	0,83	0,64	0,30	0,25	1,00	1,00	0,88	0,26	0,18
	785	1,00	0,76	0,59	0,26	0,40	0,99	0,99	0,80	0,24	0,20
	830	0,98	0,66	0,36	0,21	0,27	0,98	0,97	0,61	0,19	0,23

A coerência média obtida para diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora, durante o fluxo basal e o zero biológico, nos sinais de perfusão sanguínea medidos na face ventral do braço (tabela 5.27), é superior a 0,50 para as bandas de frequência V, IV e III, com excepção do intervalo III para o CO830 na perfusão medida durante o fluxo basal. Nas bandas de frequência II e I foi obtida uma coerência baixa, o que indica que diferentes fibras colectoras medem fluxos sanguíneos diferentes ou que a sua relação não é linear. Um facto a destacar é o da coerência ser geralmente inferior para o CO830, o que pode estar relacionado com o facto deste comprimento de onda monitorizar um maior volume da microcirculação. Se compararmos os valores de coerência obtidos da perfusão medida durante o fluxo basal e o zero biológico, pode ver-se que coerências maiores foram obtidas para a perfusão medida durante o zero biológico para os intervalos de frequência IV e III, e valores inferiores foram obtidos nos intervalos de frequência II e I. Durante a oclusão os esfíncteres pré-capilares relaxam, aguardando pelo regresso do

fluxo sanguíneo. Simultaneamente, um mecanismo de regulação de pressão está activo, de modo a prevenir danos nos capilares sanguíneos quando o fluxo sanguíneo é libertado [120]. Estes processos fisiológicos explicam porque é que há uma grande coerência nas bandas de frequência correspondentes à actividade miogénica e neurogénica, ambas responsáveis pela regulação da pressão sanguínea, durante a oclusão.

TABELA 5.28: Coerência média entre os sinais de perfusão sanguínea medidos na face ventral do braço com diferentes comprimentos de onda, durante o fluxo basal e o zero biológico.

	DF (mm)	Fluxo Basal					Zero Biológico				
		V	IV	III	II	I	V	IV	III	II	I
CO635 vs. CO785	0,14	0,99	0,57	0,15	0,16	0,14	0,99	0,99	0,80	0,17	0,18
	0,25	1,00	0,59	0,14	0,20	0,14	1,00	1,00	0,84	0,19	0,15
	1,20	1,00	0,63	0,18	0,24	0,14	1,00	1,00	0,87	0,18	0,14
CO635 vs. CO830	0,14	0,97	0,51	0,14	0,14	0,13	0,98	0,97	0,58	0,17	0,16
	0,25	0,99	0,53	0,12	0,14	0,13	0,98	0,97	0,59	0,14	0,16
	1,20	0,99	0,53	0,13	0,18	0,13	0,99	0,99	0,76	0,16	0,18
CO785 vs. CO830	0,14	0,97	0,52	0,17	0,13	0,13	0,98	0,97	0,59	0,14	0,19
	0,25	0,98	0,55	0,18	0,13	0,12	0,97	0,96	0,58	0,10	0,16
	1,20	0,99	0,54	0,10	0,10	0,12	0,99	0,98	0,75	0,13	0,14

A coerência média obtida para diferentes comprimentos de onda, durante o fluxo basal e o zero biológico, nos sinais de perfusão sanguínea medidos na face ventral do braço (tabela 5.28), é superior a 0,51 para as bandas de frequência V e IV. Para as outras bandas de frequência (III, II e I) foram obtidas coerência baixas ( $<0.24$ ) para todas as distâncias entre fibras, o que pode indicar fluxos sanguíneos com propriedades diferentes são monitorizados. Valores de coerência maiores foram obtidos na perfusão medida durante o zero biológico nos intervalos IV e III. Este aumento de coerência nas referidas bandas é devido a processos fisiológicos que ocorrem durante a oclusão descritos anteriormente.

A coerência média, dos intervalos de frequência de interesse, presentes na perfusão sanguínea medida na palma da mão durante o fluxo basal e o zero biológico também foi avaliada (ver tabelas 5.29 e 5.30).

TABELA 5.29: Coerência média entre os sinais de perfusão sanguínea medidas na palma da mão com diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora, durante o fluxo basal e o zero biológico.

	CO (nm)	Fluxo Basal					Zero Biológico				
		V	IV	III	II	I	V	IV	III	II	I
D0.14 vs. D0.25	635	1,00	0,98	0,93	0,62	0,41	1,00	1,00	0,89	0,28	0,24
	785	1,00	0,97	0,89	0,56	0,44	1,00	0,99	0,85	0,16	0,20
	830	0,99	0,77	0,67	0,40	0,31	0,93	0,91	0,57	0,28	0,20
D0.25 vs. D1.20	635	1,00	0,92	0,81	0,44	0,29	1,00	1,00	0,89	0,21	0,21
	785	1,00	0,97	0,85	0,60	0,45	1,00	1,00	0,89	0,29	0,20
	830	0,94	0,40	0,11	0,18	0,14	0,94	0,94	0,68	0,14	0,18
D0.14 vs. D1.20	635	1,00	0,90	0,76	0,42	0,30	1,00	1,00	0,86	0,18	0,16
	785	1,00	0,97	0,84	0,57	0,42	1,00	1,00	0,83	0,26	0,22
	830	0,99	0,77	0,65	0,33	0,27	0,94	0,93	0,58	0,17	0,20

A coerência média obtida para diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora, durante o fluxo basal e o zero biológico, nos sinais de perfusão sanguínea medidos na palma da mão é elevada para os intervalos de frequência V, IV e III, para o CO635 e CO785 (ver tabela 5.29). Tal como no caso da braço, valores menores de coerência foram obtidos para o CO830. Para este comprimento de onda coerências elevadas foram obtidas apenas no intervalo de frequência V. As bandas de frequência II e I tem diferentes ordens de magnitude na perfusão medida durante o fluxo basal e a oclusão. Nestes intervalos a coerência na linha basal oscila entre 0.62-0.56 e 0.45-0.29 (excepto para CO830), respectivamente, enquanto que no zero biológico oscila entre 0.29-0.16 e 0.24-0.20 (excepto para CO830). Estes baixos valores de coerência obtidos para o zero biológico podem ter origem em fenómenos fisiológicos que ocorrem durante a oclusão arterial.

A coerência média obtida para diferentes comprimentos de onda, durante o fluxo basal e o zero biológico, nos sinais de perfusão sanguínea medidos na palma da mão (ver tabela 5.30) é elevada, principalmente no intervalo correspondente à actividade endotelial em todas as situações. Foram obtidas coerências maiores nos intervalos IV e III na perfusão medida durante a oclusão, quando comparada com

as coerências obtidas para a perfusão medida durante o fluxo basal. Estas diferenças também foram obtidas nas perfusões medidas na face ventral do braço, reforçando o facto de que durante a oclusão processos fisiológicos relacionados com essas bandas de frequência ocorrem [120].

TABELA 5.30: Coerência média entre os sinais de perfusão sanguínea medidas na palma da mão com diferentes comprimentos de onda, durante o fluxo basal e o zero biológico.

	DF (mm)	Fluxo Basal					Zero Biológico				
		V	IV	III	II	I	V	IV	III	II	I
CO635 vs. CO785	0,14	0,95	0,45	0,17	0,18	0,16	0,99	0,99	0,75	0,13	0,18
	0,25	0,96	0,47	0,16	0,15	0,14	0,99	0,99	0,84	0,13	0,16
	1,20	0,98	0,51	0,16	0,18	0,16	1,00	1,00	0,89	0,14	0,15
CO635 vs. CO830	0,14	0,93	0,43	0,16	0,14	0,13	0,94	0,93	0,54	0,15	0,18
	0,25	0,93	0,40	0,13	0,16	0,13	0,94	0,93	0,73	0,16	0,16
	1,20	0,95	0,42	0,09	0,16	0,14	0,94	0,94	0,68	0,15	0,17
CO785 vs. CO830	0,14	0,94	0,42	0,17	0,12	0,13	0,94	0,93	0,60	0,14	0,18
	0,25	0,94	0,41	0,16	0,14	0,14	0,95	0,94	0,68	0,17	0,15
	1,20	0,94	0,43	0,13	0,18	0,14	0,95	0,94	0,66	0,17	0,16

Um facto a destacar é o de coerências maiores serem atingidas quando estão a ser comparadas perfusões sanguíneas obtidas com diferentes distâncias entre as fibras emissora e receptora (tabelas 5.29 e 5.29) do que quando são comparados perfusões obtidas com diferentes comprimentos de onda (tabelas 5.28 e 5.30). Isto pode ser um indicador de que a utilização de diferentes comprimentos de onda para monitorização das diferentes camadas microcirculatórias da pele é mais eficaz do que a utilização de diferentes distâncias entre fibras.

## 5.7 Conclusões

Foi obtida uma boa concordância entre os resultados obtidos, na solução padrão de motilidade e no disco de calibração, com o protótipo construído e com o fluxómetro comercial. O único aspecto menos positivo foi o facto de os valores obtidos no disco de calibração, nas medições realizadas com o protótipo, se afastarem do zero. No entanto

os resultados obtidos no disco com o PF5000, em dias diferentes, também variavam bastante, embora essas variações tenham sido em geral maiores para o protótipo.

Nas simulações Monte Carlo foram obtidos resultados que estão de acordo com os resultados apresentados na literatura, tanto nas simulações efectuadas num modelo do fantoma, como nas efectuadas num modelo da pele humana. No caso das simulações efectuadas num modelo do fantoma, foi obtida uma boa concordância com as expectativas teóricas, pois a profundidade média e M1 aumentam com a concentração e com as distâncias entre as fibras emissora e receptora. No que diz respeito às simulações realizadas num modelo da pele humana os parâmetros estimados estão de acordo com as expectativas iniciais. Neste caso foi demonstrado que, a profundidade média atingida pelos fotões aumenta com o aumento do comprimento de onda da luz laser (na gama dos 635-830 nm), assim como com o aumento da distância entre fibras.

No que diz respeito aos resultados *in vitro*, em geral, houve concordância entre os resultados obtidos com os dois fluxómetros (PF5000 e o protótipo). Nos dois sistemas a perfusão sanguínea aumenta com o aumento da velocidade e da concentração dos dispersores, tal como previsto nas simulações. Para além disso, também foi demonstrado que a perfusão aumenta linearmente com a velocidade dos dispersores, tal como os princípios teóricos indicam. Algumas excepções ocorreram principalmente no fantoma de teflon®, resultantes de dificuldades de posicionamento da sonda na superfície do mesmo. Os valores de perfusão obtidos, para as mesmas condições, nos dois fluxómetros não foram iguais, uma vez que estamos a comparar equipamentos diferentes.

Os resultados obtidos *in vivo* com o novo protótipo estão de acordo com a literatura e estão bem correlacionados com as medições efectuadas com o fluxómetro comercial. Os sinais de perfusão sanguínea monitorizados com diferentes comprimentos de onda e com diferentes distâncias entre as fibras emissora e receptora, revelaram diferenças durante o fluxo basal e durante as perturbações infligidas ao fluxo sanguíneo local. Uma tendência clara, nas diferentes situações avaliadas (fluxo basal, BZ e pHRPO) acontece quando diferentes distâncias entre fibras são comparadas, mas o mesmo não ocorre quando diferentes comprimentos de onda são analisados. Para além disso, o facto da perfusão medida durante o BZ ser inferior no PF5000, sugere que este fluxómetro tem um mecanismo de redução de ruído mais eficiente. No que diz respeito às fracções de perfusão, foram encontradas semelhanças entre o fluxómetro comercial e o CO785, o que indica que ambos monitorizam volumes semelhantes de perfusão sanguínea. Os resultados indicam

também que o efeito da variação do comprimento de onda, nas medições da perfusão, é mais evidente para as menores distâncias entre fibras emissora e receptora e que há uma maior diferença entre a perfusão medida por diferentes distâncias entre fibras para o menor comprimento de onda.

Teoricamente, e nas simulações, diferentes camadas de pele são monitorizadas por diferentes comprimentos de onda e por diferentes distâncias entre fibras emissora e receptora, por isso a distinção entre a perfusão sanguínea superficial e a perfusão profunda é possível. No entanto, na perfusão medida *in vivo*, não existe uma separação clara da perfusão proveniente dos diferentes compartimentos sanguíneos presentes na pele.

Quanto à análise no domínio das frequências, ela vem provar que a perfusão sanguínea medida com diferentes comprimentos de onda e diferentes distâncias entre fibras são diferentes, uma vez que foram obtidas coerências espectrais menores quando se comparam perfusões obtidas com diferentes comprimentos de onda. Estas diferenças poderão estar relacionadas com o facto de diferentes comprimentos de onda medirem fluxo sanguíneo com diferentes características, *i. e.*, presente nas diferentes camadas da rede microcirculatória cutânea. Os resultados também demonstraram que a perfusão sanguínea cutânea obtida na face ventral do braço contém informação diferente da perfusão registada na palma da mão.

## Capítulo 6

# Estudos realizados em sinais obtidos na pele por FLD

*Neste capítulo são descritos dois estudos independentes realizados sobre sinais de perfusão sanguínea, obtidos com um fluxómetro laser Doppler comercial. O primeiro estudo mostra que sinais de FLD recolhidos, em diferentes regiões da pele e em participantes saudáveis, apresenta diferenças significativas. O segundo mostra que sinais de FLD recolhidos antes e durante o aquecimento cutâneo local, em participantes saudáveis, pacientes com fenómeno de Raynaud e pacientes com esclerose sistémica, apresentam uma regularidade diferente.*

### **6.1 Análise no domínio dos tempos e no domínio das frequências de sinais de FLD recolhidos na pele glabra e na pele não glabra**

A análise no domínio dos tempos e no domínio das frequências de sinais de FLD recolhidos na pele glabra e na pele não glabra tem como objectivo clarificar a influência que as diferenças na anatomia vascular, na espessura da pele ou no controlo fisiológico existentes nas duas regiões, têm nos sinais de perfusão sanguínea. Para isso, foram recolhidos sinais em voluntários saudáveis, com um fluxómetro comercial, em simultâneo na palma de mão e na face ventral do braço. Para a avaliação dos resultados efectuou-se a sua análise no domínio dos tempos e no domínio das frequências [5].

### **6.1.1 Diferenças fisiológicas entre pele glabra e não glabra**

A pele glabra pode ser encontrada nos dedos da mão ou dos pés, nas unhas, na palma da mão, na base dos pés e no lóbulo da orelha, enquanto que a pele não glabra pode ser encontrada, por exemplo, no braço.

Existem diferenças no que diz respeito à fisiologia do fluxo microcirculatório presente na pele glabra e na pele não glabra. A diferença mais evidente é a alta densidade de AVAs e de capilares na pele glabra, característica que não está presente noutras regiões de pele [6]. Para além disso, existem diferenças na anatomia, histologia e fisiologia das artérias e capilares presentes nestes dois tipos de pele.

No que diz respeito ao controlo reflexo do fluxo microcirculatório na pele, existem diferenças quando estas duas regiões de pele são comparadas: na pele não glabra o fluxo é mediado por nervos vasoconstrictores adrenérgicos e por um sistema vasodilatador activo, enquanto que na pele glabra ele é mediado pelo sistema nervoso noradrenérgico [121]. Os AVAs, presentes na pele, são densamente enervados por fibras vasoconstritoras do sistema simpático [122]. Para além disso, foi demonstrado que a perfusão sanguínea na pele glabra tem capacidades auto-regulatórias. O mesmo não acontece na pele não glabra [121]. O fluxo cutâneo de sangue apresenta flutuações temporais e espaciais. As oscilações rítmicas temporais dos sinais de FLD reflectem a variabilidade e a adaptabilidade do sistema microcirculatório às alterações nas condições hemodinâmicas [123]. Para além disso foi documentado a existência de um padrão característico de flutuações grandes e espontâneas no fluxo sanguíneo na pele glabra [124–128]. De acordo com alguns autores, estas flutuações são causadas pela abertura e fecho síncrono dos AVAs pois eles são densamente enervados por fibras vasoconstritoras mediadas pelo sistema simpático [122].

### **6.1.2 Métodos**

#### **6.1.2.1 Protocolo de medição**

Foram recolhidos sinais de perfusão na palma da mão e na face ventral do braço, em 13 participantes saudáveis, com idades compreendidas entre os 21 e os 44 anos. As medições tiveram lugar numa sala à temperatura ambiente, com os participantes na posição deitada, após 10 minutos de aclimatização. O fluxómetro utilizado para efectuar

as medições foi o Periflux 5000 (da Perimed<sup>®</sup>, Suécia). Para as medições foi utilizada uma constante temporal de 0,2 s e os sinais foram adquiridos com uma taxa de perfusão de 20 Hz. Os dois sinais foram adquiridos simultaneamente, com uma das sondas posicionada na face ventral do braço direito, e a outra sonda colocada na palma da mão direita. As aquisições tiveram a duração mínima de 5 minutos. Sinais recolhidos simultaneamente na palma da mão e na face ventral do braço estão representados na figura 6.1 [5].

Todos os participantes foram informados acerca do protocolo de aquisição e deram o seu consentimento por escrito.

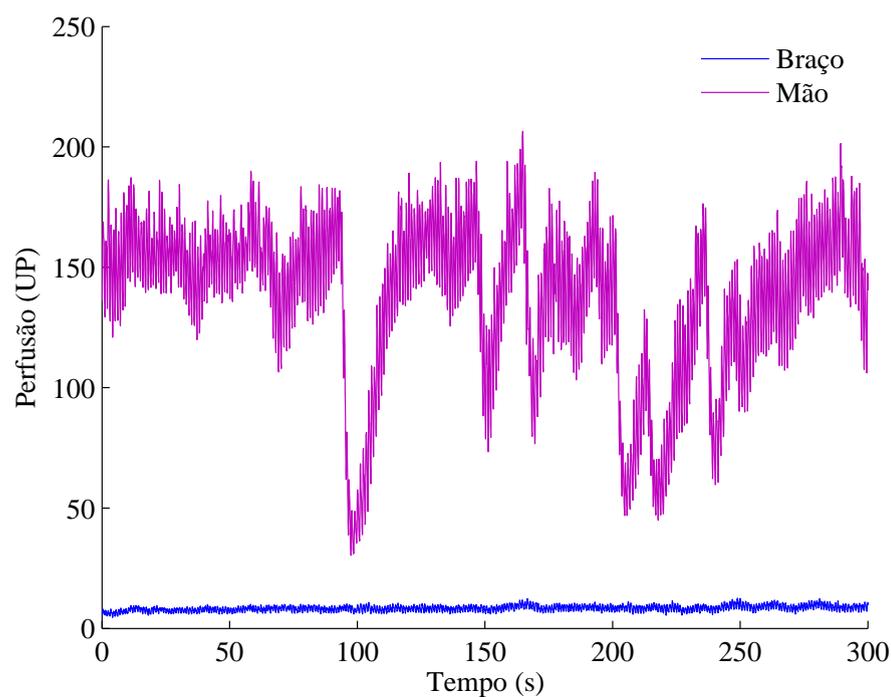


FIGURA 6.1: Sinais de perfusão sanguínea obtidos, em simultâneo na face ventral do braço (curva violeta) e na palma da mão (curva preta), num participante saudável.

### 6.1.2.2 Processamento de sinal

Para o processamento de sinal, foi realizada a análise no domínio dos tempos e no domínio das frequências de segmentos de sinal com 6000 pontos (equivalente a 5 minutos de sinal adquirido). Para a análise no domínio das frequências, foi calculado o espectro de potência e foram analisadas as propriedades da lei de potência. Estas propriedades são determinadas quando a forma geral do espectro de potência é uma curva que decai sem

um pico eminente. Neste caso, a relação entre a potência e a frequência é de:

$$EP(f) \sim f^{-\beta}, \quad (6.1)$$

onde  $EP$  representa o espectro de potência e  $f$  a frequência. Num gráfico *log-log*, a equação 6.1 pode resultar numa linha recta com declive  $\beta$ . Para estes sinais, os dados podem ser considerados fractais, isto é, a série temporal revela similaridade própria ou independência de escala. A similaridade própria significa que um detalhe tem as mesmas características independentemente da escala a que o sinal é observado. Quando a escala temporal é alterada por um factor  $m$ , a distribuição estatística da série permanece inalterada por um factor  $m^H$ , onde  $H$  é o chamado expoente de Hurst. A independência de escala representa a irregularidade da série temporal. Os métodos fractais estão entre aqueles usados para mostrar correlações de longo alcance, *i. e.*, correlações que se mantêm para grandes distâncias temporais [5]. No que se segue, a média de cada sinal foi subtraída e o resultado foi dividido pelo desvio padrão (DP) do sinal original antes do cálculo do espectro de potência, com o objectivo de se evidenciar apenas as oscilações dos dados.

### 6.1.3 Resultados e discussão

A visualização dos resultados obtidos, nas duas zonas de pele (ver figura 6.1), revela que a amplitude média dos sinais de FLD, recolhidos na palma da mão, são geralmente superiores à amplitude média dos sinais obtidos na face ventral do braço. Este facto já tinha sido mencionado por outros autores, como por exemplo, Freccero *et al.* (2003) [129]. Para além disso, observa-se que as variações de amplitude dos sinais de FLD recolhidos na palma da mão são mais elevadas do que as variações de amplitude dos sinais recolhidos na face ventral do braço. Em média, para os 13 participantes, as variações de amplitude foram de 69,5 e de 13,5 UP para os sinais recolhidos na palma da mão e na face ventral do braço, respectivamente.

Na figura 6.2 podem ver-se os espectros de potência, em escala logarítmica, obtidos nos sinais de FLD recolhidos num dos participantes.

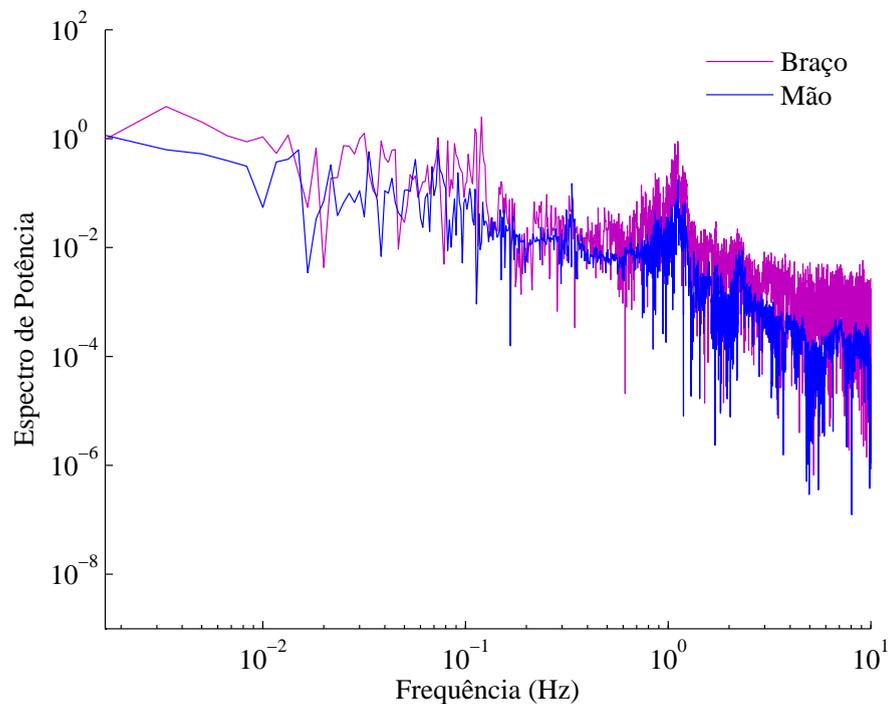


FIGURA 6.2: Espectros de potência dos sinais de FLD obtidos, na face ventral do braço (curva violeta) e na palma da mão (curva preta), num participante saudável.

Em todos os espectros de potência obtidos, observa-se um pico de potência a 1 Hz, para os sinais de perfusão sanguínea recolhidos nas duas regiões analisadas. Este pico é coincidente na frequência para os dois sinais, recolhidos simultaneamente e provavelmente tem origem central, estando relacionado com a frequência cardíaca. Para além disso, outro pico é visível em torno dos 0,3 Hz; presente nos dois sinais recolhidos simultaneamente. Este pico pode ter origem na frequência respiratória [5].

O espectro de potência também revela três regiões com declives diferentes, nos sinais recolhidos nas duas regiões de pele analisadas. As alterações nos declives ocorrem a 1 e a 5 Hz. Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Popivanov *et al.* (1999) [130], e revelam que os sinais de FLD podem apresentar independência na escala. Isto já tinha sido previsto por outros autores [130]. No entanto, os declives das três regiões são diferentes para as duas regiões de pele estudadas. Já tinham sido realizados estudos espectrais em sinais recolhidos no sistema cardíaco central (variação da taxa cardíaca) e foram obtidas as mesmas conclusões que as aqui apresentadas (ver por exemplo Ivanov *et al.* (2001) [131] e as suas referências).

## 6.2 Estudo da entropia nos sinais de FLD recolhidos em participantes saudáveis e em pacientes

Diferentes técnicas de processamento de sinal, aplicadas a sinais de FLD, podem fornecer informação importante para a compreensão da função microvascular em pacientes com determinadas doenças, como por exemplo fenómeno de Raynaud (FR) e esclerose sistémica (SSc). O FR manifesta-se com vasoespasmos recorrentes nos dedos das mãos e dos pés, que normalmente ocorrem como resposta ao stress, exposição ao frio, ou eventos emocionais. O FR pode ser classificado como primário ou secundário. Neste último caso o FR surge relacionado com doenças do tecido conectivo, como por exemplo a SSc. A fisiopatologia do FR é multifactorial e complexa, envolvendo anomalias vasculares e neuronais [132, 133]. No caso de pacientes com SSc, surgem anomalias na estrutura dos micro-vasos [134]. Para além disso, anomalias funcionais foram descritas quando foram aplicados testes reactivos a estes pacientes, como por exemplo, o aquecimento local da área a ser monitorizada [6, 22].

Visto que doenças como o FR e a SSc afectam a microcirculação cutânea de diferentes formas, o objectivo principal deste trabalho é o de testar o modo como estas doenças modificam a regularidade dos sinais de FLD. Para isso, a entropia de sinais de perfusão sanguínea recolhidos em pacientes (com FR e SSc) foi processada e comparada com a entropia obtida em participantes saudáveis. Os objectivos secundários deste estudo assentam na comparação de sub-grupos de pacientes com diferentes tipos de SSc e no acesso à influência das cicatrizes na entropia. Também foi estudada a regularidade dos sinais de FLD depois do aquecimento local, para os vários grupos de participantes estudados. Finalmente foi testada a reprodutibilidade dos dados obtidos [7].

### 6.2.1 Métodos

#### 6.2.1.1 Protocolo de medição

Um grupo de 108 participantes, dos quais 27 eram saudáveis (controlo), 28 eram pacientes com FR, e 53 eram pacientes com SSc, foram incluídos neste estudo. A idade média dos participantes foi de 52 anos (DP igual a 10,8), e 86% eram mulheres. Em termos de grupo, a idade média foi de 49,5 (7,6); 49,5 (6,5) e 53 (12,6) nos grupos de controlo, pacientes com FR e SSc, respectivamente, e 81%, 78% e 89% eram mulheres. O índice de

massa corporal foi de 21,3 (2,8); 22,4 (2) e 21,7 (3,5) nos grupos de controlo, pacientes com FR e SSc, respectivamente.

Os pacientes com SSc foram classificados segundo o critério de LeRoy e Medsger: SSc limitada (lSSc - associada ao FR, SSc com padrão capilar periungueal, e SSc selectiva a auto-anticorpos), SSc cutânea limitada [lcSSc - alterações cutâneas mais distais (periféricas)] e SSc difusa [dSSc - alterações cutâneas proximais (centrais)] [135]. Entre os pacientes com SSc, 10 tinham lSSc, 37 tinham lcSSc e 6 tinham dSSc.

Para todos os participantes, critérios de exclusão incluíram sujeitos fumadores, com diabetes mellitus, hipercolesterolemia, ou outra doença severa (cancro, falha cardíaca e pulmonar, infarte no miocárdio e angina peitoral). Foi obtida aprovação do Institutional Review Board de Grenoble, e cada participante deu o consentimento por escrito antes da realização das medições. As medições foram realizadas com os sujeitos deitados numa marquesa, numa sala com temperatura controlada ( $23 \pm 1$  °C). Depois de 10 minutos de repouso, o fluxo sanguíneo foi monitorizado continuamente com sondas termostáticas de FLD (sonda 457 e Periflux 5000 da Perimed®, Suécia). Foram colocadas duas sondas em cada participante, uma no dedo médio, na almofada da falange distal, da mão esquerda, e a outra na face ventral do braço a mais de 5 cm do cotovelo e do pulso. As duas sondas não foram colocadas em cima de vasos sanguíneos visíveis. No caso do grupo de pacientes com FR, em três pacientes foram apenas recolhidos sinais no dedo da mão. Depois de 5 minutos de aquisição da perfusão na mão, a pele foi aquecida localmente a 42 °C durante 30 min. As aquisições foram efectuadas simultaneamente nos dois locais (braço e ponta do dedo).

A perfusão sanguínea foi adquirida em UP, com uma taxa de perfusão de 32 Hz (esta frequência de amostragem é 10 vezes maior que a maior frequência contida nos sinais de FLD). Os sinais foram digitalizados e adquiridos com um software de processamento de sinal adequado (PeriSoft 2.5.5 da Perimed®).

Depois da aquisição, e para cada sujeito, oito segmentos de sinal foram considerados: dois segmentos de 62,5 s foram escolhidos antes do aquecimento, com um minuto de aquisição a separar os dois segmentos, obtidos simultaneamente nos dois locais de pele analisados; e dois segmentos de 62,5 s foram escolhidos depois de 25 minutos de aquecimento a 42 °C (simultaneamente no braço e na mão, ainda durante o aquecimento). De novo, um minuto de aquisição separa os dois segmentos. Foi determinada a entropia para cada um destes segmentos.

### 6.2.1.2 Processamento de sinal

A entropia aproximada (ApEn) quantifica a regularidade de séries temporais [136]. Ela reflecte a probabilidade de que padrões de observações similares não serão seguidos por observações adicionais similares. Quando existem muitos padrões repetidos numa série temporal, esta tem uma ApEn relativamente baixa, enquanto que uma série temporal menos previsível, *i. e.*, proveniente de um processo mais complexo, tem uma ApEn maior. A ApEn é o logaritmo natural negativo da probabilidade condicional de sequências de  $m$  pontos semelhantes, se manterem semelhantes para um ponto adicional [7].

A ApEn tem sido usada em estudos cardiovasculares, no entanto ela apresenta alguns problemas, nomeadamente a sua dependência do tamanho da amostra e a sua falta de consistência relativa [137, 138]. Estes inconvenientes resultaram na escolha da entropia amostral (*sample entropy* - SampEn) para este estudo. Neste caso, tal como para a ApEn, valores baixos de SampEn reflectem um grau elevado de regularidade (mais similaridades existem na série temporal), enquanto que sinais aleatórios tem valores elevados de SampEn. A SampEn, utiliza três parâmetros, sendo eles, o  $m$ , o  $r$  e o  $N$ , e é definida como o logaritmo natural negativo da probabilidade condicional que um conjunto de dados de tamanho  $N$ , que tendo-se repetido dentro de uma tolerância  $r$  para  $m$  pontos, também se vão repetir eles próprios para  $m+1$  pontos, sem permitir auto-coincidências [138]. A SampEn baseia-se no logaritmo natural negativo da probabilidade associada à série temporal como um todo. Comparando com a ApEn, a SampEn tem a vantagem de ser menos dependente do tamanho da série temporal, e apresenta consistência relativa em circunstâncias onde a ApEn não apresenta [137–139].

A escolha dos valores de  $m$  e  $r$  são críticos na determinação dos resultados. Segundo as várias regras existentes, os valores de  $r$  deverão estar entre 0,1 e 0,25 e os valores de  $m$  entre 1 e 2 para dados com o valor  $N$  entre 100 a 5000 pontos [140–142]. De acordo com Wolf *et al.* (1985) [143], o número de pontos deve estar dentro do intervalo entre  $10^m$  e  $30^m$ . Pincus (1991) [144] sugeriu que para  $m = 2$  e  $N = 1000$ ,  $r$  deveria estar entre 0,1 e 0,2 do desvio padrão (DP) do conjunto dos dados. Com base nestes e noutros trabalhos [140, 143, 145], foram escolhidos  $m = 2$ ,  $N = 1000$  amostras (janelas de 1000 pontos que percorrem o segmento de sinal com 62,5 s), e  $r = 0,2 \times DP$ , visto ser conveniente que a tolerância  $r$  seja proporcional ao DP de modo a permitir que diferentes conjuntos de dados, com diferentes amplitudes, possam ser comparados. De

modo equivalente, todas as séries temporais utilizadas foram normalizados de modo a que  $DP = 1$ , e subsequentemente  $r = 0,2$ .

### 6.2.1.3 Análise estatística

Os dados foram expressos em termos de média e de DP entre parêntesis. Comparações entre grupos foram realizadas com a análise de variância (ANOVA), depois de verificada a normalidade e a homoscedasticidade com os testes estatísticos de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O teste de Tukey foi utilizado para as comparações *post-hoc*. Testes não paramétricos foram utilizados quando as condições de aplicação não permitiam o uso de testes paramétricos. Testes *t* bilaterais foram utilizados para comparações entre participantes do mesmo grupo. A reprodutibilidade é expressa em termos de coeficientes de variação entre sujeitos do mesmo grupo e pelo coeficientes de correlação entre grupos, tal como foi anteriormente descrito [146]. A análise estatística foi realizada com software SPSS v13.0 para Windows® (SPSS Inc®, Chicago, IL, USA).

### 6.2.2 Resultados e Discussão

O aquecimento local provoca um aumento na amplitude dos sinais de perfusão sanguínea, conhecido na literatura como hiperemia térmica local (HTL). Em sujeitos saudáveis, a HTL é caracterizada por um pico inicial nos primeiros 5 minutos de aquecimento, seguido de um abaixamento e a estabilização da perfusão como pode ser visto na figura 6.3. O pico inicial é dependente do reflexo axonal, enquanto que a fase de estabilização é dependente do óxido nítrico [147]. No presente trabalho, a HTL ocorreu nos dois locais de pele analisados em todos os participantes.

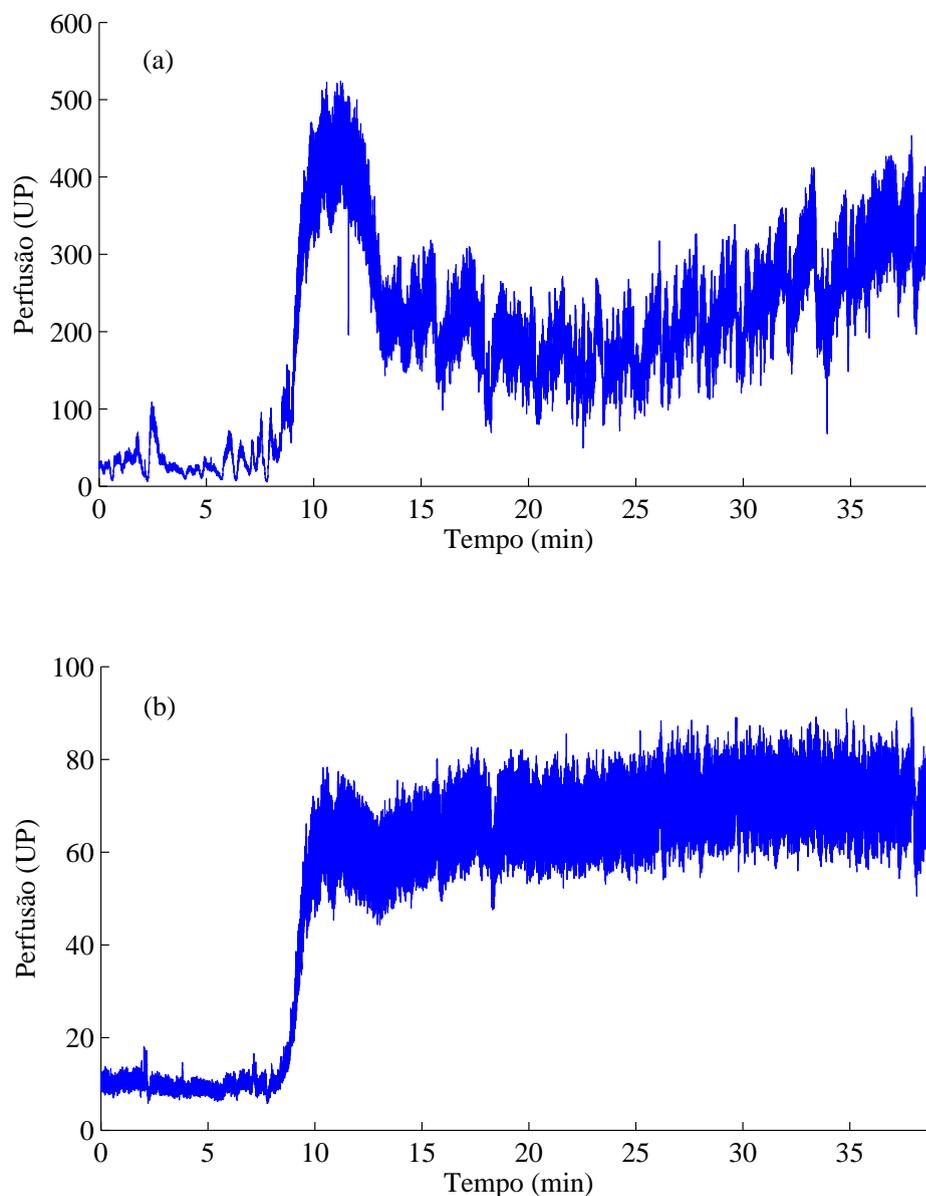


FIGURA 6.3: Traçado típico de sinais de perfusão sanguínea cutânea, recolhidos: (a) na ponta do dedo; e (b) na face ventral do braço em participantes saudáveis antes e durante o aquecimento local.

Os resultados obtidos no cálculo da SampEn para cada segmento de sinal, em pacientes e no grupo de controlo, estão apresentados na tabela 6.1. Neste estudo pode ver-se uma clara diferença significativa para a SampEn da perfusão obtida durante o fluxo basal entre os grupos de pacientes e o grupo de controlo, nos sinais recolhidos na ponta do dedo. O

mesmo não acontece nos sinais recolhidos na face ventral do braço. As comparações *post-hoc* revelaram diferenças significativas entre o grupo de controlo e o grupo de pacientes com SSc (é de notar que não houve diferença significativa na amostra 2), e entre o grupo de pacientes com FR e o grupo de pacientes com SSc. Isto é consistente com o facto de que a SSc afecta preferencialmente os dedos. Portanto, a SampEn da perfusão medida durante o fluxo basal parece aumentar em pacientes com SSc, nos quais a disfunção da microcirculação foi descrita em testes reactivos, efectuados noutros estudos anteriores [6, 22].

TABELA 6.1: SampEn média (desvio padrão) obtida para os segmentos de sinal de perfusão sanguínea analisados, antes e depois de 25 minutos de aquecimento a 42 °C; as comparações foram realizadas com ANOVA (AM1: amostra 1 e AM2: amostra 2).

			Controlo	FR	SSc	valor <i>P</i>
			(N=27)	(N=28)	(N=53)	
fluxo basal	Dedo	AM1	0,36* (0,15)	0,38* (0,14)	0,49 (0,19)	0,002
		AM2	0,37 (0,18)	0,36* (0,14)	0,46 (0,19)	0,02
	Braço	AM1	0,45 <sup>†</sup> (0,14)	0,47 <sup>†</sup> (0,17)	0,51 (0,16)	0,28
		AM2	0,43 (0,14)	0,45 <sup>†</sup> (0,15)	0,49 (0,16)	0,22
HLT	Dedo	AM1	0,54 <sup>‡</sup> (0,15)	0,54 <sup>‡</sup> (0,14)	0,49 (0,22)	0,38
		AM2	0,53 <sup>‡</sup> (0,13)	0,53 <sup>‡</sup> (0,17)	0,54 <sup>‡</sup> (0,20)	0,96
	Braço	AM1	0,60 <sup>†‡</sup> (0,14)	0,65 <sup>†‡</sup> (0,07)	0,66 <sup>†‡</sup> (0,16)	0,23
		AM2	0,61 <sup>†‡</sup> (0,13)	0,64 <sup>†‡</sup> (0,11)	0,67 <sup>†‡</sup> (0,16)	0,19

No entanto, existem heterogeneidades importantes entre os pacientes com SSc. De facto, pode ocorrer a disfunção vascular limitada (lSSc) sem disfunção cutânea, disfunção cutânea localizada apenas nos dedos (lcSSc) ou mais proximalmente (dSSc). Isto leva-nos a formular a hipótese, de que a SampEn pode variar quando o grupo de controlo é comparado com cada subgrupo de pacientes com SSc.

Os resultados da entropia obtidos para os subgrupos de pacientes com SSc estão apresentados na tabela 6.2). Na ponta do dedo, a entropia obtida no fluxo basal apresenta diferença significativa entre todos os grupos e sub-grupos, com uma tendência para as maiores entropias nos grupos de pacientes com lSSc e dSSc quando comparados com os

\* $P < 0,05$  vs pacientes com SSc. Teste de Tukey.

<sup>†</sup> $P < 0,05$  vs dedo. Teste t pareado.

<sup>‡</sup> $P < 0,05$  vs fluxo basal. Teste t bilateral.

grupos de pacientes com lSSc, FR e grupo de controlo. Isto sugere uma relação entre a disfunção microcirculatória digital (que ocorre em pacientes com lcSSc e com dSSc, mas não em pacientes com lSSc) e a SampEn. A análise *post-hoc* revela diferenças significativas entre os grupos de controlo e o grupo de pacientes com lcSSc ( $p=0,01$  na amostra 1), no entanto não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo de controlo e os pacientes com dSSc ( $p=0,07$  na amostra 1). No entanto, é preciso ter em conta, o facto de a amostra de pacientes com dSSc ser pequena, o que pode afectar a credibilidade dos resultados, devido à multiplicidade das comparações [7].

TABELA 6.2: SampEn média (desvio padrão) obtida para os segmentos de sinal perfusão sanguínea analisados, antes e depois de 25 minutos de aquecimento a 42 °C; o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação estatística entre grupos.

			Controlo (N=27)	FR (N=28)	lSSc (N=10)	lcSSc (N=37)	dSSc (N=6)	valor <i>P</i>
fluxo basal	Dedo	AM1	0,36 (0,15)	0,38 (0,14)	0,424 (0,17)	0,500 (0,17)	0,562 (0,24)	0,004
		AM2	0,37 (0,18)	0,36 (0,14)	0,385 (0,20)	0,475 (0,17)	0,467 (0,25)	0,048
	Braço	AM1	0,45 (0,14)	0,47 (0,17)	0,547 (0,17)	0,507 (0,16)	0,462 (0,12)	0,478
		AM2	0,43 (0,14)	0,45 (0,15)	0,501 (0,15)	0,505 (0,16)	0,398 (0,12)	0,267
HLT	Dedo	AM1	0,54 (0,15)	0,54 (0,14)	0,458 (0,22)	0,507 (0,22)	0,431 (0,25)	0,532
		AM2	0,53 (0,13)	0,53 (0,17)	0,551 (0,15)	0,539 (0,21)	0,521 (0,25)	0,996
	Braço	AM1	0,60 (0,14)	0,65 (0,07)	0,666 (0,08)	0,654 (0,18)	0,714 (0,12)	0,400
		AM2	0,61 (0,13)	0,64 (0,11)	0,696 (0,12)	0,643 (0,17)	0,785 (0,04)	0,088

A HTL é um teste de reactividade utilizado juntamente com as medições da FLD, para aceder às funções da rede microvascular. Neste trabalho foi estudado o efeito do aquecimento local a 42 °C na SampEn. Foi observado que o aquecimento local provoca um aumento da SampEn nos dois locais e para todos os grupos analisados (ver tabela 6.1). Isto revela que, em geral, os sinais de FLD apresentam menos regularidade durante a HTL do que durante o fluxo basal, o que é consistente com resultados anteriores que mostravam uma baixa reprodutibilidade em dias diferentes, da perfusão obtida no braço durante a HTL em participantes saudáveis [146]. Este estudo complementa os resultados apresentados por Liao *et al.* (2010) [148], onde não foi obtida diferença significativa entre a SampEn de sinais de FLD recolhidos durante períodos de repouso e durante períodos de vasodilatação máxima. No entanto é preciso salientar que a população estudada é diferente da estudada no trabalho aqui apresentado (idades e patologias).

A SampEn de sinais de FLD também diferem de acordo como local da medição: na maioria dos casos, a SampEn é superior nos sinais recolhidos no braço quando comparados com os sinais recolhidos no dedo (ver tabela 6.1). Isto indica que os sinais de FLD recolhidos no braço apresentam, em média, menos reprodutibilidade e menos regularidade que os sinais recolhidos na ponta do dedo. Estas descobertas são consistentes com os resultados de reprodutibilidade obtidos em sujeitos saudáveis, onde foi obtida uma reprodutibilidade maior para os sinais de FLD obtidos na ponta do dedo [146]. No entanto, este facto é menos visível em sinais recolhidos durante o fluxo basal, em pacientes com SSc, pois a SampEn é semelhante nos dois locais de pele. Estes resultados sugerem anomalias na microcirculação na ponta do dedo mas não na microcirculação cutânea presente no braço em pacientes com SSc. Isto pode ter origem, provavelmente, na disfunção local da microcirculação digital nos pacientes com lcSSc (o mesmo não acontece com os pacientes com lSSC e dSSc), que representam a maior parte da população com SSc neste estudo.

O objectivo secundário deste trabalho foi o de avaliar se as cicatrizes presentes nos dedos, uma característica clínica presente em pacientes com SSc, influenciam a SampEn da perfusão sanguínea medida durante o fluxo basal. Foram comparados os resultados da SampEn obtidos nos sinais de perfusão medidos durante o fluxo basal em pacientes com SSc com e sem cicatrizes e obtiveram-se entropias médias de 0,55 e 0,46; respectivamente, com  $p=0,07$ , onde se observou uma tendência para o aumento da SampEn, em pacientes com cicatrizes.

A reprodutibilidade da SampEn calculada para os dois segmentos analisados, da perfusão sanguínea monitorizada durante o fluxo basal, foi razoável - obteve-se um coeficiente de variação de 26% e um coeficiente de correlação de 0,63 - o que é considerado aceitável [149, 150]. Para todos os grupos foi obtido um coeficiente de variação inferior a 35% (31, 29, e 23% para o grupo de controlo e para os grupos de pacientes com FR e SSc, respectivamente).

### 6.3 Conclusões

No primeiro estudo apresentado neste capítulo, concluiu-se que as flutuações presentes no fluxo microcirculatório cutâneo e a amplitude média dos sinais de FLD recolhidos na pele glabra são geralmente superiores às obtidas na pele não glabra. O espectro de

potência obtido em sinais de FLD indicam que as duas regiões analisadas apresentam características de processos fractais, mas essas características são diferentes para os dois locais avaliados.

No segundo estudo, constatou-se que a regularidade dos sinais de FLD, recolhidos na ponta do dedo durante o fluxo basal, é diferente em pacientes com SSc quando comparados com pacientes com RP ou participantes saudáveis. Também se mostrou que a entropia é maior em pacientes com cicatrizes. Estes resultados mostram que a entropia de sinais de FLD obtidos no fluxo basal podem ser utilizados para prever a disfunção microcirculatória sem danificar os micro-vasos.

## Capítulo 7

# Protótipo invasivo

*Neste capítulo é descrito o protótipo desenvolvido para a medição invasiva da perfusão sanguínea em cérebro de ratos. A perfusão é medida com uma micro-sonda de diâmetro inferior às existentes no mercado, minimizando os danos causados nos tecidos. São apresentados os diferentes métodos de processamento de sinal e são discutidos os resultados obtidos nos testes realizados. Foram levados a cabo testes *in vitro*, onde foi estudada a linearidade das medições para diferentes velocidades de dispersores. Para além disso, o protótipo foi validado *in vivo* em cérebro de ratos.*

### 7.1 Descrição do protótipo

O protótipo invasivo foi desenvolvido para a medição invasiva da microcirculação sanguínea no cérebro de rato, mais precisamente na região do hipocampo [12, 151]. Com o objectivo de diminuir os danos nos tecido provocados pela inserção de sondas de FLD existentes no mercado, este protótipo, representado na figura 7.1 (uma fotografia do mesmo pode ser vista no apêndice C), é constituído por duas micro-sondas de diâmetro reduzido.

O protótipo é constituído pelo sistema de actuação [detalhe (a) da figura 7.2 (a)] composto por dois díodos laser com diferentes comprimento de onda (785 e 1308 nm), e pelo sistema de detecção baseado no efeito *self-mixing* [detalhe (b) da figura 7.2]. O sistema electrónico é constituído pela fonte de alimentação, duas fontes de corrente constante para díodos laser (LT3092) controladas digitalmente, e dois canais de aquisição.

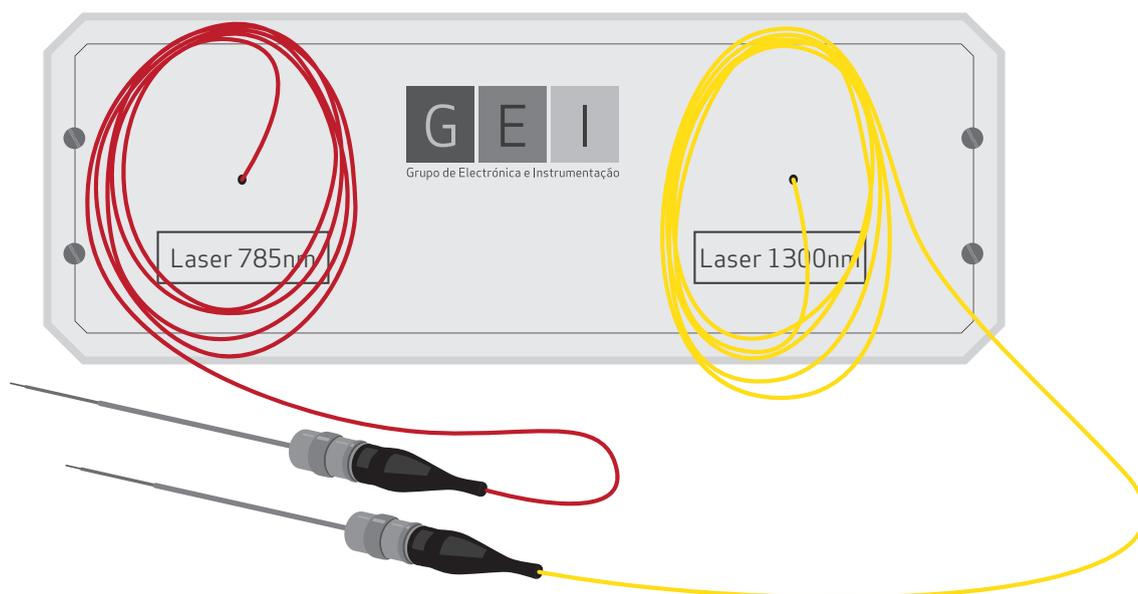


FIGURA 7.1: Protótipo invasivo.

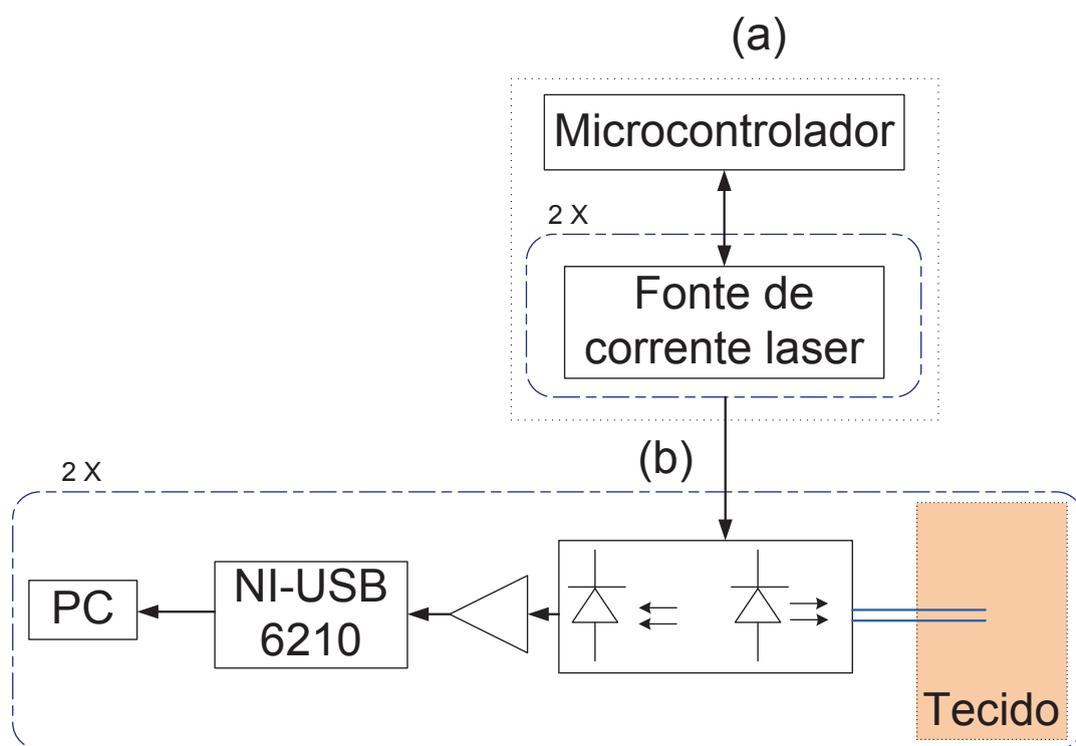


FIGURA 7.2: Esquemático do protótipo invasivo composto pelos sistemas: (a) de actuação; e (b) de aquisição *self-mixing*.

Foram utilizados díodos laser com montagem *pigtail* (refs. LDPC-05-785-5/125-S-40-X-0.25-2.5-20-70LD e LDPC-03-1310-9/125-S-60-X-0.25-2.5-20-50LD-SP da OZ-OPTICS®) compostos pelos díodos laser de 785 (ref. DL-7140-001S) e de 1308 nm (ref. QLD 1300-50S),

respectivamente. Os dois díodos laser foram alimentados com correntes próximas da corrente de operação, igual a 100 (70 mW) e a 137 (50 mW) mA para os lasers de 785 e 1308 nm, respectivamente. Os dois comprimentos de onda escolhidos estão dentro da gama da janela de diagnóstico (600 - 1600) [46]. As fibras ópticas monomodo acopladas aos díodos laser tem um *cladding* e um *jacket* com 125 e 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro, respectivamente. A micro-sonda, representada esquematicamente na figura 7.3 é constituída pelo *cladding* da fibra óptica colado dentro de uma agulha com diâmetro externo de 260  $\mu\text{m}$ . Foi colocado um suporte entre a interface agulha-fibra óptica que, para além de proteger a referida interface, também permite fixar a micro-sonda no micromanipulador. Como as sondas que existem no mercado têm 450  $\mu\text{m}$  de diâmetro, a sonda desenvolvida permite uma redução no tamanho da sonda de 42%. As potências luminosas à saída das micro-sondas são de 16 e de 23 mW para os lasers de 1308 e 785 nm, respectivamente. As micro-sondas vão ser referidas como M1308 e M785, de acordo com o comprimento de onda de cada uma.

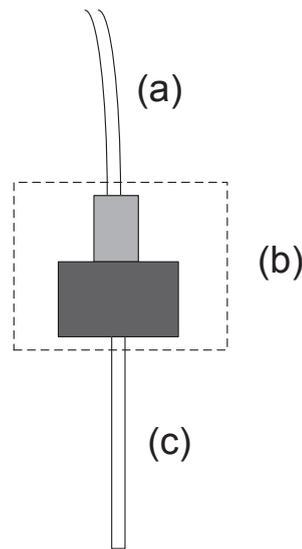


FIGURA 7.3: Esquemático da micro-sonda constituída: (a) pela fibra óptica, (b) pelo suporte e (c) pela agulha.

A aquisição de sinal é feita pelos fotodetectores de monitorização dos díodos laser e a corrente gerada é amplificada e convertida em tensão. Este sinal é adquirido e digitalizado por um sistema de aquisição de dados da National Instruments®, a NI-USB 6210. O sinal é enviado para o computador, onde é armazenado e processado em software Matlab®. O controlo das fontes de corrente é feito por um microcontrolador, o PIC24FJ128GA010, que serve também de porta de comunicação entre o sistema e o computador através

de uma porta série UART. O sistema de controlo é utilizado para ligar e desligar a alimentação dos díodos lasers.

## 7.2 Software - Controlo digital

O controlo digital dos lasers, assim como a conversão analógica digital dos valores das correntes de alimentação dos lasers é feita pelo microcontrolador PIC24FJ128GA010. Saídas digitais são utilizadas para ligar e desligar os lasers e um ADC lê a corrente fornecida aos lasers.

Uma interface gráfica que permite ao utilizador controlar os lasers, fazer a aquisição e o processamento dos dados foi desenvolvido.

## 7.3 Processamento de sinal

Um fantoma mecânico, constituído por uma prato de alumínio acoplado a um motor DC foi construído. Um esquema desse fantoma pode ser visto na figura 7.4. A micro-sonda foi posicionada numa posição quase perpendicular à superfície de alumínio, com posicionadores micrométricos, de modo a permitir um bom posicionamento entre a sonda e o alvo.

Um sinal *self-mixing* típico, obtido no fantoma, quando este se move com velocidades iguais a 6 e a 48 mm/s, pode ser visto na figura 7.5. Os dois sinais foram amostrados a 50 kHz. As oscilações de amplitude, do sinal adquirido quando o fantoma se move a 48 mm/s, são maiores do que as obtidas no sinal adquirido quando o fantoma se move a 6 mm/s, o que demonstra que o sinal *self-mixing* tem informação acerca da velocidade dos dispersores.

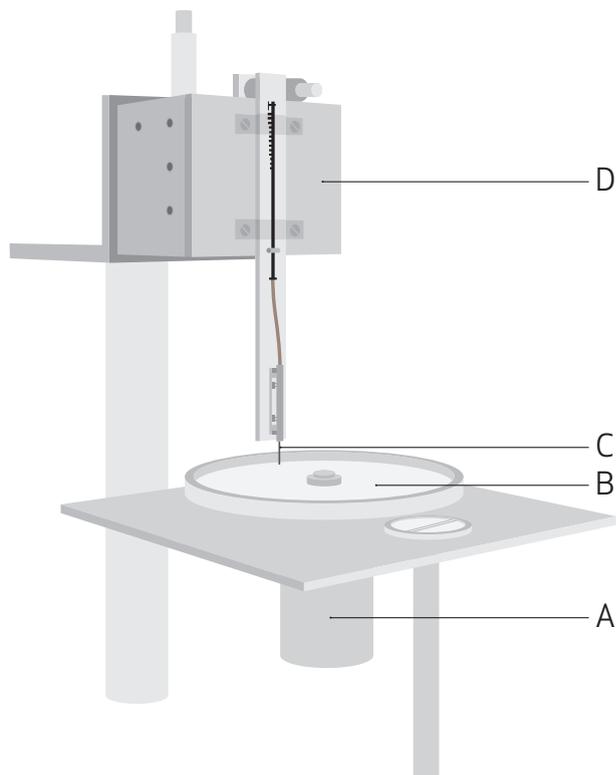


FIGURA 7.4: Fantoma mecânico, constituído: *A* pelo motor, *B* pelo prato giratório e *D* pelo posicionador micrométrico. *C* representa a micro-sonda.

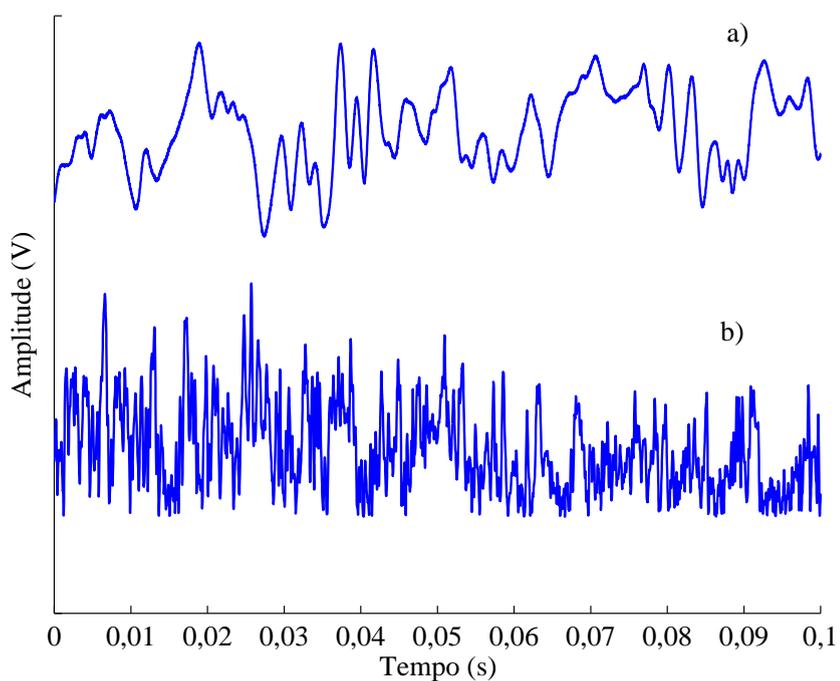


FIGURA 7.5: Sinal *self-mixing* obtido no fantoma, quando este se move: a) a 6, e b) a 48 mm/s, obtidos com o diódo laser de 1308 nm. A amplitude do sinal foi deslocada de modo a facilitar a visualização, uma vez que os dois sinais tem a mesma tensão média.

O fluxograma representado na figura 7.6 resume o protocolo utilizado na aquisição de sinal, para a obtenção da perfusão em tempo real. Neste protocolo, os sinais *self-mixing* são adquiridos continuamente a 50 kHz e guardados numa memória intermédia (*buffer*) até que se atinja um número de pontos suficientes para aplicação do algoritmo de processamento de sinal. O resultados do processamento é adicionado num buffer circular e é apresentado sob a forma gráfica. Os sinais foram processados com uma taxa de perfusão de 32 Hz e foram filtrados com um filtro passa baixo de Butterworth, com a frequência de corte aos 7,5 Hz. As taxas de amostragem e perfusão, e a frequência de corte estão de acordo com os valores recomendados pelos fluxómetros comerciais, como por exemplo, o Periflux 5000 (Perimed®, Suécia), quando são feitas medições em ratos.

Na literatura alguns métodos de processamento de sinal foram aplicados a sinais *self-mixing*, nomeadamente o método das contagens (MC) [70, 152], o método da autocorrelação (MA) [70, 153] e o método do espectro de potência (MEP) [154]. Estes três métodos são avaliados neste trabalho.

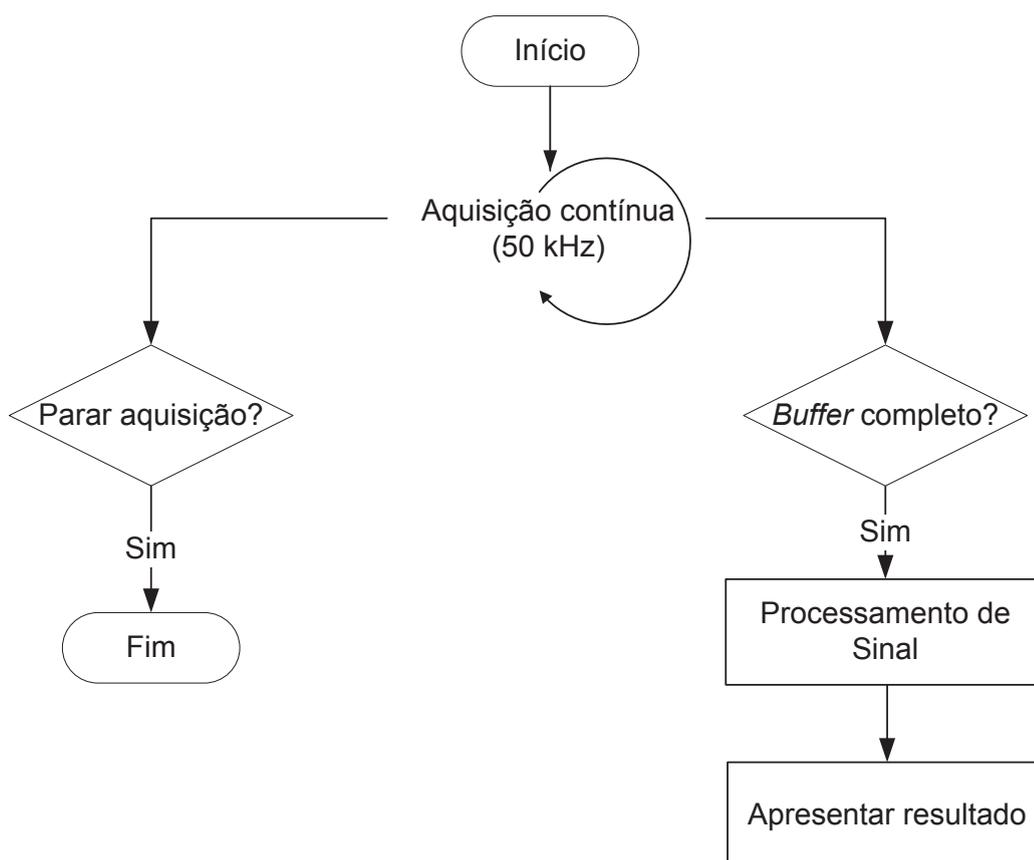


FIGURA 7.6: Fluxograma de aquisição e processamento de sinal em tempo real.

### 7.3.1 Método das contagens

O MC consiste na conversão do sinal *self-mixing* num trem de impulsos e no cálculo da frequência de *speckle* (ver figura 7.7).

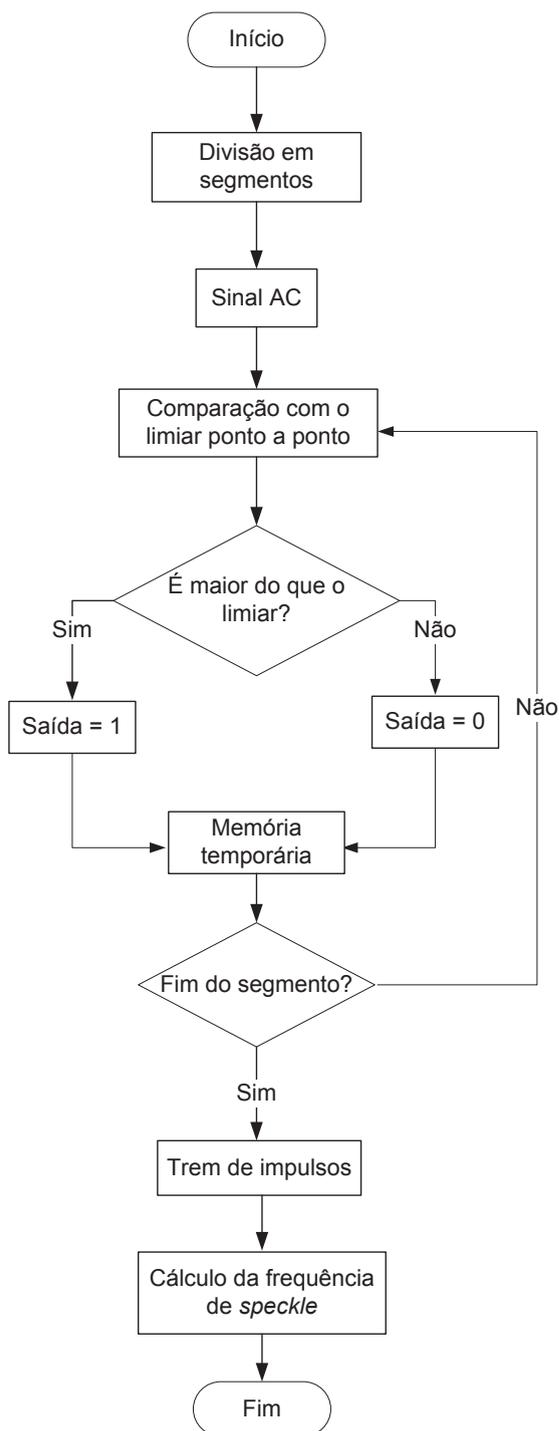


FIGURA 7.7: Fluxograma descritivo do método das contagens.

Neste método, o sinal AC, depois de separado da componente DC, é dividido em segmentos, e é comparado com um limiar de modo a produzir um pulso binário que depende do resultado da comparação. Se a amplitude do sinal é menor do que o limiar, a saída do comparador é igual a zero, caso contrário é igual a 1. O sinal resultante é um trem de impulsos. O número de pulsos de um segmento com um determinado tempo de duração é a frequência de *speckle*, e está relacionada com a velocidade do alvo [70, 152, 154]. Na figura 7.8 está representado um trem de impulsos, obtido de um sinal *self-mixing* quando o fantoma, iluminado com luz laser de 1308 nm, se move a 6 mm/s.

Se denominarmos por  $N_f$  o número das flutuações em cada segmento com duração  $t$ , a frequência de *speckle* pode ser calculada através da expressão  $f_{speckle} = N/t$ . A frequência de *speckle* têm informação acerca do espectro de potência do sinal, pois ela própria é uma estimação dos conteúdos de frequência do sinal de *speckle* [154].

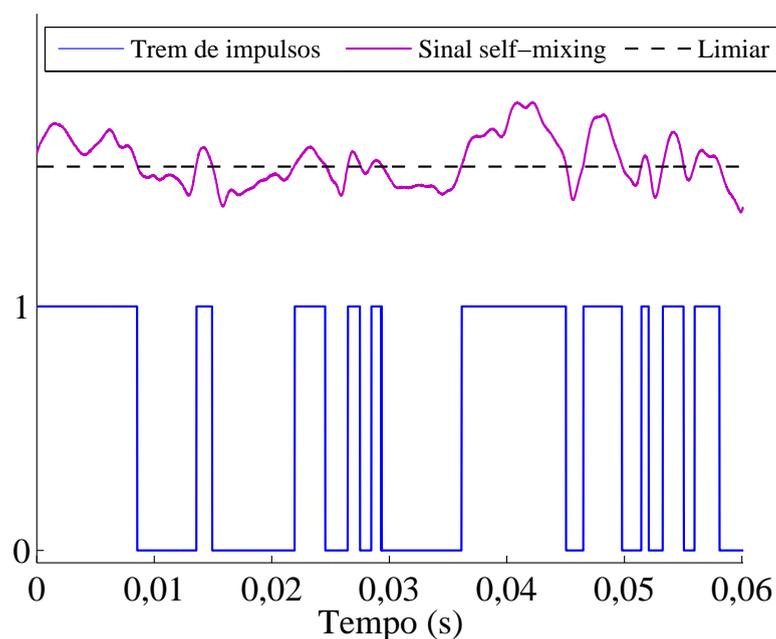


FIGURA 7.8: Sinal *self-mixing* (curva violeta), registado quando o fantoma se move a 6 mm/s, obtido com o diodo laser de 1308 nm, e a sua conversão num trem de impulsos binário (curva preta).

O tamanho dos segmentos foi definido de modo a obter-se uma taxa de amostragem de 32 Hz. Para uma taxa de perfusão (equação 5.3) igual a 32 Hz, podem ser utilizados segmentos de sinal com 2048 pontos e uma sobreposição entre segmentos de 24%. Um conjunto de valores de limiar foram testado para cada caso e foram escolhidos aqueles que deram melhores resultados. O valor limiar foi definido igual a 0,01 e a 0,001 V,

nas medições realizadas no fantoma, e igual a 0,005 e a 0,003 V, para as medições realizadas no cérebro de rato, para a M1308 e para a M785, respectivamente. Um filtro de média móvel de 20 pontos foi aplicado no sinal processado, de modo a melhorar a sua visualização.

### 7.3.2 Método da autocorrelação

A função de autocorrelação e o espectro de potência Doppler formam um par de Fourier de acordo com o teorema de Wiener-Khinchine, com já foi referido anteriormente na secção 3.2.7. Como foi demonstrado anteriormente, o espectro de potência Doppler e a frequência de *speckel* contêm informação acerca da velocidade dos dispersores. Por isso, se a função de autocorrelação for correctamente processada, pode conter informação acerca da velocidade do alvo dispersor [153].

Na figura 7.9, pode ver-se o comportamento da autocorrelação de sinais obtidos no fantoma mecânico para diferentes velocidades e para os dois comprimentos de onda presentes no protótipo. Os sinais foram adquiridos a 50 kHz e a função de autocorrelação foi calculada para 2048 pontos. Foi determinada a autocorrelação média de dois minutos de sinal *self-mixing* adquirido. A autocorrelação está representada apenas para os atrasos mais baixos de modo a facilitar a visualização. Facilmente se constata que o tempo de decaimento aumenta com a diminuição da velocidade do alvo para os dois díodos laser, embora esse efeito seja mais claro para o díodo laser de 1308 nm [detalha (a) da figura 7.9].

O MA é baseada no cálculo do tempo em que a autocorrelação cai para uma fracção do seu valor máximo. Este instante vai ser denominado como tempo de autocorrelação ( $\sigma$ ) [70]. De seguida é calculado o recíproco do tempo da autocorrelação. Para as medições *in vitro* o limiar de queda foi considerado igual a  $1/e$  e a 0,85 para os díodos laser 1308 e 785 nm, respectivamente, enquanto que para as medições *in vivo* o limiar foi definido igual a  $1/e$  para os dois comprimentos de onda. Um limiar de queda maior foi escolhido para o CO de 785 nm, para as medições no fantoma, pois as funções de autocorrelação obtidas [ver detalhe (b) da figura 7.9] 'misturam-se' para os atrasos maiores, perdendo-se a informação de velocidade. No que diz respeito às medições *in vivo* a função de autocorrelação foi normalizada ao primeiro atraso devido à grande diferença entre o resultado obtido para o atraso igual a zero e para os atrasos seguintes, o que tornava a escolha do valor de limiar

difícil. Para melhorar a visualização dos resultados obtidos com o MA, na validação *in vivo*, foi calculado o valor absoluto da diferença entre pontos consecutivos do sinal processado e um filtro de média móvel de 20 pontos foi aplicado. Tal como no MC, o sinal *self-mixing* foi dividido em segmentos de 2048 pontos, com uma sobreposição de 24%. Seguidamente foi calculada a autocorrelação para cada segmento, seguido do cálculo de  $\sigma$  e do seu inverso. Um fluxograma que resume o cálculo do recíproco do tempo de autocorrelação pode ser visto na figura 7.10.

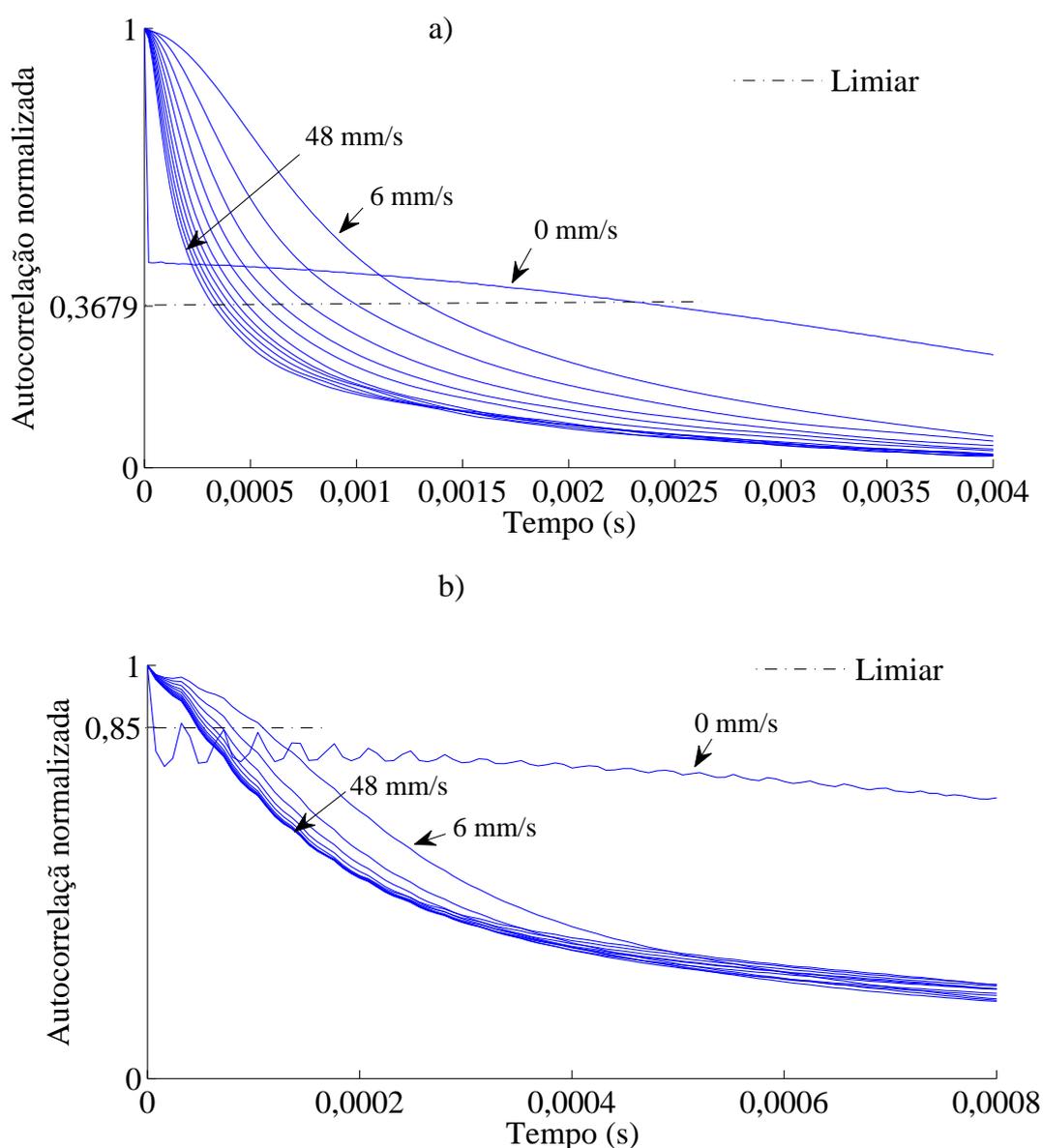


FIGURA 7.9: Autocorrelações obtidas para 0, 6, 10, 14, 19, 23, 27, 31, 35, 40, 44 e 48 mm/s com os díodos laser de: (a) 1308, e (b) 785 nm.

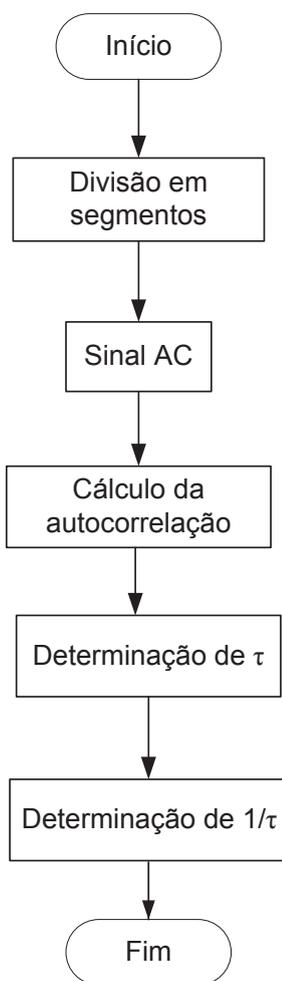


FIGURA 7.10: Fluxograma descritivo do método da autocorrelação.

### 7.3.3 Método do espectro de potência

No MEP é calculado o espectro de potência da fotocorrente, mais precisamente os momentos do espectro de potência, já referidos na equação 3.14, e que estão relacionado com as propriedades físicas dos dispersores presentes no volume iluminado. Como já foi referido, na técnica de FLD não *self-mixing*, a CGVM e a perfusão podem ser estimados a partir dos momentos do espectro de potência Doppler. Até agora, nenhuma análise teórica dos sinais *self-mixing* obtidos em tecidos vivos foi desenvolvida devido à estrutura complicada do efeito *self-mixing* e dos tecidos vivos [152]. Apesar disso, o  $M_0$  e o  $M_1$  vão ser avaliados, pois  $M_1$  já foi aplicado a sinais *self-mixing* por outros autores [155, 156].

O fluxograma, que resume este método, pode ser visto na figura 7.11. O sinal é dividido em blocos e posteriormente é calculado o espectro de potência da componente AC do

signal. Finalmente são determinados os momentos do espectro de potência.

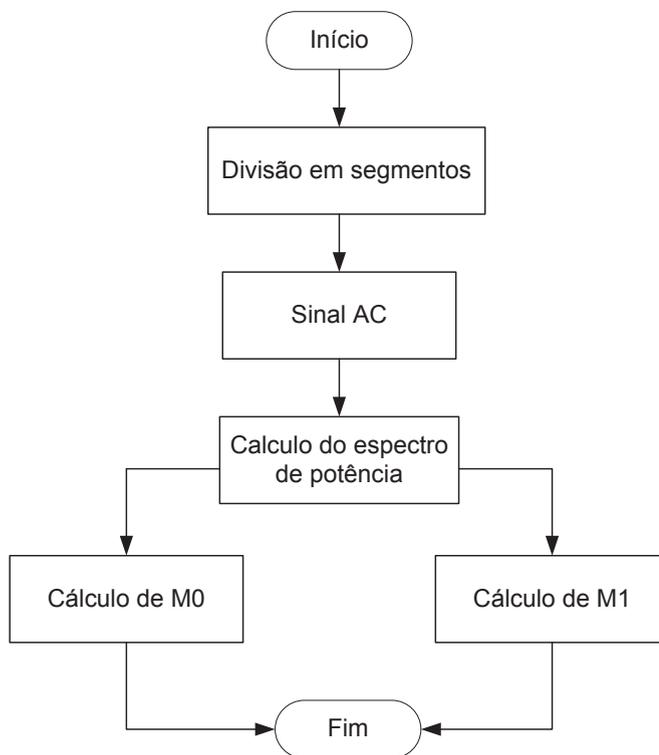


FIGURA 7.11: Fluxograma descritivo do método do espectro de potência.

Os espectros de potência obtidos quando o disco do fantoma se move a 0, 6, 10, 14, 19, 23, 27, 31, 35, 40, 44 e 48 mm/s, podem ser vistos na figura 7.12. Apenas as frequências mais baixas do espectro estão representadas para facilitar a visualização. Os sinais foram adquiridos a 50 kHz e foram calculados espectros de potência com 2048 pontos. A média dos espectros obtidos, para segmentos de sinal com 2 minutos de duração em cada velocidade, foi calculada. Foi aplicado um filtro passa-alto com uma frequência de corte de 2 kHz. A frequência de corte foi escolhida com base na observação dos espectros, uma vez que para as frequências mais baixas, os espectros obtidos para diferentes velocidades estão misturados (ver figura 7.12). O aumento do espalhamento do espectro é mais clara para o díodo laser de 1308 nm [detalhe (a) da figura 7.12] do que para o laser de 785 nm [detalhe (b) da figura 7.12].

Para a validação *in vivo*, foram escolhidas as frequências de corte inferior e superior de 25 Hz e de 16 kHz, respectivamente (ver secção 5.3). Um filtro de média móvel de 20 pontos foi aplicado no M0 para melhorar a visualização.

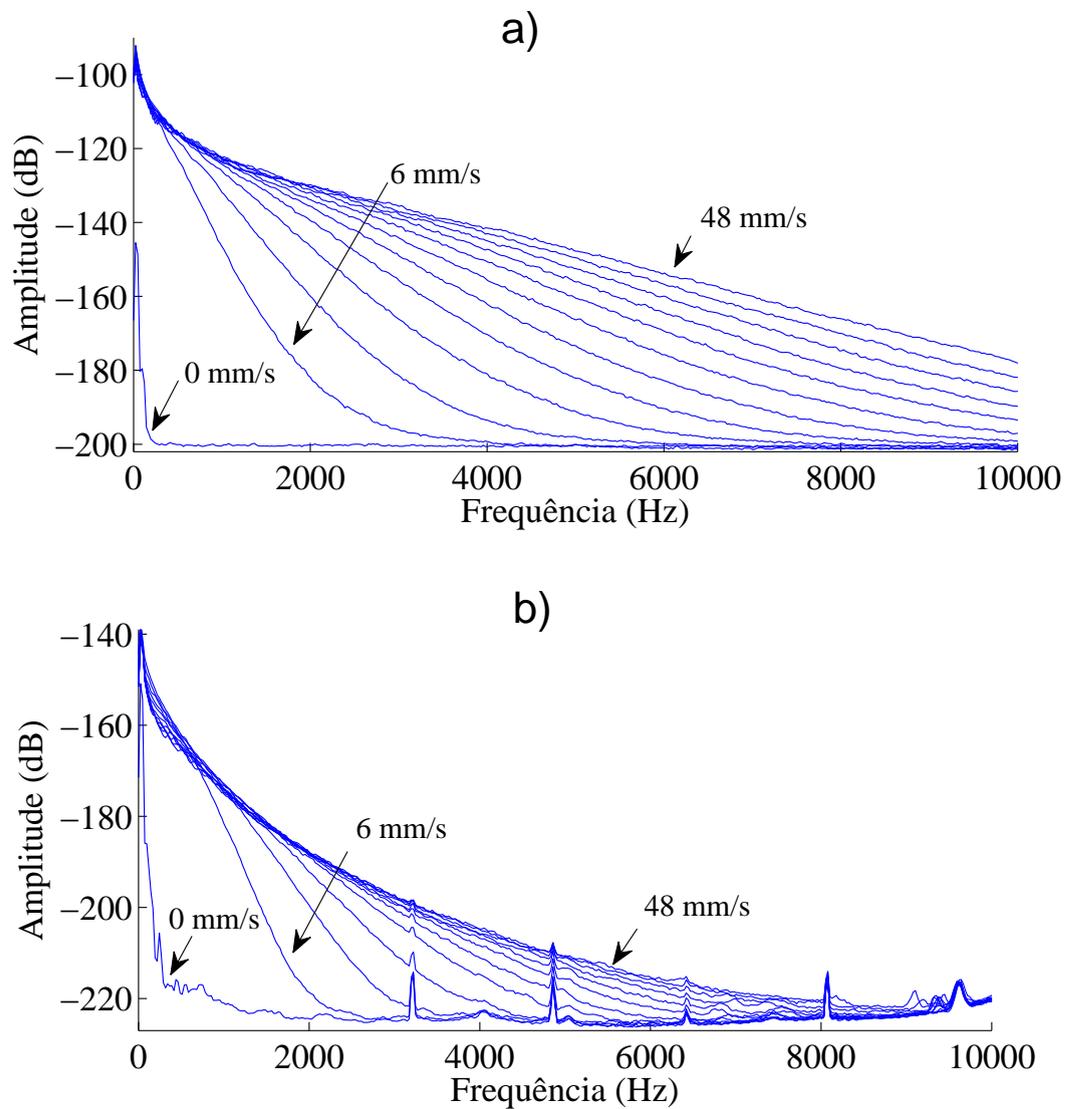


FIGURA 7.12: Espectros de potência obtidos para 0, 6, 10, 14, 19, 23, 27, 31, 35, 40, 44 e 48 mm/s com os díodos laser de: (a) 1308 e (b) 785 nm.

De modo a obter-se uma taxa de perfusão de 32 Hz, foram calculados espectros de segmentos de sinal com 2048 pontos com uma sobreposição de 24%.

## 7.4 Estudos *in vitro*

### 7.4.1 Objectivos e Métodos

#### 7.4.1.1 Altifalante

Uma validação prévia do sistema *self-mixing* foi implementada num altifalante [12], com o objectivo de comparar os sinais obtidos no protótipo com os apresentados na literatura [157]. A micro-sonda foi posicionada em frente a um espelho colado na curvatura do altifalante (ver figura 7.13). O altifalante foi excitado com sinais sinusoidais de diferentes frequências e amplitudes.



FIGURA 7.13: Montagem para aquisição de sinal *self-mixing* no altifalante, onde se podem ver: *A* a micro-sonda, *B* o espelho reflector, e *C* o altifalante.

#### 7.4.1.2 Fantoma

Um dispositivo mecânico imitando um gira discos rotatório foi desenvolvido de modo a testar e verificar a linearidade do sistema para diferentes velocidades de dispersores. Este fantoma foi descrito na secção 7.3. Um conjunto de 12 velocidades foi testado entre os 0 e 48 mm/s. Foram adquiridos sinais com duração de 2 minutos em cada uma das velocidades testadas.

## 7.4.2 Resultados e Discussão

### 7.4.2.1 Altifalante

Os sinais *self-mixing* obtidos com a M1308 e a M785, no altifalante, estão representados nos detalhes (a) e (b) da figura 7.14, respectivamente.

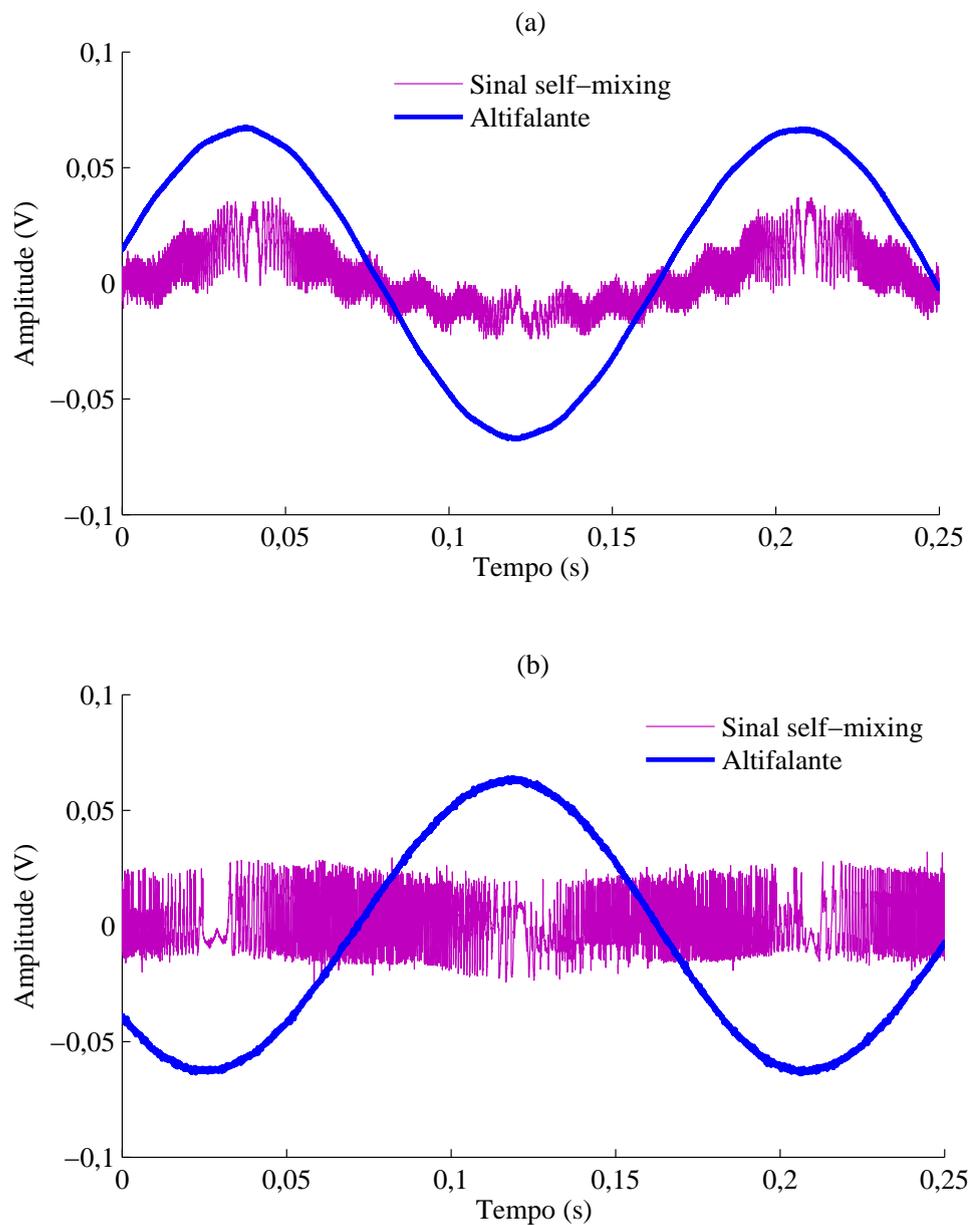


FIGURA 7.14: Sinais *self-mixing* (curva violeta), obtidos com o diodo laser de: (a) 1308, e (b) 785 nm, quando o altifalante é excitado com uma sinusóide (curva azul).

Na figura 7.14 as curvas a azul representam a sinusóide com que o altifalante é excitado e as curvas a violeta representam o sinal *self-mixing* registado. Neste teste o altifalante oscilou com uma frequência de 2 Hz e a frequência de amostragem do sinal *self-mixing* foi de 20 kHz. Estes sinais são semelhantes aos apresentados na literatura (ver por exemplo [157]).

#### 7.4.2.2 Fantoma

Os resultados obtidos para os três processamentos de sinal analisados estão apresentados na figura 7.15. Nos detalhes a), c), e) e g) da figura 7.15 estão representados os resultados obtidos com o díodo laser de 1308 nm para os métodos de processamento de sinal MC, MA, M0 e M1, respectivamente, e nos detalhes b), d), f) e h) da figura 7.15 estão representados os resultados obtidos com o díodo laser de 785 nm para os métodos de processamento de sinal MC, MA, M0 e M1, respectivamente. Foi realizado o teste da regressão linear, onde os resultados foram ajustados a um polinómio de 1º grau, de modo a analisar a linearidade do sistema. Na análise da regressão linear dos resultados obtidos com os métodos de processamento de sinal MC e MA para as medições efectuadas com o díodo laser de 785 nm, não foi considerada a velocidade de 0 mm/s. A análise estatística mostra que existe uma boa correlação entre o modelo estimado e os resultados obtidos, uma vez que o coeficiente de determinação,  $R^2$ , é maior do que 0,9 para a maioria dos casos. Para além disso, o valor  $p$  é sempre inferior a 0,01. Pode-se então concluir que existe uma relação linear entre os resultados obtidos com os processamentos de sinal estudados para as velocidades testadas.

Os resultados obtidos com o M785 para 0 mm/s não foram considerados na análise estatística, quando foram utilizados os métodos de processamentos de sinal MC e MA, por terem valores muito diferentes dos obtidos para as outras velocidades.

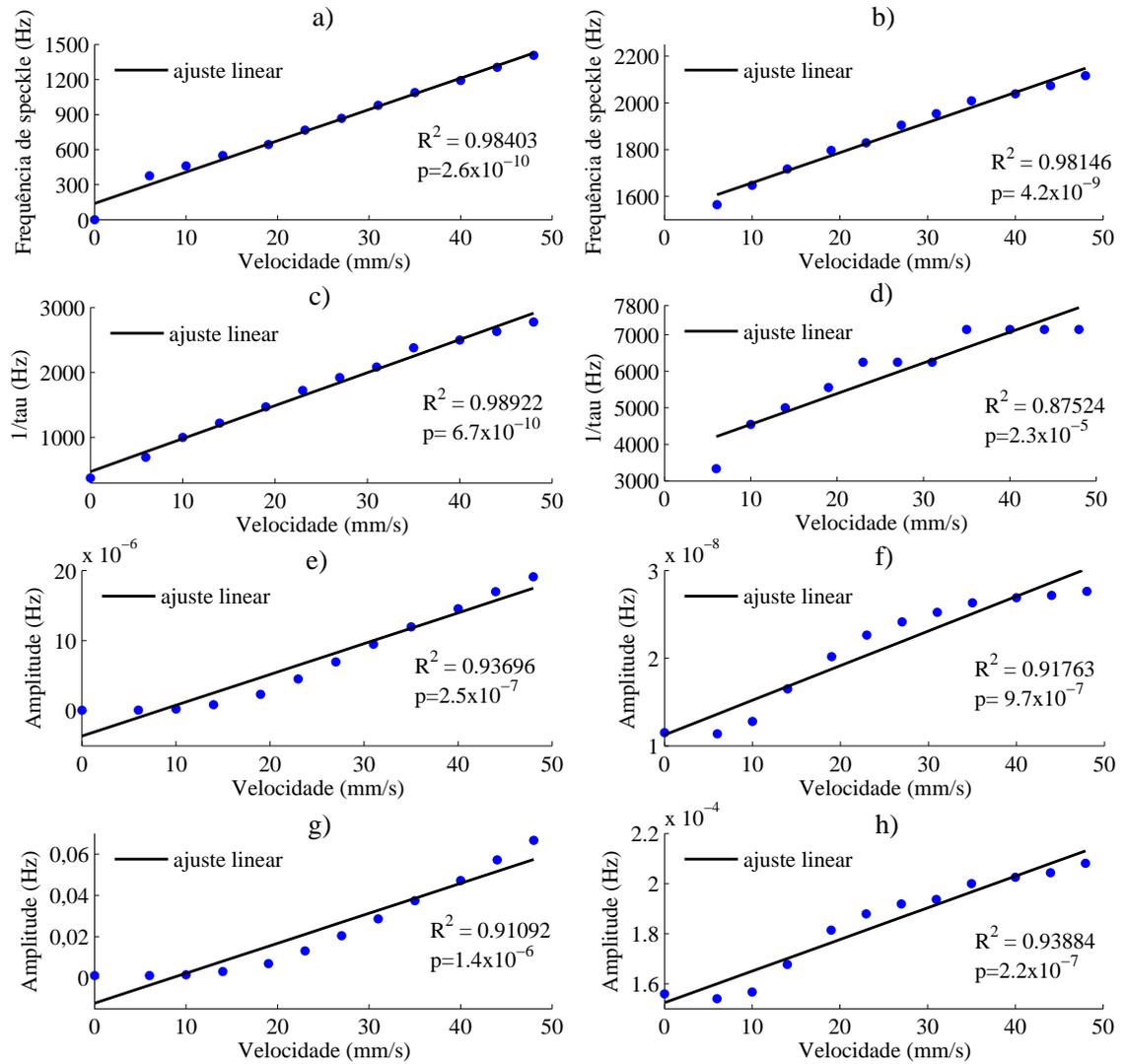


FIGURA 7.15: Resultados obtidos na validação *in vitro* com os métodos de processamentos de sinal: a) MC, c) MA, e) M0 e g) M1 para o diodo laser de 1308 nm; e com os métodos de processamentos de sinal: b) MC, d) MA, f) M0 e h) M1 para o diodo laser de 785 nm.

## 7.5 Estudos *in vivo*

Testes *in vivo* foram realizados no cérebro de rato com o protótipo invasivo. Numa primeira fase, foi analisada a resposta do protótipo em ambiente de simulação, seguindo-se as medições efectuadas em cérebro de ratos.

## 7.5.1 Simulações Monte Carlo

### 7.5.1.1 Descrição

O hipocampo do cérebro de rato é constituído por algumas substâncias, nomeadamente a matéria cinzenta, a matéria branca, vasos sanguíneos, entre outras. A percentagem de sangue é de aproximadamente 4.5% e a matéria branca pode ser até 4% do volume de sangue. Como a percentagem de matéria branca é muito baixa, no modelo simulado foi considerado que o hipocampo é constituído por 95.5% de matéria cinzenta e 4.5% de sangue (sendo que 3.6% é sangue oxigenado e 0.9% é sangue desoxigenado) [34, 94, 158].

As propriedades ópticas para o comprimento de onda de 785 nm foram baseados nos trabalhos apresentados por Fredriksson *et al.* (2009) [34] e estão sumariados na tabela 7.1. No que diz respeito às funções de dispersão, o sangue (oxigenado e desoxigenado) foi modelado com a função de fase de dispersão de Gegenbauer kernel com  $\alpha = 1$  e  $g = 0.948 \text{ mm}^{-1}$  [34]. A matéria cinzenta foi modelada com a função de fase de Henyey-Greenstein com  $g = 0,81 \text{ (mm}^{-1}\text{)}$  [34]. Para o sangue um hematócrito de 42% foi considerado. A luz laser foi simulada com a forma *pencil beam* e foi injectada de modo perpendicular ao tecido simulado. A trajectória percorrida foi registada com uma resolução de  $1/\mu'_s$  e a abertura numérica da fibra óptica foi considerada igual a 0,11. As simulações foram realizadas apenas para o comprimento de onda de 785 nm, devido à ausência de informação no que diz respeito às propriedades ópticas dos constituintes do modelo criado para o díodo laser de 1308 nm.

TABELA 7.1: Propriedades ópticas da matéria cinzenta, sangue oxigenado e desoxigenado, para o comprimento de onda de 785 nm.

	n	$\mu_a \text{ (mm}^{-1}\text{)}$	$\mu_s \text{ (mm}^{-1}\text{)}$	g
Matéria cinzenta	1,4	0,20	0,78	0,900
Sangue oxigenado	1,4	0,50	2,00	0,991
Sangue desoxigenado	1,4	0,64	2,00	0,991

### 7.5.1.2 Resultados e Discussão

Nas simulações realizadas no modelo do cérebro de rato, os fotões que sofreram desvio Doppler viajaram uma profundidade média de 0,15 mm como se pode ver na tabela 7.2. Este valor é semelhante aos resultados apresentados por Fredriksson *et al.* (2009) [34], que obteve uma profundidade média de 0,16 mm. Este resultado ajuda no posicionamento

da sonda, que deverá ficar a 0,15 mm acima da área a ser monitorizada. Cada fotão sofre em média 2,23 eventos de dispersão Doppler e para um total de 5.000.000 fotões detectados 11,9% sofreram desvio Doppler.

TABELA 7.2: Profundidade média dos fotões que sofreram desvio Doppler, número médio de dispersões Doppler sofridas por cada fotão, percentagem de fotões que sofreram desvio Doppler e M1, obtidos no modelo do cérebro de rato.

<Profundidade> (mm)	<Dispersão>	Fotões Doppler (%)	M1 (Hz)
0,15	2,23	11,9	$3,51 \times 10^{17}$

Simulações Monte Carlo para o díodo laser de 1308 nm não foram implementadas, pois na literatura apenas estão documentadas as propriedades ópticas dos tecidos biológicos até aos 1000 nm. Para além disso, é necessário considerar a água presente nos tecidos, pois o seu coeficiente de absorção é elevado para comprimentos de onda superiores a 1000 nm, como se pode ver na figura 4.2 [159]. Isto implica que, quando é utilizado o díodo laser de 1308 nm, a maioria da luz vai ser absorvida pela água, por isso, o feixe incidente apenas irá penetrar alguns diâmetros celulares [46].

## 7.5.2 Validação

### 7.5.2.1 Métodos - Protocolo de medição

Os testes *in vivo* foram realizados em ratos machos *Wistar* com 9 semanas de vida. Foram realizadas, um total de 11 medições em que foram injectadas no rato substâncias como o nitrito de sódio. Em todas as medições, os ratos foram anestesiados com uretano (1,25 g/kg, i.p.), e posicionados numa mesa estereotáxica (Stoelting Co, EUA). Depois de se ter exposto a superfície do cérebro do rato e de se ter removido a *dura mater*, uma das micro-sondas foi inserida no hipocampo. Juntamente com a micro-sonda, foi também inserida uma sonda laser Doppler existente no mercado (referência Perimed®: PF411; diâmetro externo: 450  $\mu\text{m}$ ; separação de fibras: 140  $\mu\text{m}$ ; comprimento de onda: 780 nm) conectada a um fluxómetro comercial (fluxómetro Periflux 5000, Perimed®, Suécia) no hemisfério cerebral oposto. A medição em simultâneo com as duas sondas permite a comparação dos sinais adquiridos com o protótipo desenvolvido e com o protótipo comercial. Foram feitas medições com as duas microcondas (1308 e 785 nm) em diferentes animais.

Foi analisada a correlação entre os resultados obtidos com o protótipo e o resultados obtido com a sonda da Perimed® para todas as medições efectuadas. Todos os sinais foram normalizados, e a correlação cruzada foi determinada com a função *xcorr* do Matlab®.

Em todos os testes realizados, a aquisição terminou com a injeção intraperitoniana de nitrito de sódio (200 mg/Kg em solução salina), de modo a induzir a metaemoglobinemia e a posterior paragem cardíaca.

### 7.5.2.2 Resultados e Discussão

Os sinais recolhidos no cérebro de rato foram processados e comparados com os resultados obtidos com a sonda da Perimed®. Os três processamentos de sinal foram testados. Os resultados da correlação cruzada, obtidos para cada aquisição (A1, A2,... A11), estão apresentados na tabela 7.3. Um filtro de média móvel com 1000 pontos foi aplicado aos sinais obtidos, antes da determinação da correlação cruzada. Para além disso, os sinais foram normalizados ao seu valor máximo.

Valores menores de correlação foram obtidos com o método de processamento de sinal MC, em geral, e valores maiores foram obtidos com os métodos de processamentos de sinal M0 e M1, para os resultados obtidos com o M1308 e M785, respectivamente.

TABELA 7.3: Correlações obtidas entre os resultados obtidos com a sonda da Perimed® e os resultados obtidos as micro-sondas.

Micro-sonda de 1308 nm					Micro-sonda de 785 nm				
Aquisição	MC	MA	M0	M1	Aquisição	MC	MA	M0	M1
A1	0,90	0,95	0,93	0,92	A7	0,98	0,99	0,92	0,98
A2	0,96	0,97	0,96	0,92	A8	0,75	0,96	0,97	0,97
A3	0,79	0,89	0,90	0,87	A9	0,91	0,94	0,93	0,96
A4	0,86	0,82	0,94	0,84	A10	0,95	0,96	0,96	0,96
A5	0,88	0,94	0,95	0,95	A11	0,92	0,98	0,97	0,95
A6	0,71	0,91	0,85	0,75					

No que diz respeito às variações do fluxo cerebral provocadas pela injeção sistémica de nitrito de sódio, um efeito bifásico na perfusão sanguínea é esperado. Na primeira reacção a perfusão aumenta ligeiramente logo após a injeção, devido à vasodilatação

induzida pelo nitrito [160], e aumenta mais tarde, devido ao aumento do débito cardíaco (para equilibrar o transporte de oxigénio devido à diminuição metaemoglobinemia). Na segunda fase, a perfusão diminui bruscamente devido à paragem cardíaca.

Os sinais apresentados nas figuras 7.16 e 7.17 foram recolhidos em dois animais: num deles foi recolhido sinal com a M1308 (A2), e no outro com a M785 (A10).

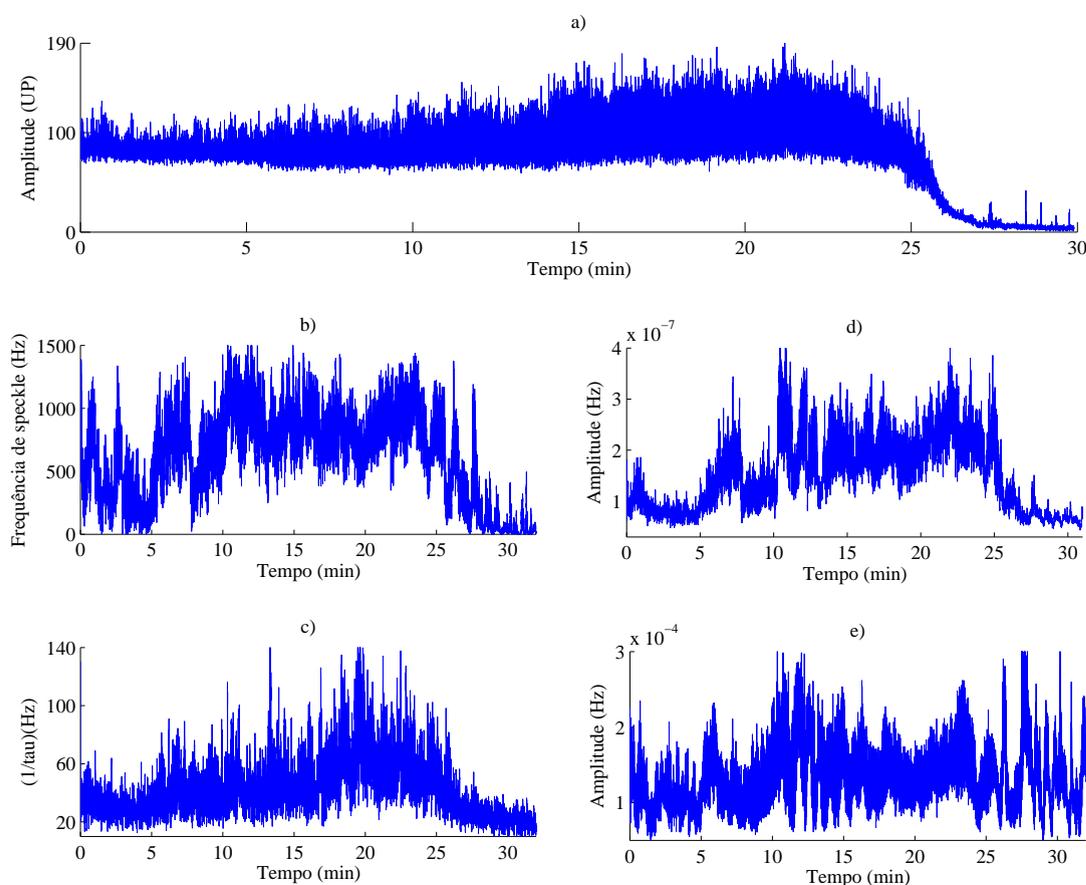


FIGURA 7.16: Resultados da validação *in vivo* obtidos com: a) o Periflux 5000, e com protótipo com a M1308 para os métodos de processamento de sinal: b) MC, c) MA, d) M0 e e) M1.

Nas medições com a M1308 (figura 7.16), podem ver-se 3 regiões distintas nos resultados obtidos com a sonda da Perimed®, e com o protótipo para os métodos de processamento de sinal MC, MA, e M0. O fluxo basal é registado durante os primeiros 5 minutos de aquisição, seguida do aumento da amplitude e das oscilações no sinal. Finalmente, a amplitude diminui depois de 25 minutos de aquisição após a paragem cardíaca. No caso dos resultados obtidos com o M1, um padrão que se altera de acordo com essas três regiões pode ser visto. O pico que ocorre depois da injeção de nitrito foi detectado aos

21,18; 18,22; 19,26 e 22,12 minutos com a sonda da Perimed® e com o protótipo para os métodos de processamento de sinal MC, MA e M0, respectivamente. A percentagem de aumento, entre os valores médios de fluxo basal e o pico, foram de 32,6%, 69,45%, 74,72%, 74,20% com a sonda da Perimed® e com o protótipo para os métodos de processamento de sinal MC, MA e M0, respectivamente.

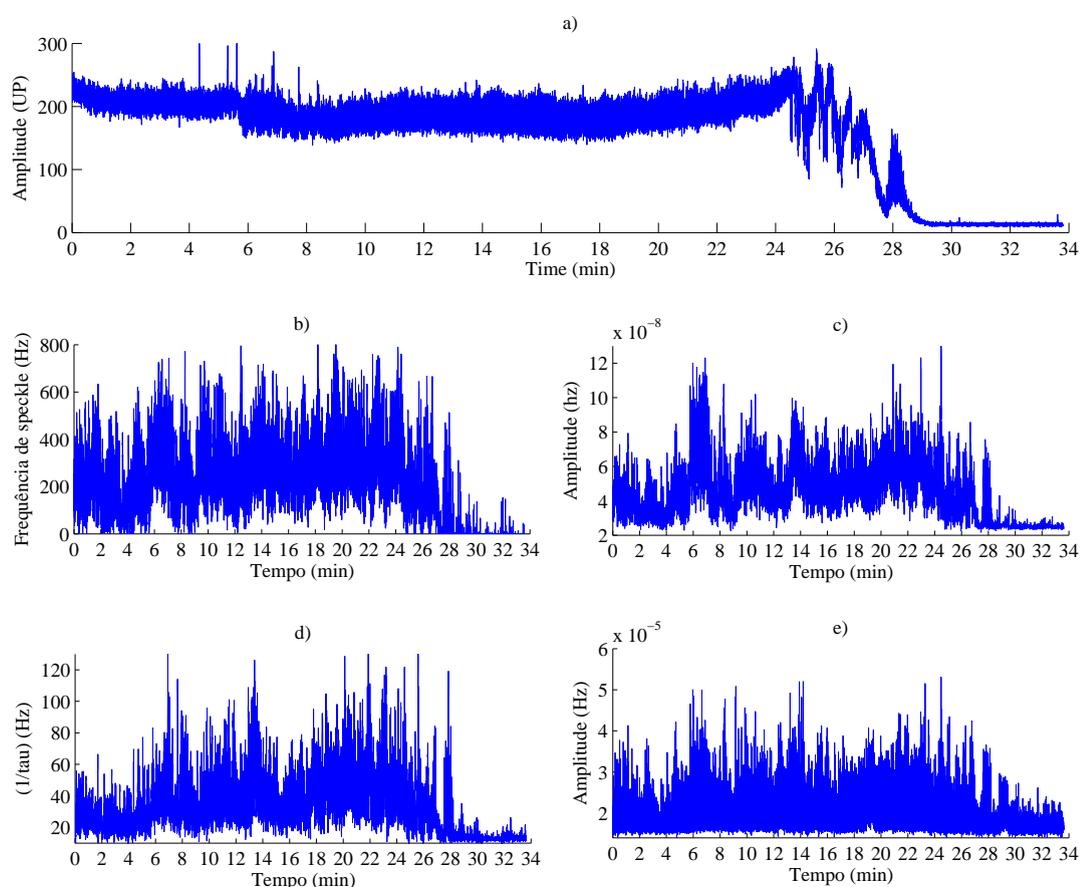


FIGURA 7.17: Resultados da validação *in vivo* obtidos com: a) o Periflux 5000, e com protótipo com a M785 para os processamentos de sinal: b) MC, c) MA, d) M0 e e) M1.

Nos resultados obtidos com a M785 (figura 7.17), o fluxo basal é registado durante os primeiros 5 minutos na sonda da Perimed® e com o protótipo para os métodos de processamento de sinal MC, MA, M0 e M1, respectivamente. Depois da injeção de nitrito a amplitude média diminui nos resultados da sonda da Perimed®. Isto pode ter sido provocado por um deslocamento da sonda durante a injeção de nitrito. Apesar disso, a perfusão aumenta nos 19 minutos seguintes, seguido de um aumento das oscilações da amplitude e finalmente, passados 27 minutos a amplitude diminui após a paragem cardíaca nos resultados obtidos com a sonda da Perimed®, e com o protótipo para os

métodos de processamento de sinal MC, MA, M0 e M1. O pico que ocorre depois da injeção de nitrito foi detectado aos 25,43; 22,30; 23,12; 24,50 e 24,50 minutos na sonda da Perimed®, e com o protótipo para os métodos de processamento de sinal MC, MA, M0 e M1, respectivamente. A percentagem de aumento foi de 19,10%; 69,85%; 70,25%; 66,17% e 31,3% na sonda da Perimed®, e com o protótipo para os métodos de processamento de sinal MC, MA, M0 e M1, respectivamente. Um pico registado aos 28 minutos com a Perimed®, causado por arritmias cardíacas, também pode ser visualizado nos resultados obtidos com o protótipo.

Os resultados obtidos com a nova sonda são semelhantes aos resultados obtidos com a sonda da Perimed®. As variações na perfusão sanguínea, promovidas pela injeção intraperitoneal de nitrito são claramente visíveis nos sinais obtidos com os dois fluxómetros. Nos sinais obtidos com a M1308, surge um padrão diferente quando é utilizado o M1. No entanto este padrão altera-se nos instantes em que ocorrem as três regiões que aparecem na sonda da Perimed® e nos resultados obtidos com os outros processamentos de sinal. Para as duas aquisições (com a M1308 e com a M785), o pico detectado é aproximadamente no mesmo instante em que ocorre o pico detectado pela sonda da Perimed®. No que diz respeito à percentagem de aumento, ela é maior para as duas micro-sondas desenvolvidas. A percentagem de aumento mais baixa obtida na Perimed® nas medições M785 podem ser devidas ao deslocamento da sonda. Para além disso é preciso ter em conta que faltas de correlação entre as duas sondas podem ocorrer, visto a sonda comercial e a micro-sonda estarem localizadas em hemisférios opostos, e as alterações de fluxo de sangue podem acontecer com diferentes perfis nos dois locais.

Os parâmetros utilizados neste trabalho, tal como a frequência de amostragem, taxa de frequência e frequências de corte, foram baseadas nas recomendadas pelos fabricantes de fluxómetros laser Doppler. No entanto, para a sua validação, mais testes com parâmetros controlados tem de ser realizados. A interferometria *self-mixing* é baseado em sistema ópticos simples mas o fenómeno *self-mixing* é complexo. É necessário perceber como é que o sistema responde a diferentes velocidades e concentrações de dispersores de modo usar essa informação nas medições de perfusão. As variações da intensidade de luz dispersada e a sua relação com a perfusão, assim como as propriedades estatísticas do *speckle* dos sinais *self-mixing* registados no fluxo sanguíneo microcirculatório tem de ser compreendidas [72, 161]. Isto é crucial para a comparação entre sensores baseados em *self-mixing* e os fluxómetros comerciais. Para além disso, a falta de um método de calibração também

é uma desvantagem. Um método de calibração adequado poderia melhorar a resposta da micro-sonda a variações mais suaves de perfusão e a uma diferenciação mais clara do sinal antes e depois da paragem cardíaca.

É de salientar que alguns dos ratos utilizados, já tinham sido alvo de testes anteriores, o que pode ter influenciado a resposta aos estímulos realizados. Isto pode ter sido a causa da reacção aos estímulos nalgumas aquisições ser diferente da resposta esperada.

## 7.6 Conclusões

As simulações Monte Carlo são uma ferramenta útil para perceber fenómenos complexos com o que é a interacção da luz com meios túrbidos. Neste estudo, as simulações Monte Carlo foram utilizadas para definir o posicionamento da micro-sonda relativo à região a ser monitorizada. Os resultados mostraram que a micro-sonda de 785 nm deve ser colocada 0,15 mm acima da região de interesse. Para a luz laser de 1308 nm é esperada uma penetração reduzida, uma vez que nesta região do espectro a luz laser sofre fenómenos de absorção pela água. Neste caso a sonda deverá ser colocada o mais próximo possível da região a ser monitorizada.

Na validação *in vitro*, do protótipo construído, foi obtida uma boa linearidade com a variação da velocidade dos dispersores para todos os métodos de processamento de sinal testados, pois o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi sempre próximo da unidade.

As alterações do fluxo microcirculatório no cérebro de ratos, em resposta a estímulos químicos, foram detectadas com as micro-sondas estudadas, para os dois comprimentos de onda: a perfusão aumenta com a injeção de nitrito e diminui depois da paragem cardíaca. Uma boa correlação com os resultados obtidos com o Periflux 5000 foi obtida principalmente para o MA, M0 e M1. No entanto mais medições teriam de ser efectuadas para a obtenção de uma análise estatística mais fidedigna.

## Capítulo 8

# Considerações finais

*Este capítulo apresenta as considerações finais resultantes dos trabalhos de pesquisa descritos nesta tese. São apresentados também algumas considerações a ser tidas em conta para a investigação futura na área da fluxometria laser Doppler.*

### 8.1 Conclusões Finais

Ao longo dos capítulos anteriores foi apresentada a técnica de fluxometria laser Doppler e foram propostas soluções de instrumentação para medir a perfusão sanguínea, *in vivo*, na pele humana e no cérebro de ratos. A instrumentação desenvolvida foi aplicada utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*, e foi testada através de análise numérica, utilizando o método de Monte Carlo, procurando-se a sua validação.

As alterações na microcirculação cutânea são uma consequência frequente de algumas doenças comuns. Estas alterações podem ter lugar, apenas, ou na microcirculação nutricional ou termo-regulatória, ou podem afectar as duas principais camadas da microcirculação cutânea. A técnica de FLD tem-se afirmado como o método mais eficaz (e de confiança) para monitorizar o micro-fluxo sanguíneo tanto em ambiente clínico, como em ambiente de investigação [77]. Vários trabalhos científicos para dar a esta técnica capacidade de discriminação em profundidade têm vindo a ser publicados. Alguns estudos propuseram o uso de diferentes comprimentos de onda ou de diferentes configurações geométricas de sondas, com o objectivo de atingir diferentes profundidades a medir utilizando técnicas de FLD [3, 14, 19, 25, 28–31]. No entanto, trabalho adicional

era necessário, com o objectivo de ganhar mais conhecimento e controlo na profundidade amostrada na monitorização da perfusão na pele.

A proposta aqui apresentada foi a de se juntar num único fluxómetro as variáveis referidas (comprimento de onda e configuração geométrica - distância entre as fibras emissora e receptora - da sonda). Apenas dois grupos de investigação propuseram estudar *in vivo* estas duas variáveis em simultâneo, embora denotando algumas limitações [27, 32]. Este trabalho de pesquisa pretende dar um rumo mais eficaz à referida técnica, de modo a que esta possa ser utilizada para um melhor entendimento dos fenómenos/mecanismos associados à microcirculação sanguínea, almejando vir a ser úteis para um melhor diagnóstico da evolução de doenças que afectam o fluxo microcirculatório.

Na tecnologia desenvolvida, composta por três diodos laser com diferentes comprimentos de onda (635, 785 e 830 nm) que são direccionados, em instantes diferentes, para a pele através da mesma fibra óptica. A luz dispersa é guiada, através de fibras ópticas (receptoras) que se encontram a 0,14 mm, 0,25 e 1,2 mm da fibra central (emissora), para o sistema de detecção. Os resultados assim obtidos foram comparados com os resultados recolhidos com um fluxómetro comercial.

Simulações Monte Carlo comprovaram que o sistema construído tem capacidade para medir o fluxo presente em diferentes volumes de tecido, uma vez que a profundidade média a que se produzem os fotões dispersados e detectados aumenta com o comprimento de onda (no intervalo compreendido entre os 635 e os 830 nm) e com a distância entre as fibras emissoras e receptoras (0,00; 0,14; 0,25 e 1,20 mm).

Nos testes *in vitro*, utilizámos fantomas, onde variáveis como a velocidade e a concentração de dispersores podem ser manipuladas. Nos resultados obtidos mostra-se que a perfusão aumenta para os dois fluxómetros (protótipo e comercial) com o aumento da velocidade e da concentração dos dispersores, sendo que esse aumento varia linearmente com a velocidade dos dispersores.

Os resultados obtidos com o protótipo desenvolvido mostraram uma boa concordância com os resultados do fluxómetro comercial, quer na calibração, quer nas medições nos fantomas e na pele humana.

Teoricamente, bem como nas simulações, diferentes camadas de pele (a diferentes profundidades) são monitorizadas (velocidade e concentração dos dispersores) por diferentes

comprimentos de onda e por diferentes distâncias entre fibras, por isso uma distinção entre a perfusão superficial e a perfusão profunda é possível. Nos testes de validação *in vivo* mostrou-se que a perfusão, de modo geral, aumenta com a distância entre fibras, mas o mesmo não acontece quando são comparados os resultados com diferentes comprimentos de onda crescentes. No entanto, foram obtidas diferenças quando se compararam perfusões sanguíneas obtidas utilizando diferentes comprimentos de onda e diferentes distâncias entre fibras, nas várias análises realizadas. Estas diferenças são mais visíveis, quando se comparam os dados recolhidos com diferentes comprimentos de onda, tendo sido obtidas coerências espectrais menores.

Análises no domínio dos tempos e no domínio das frequências de sinais de perfusão obtidos com fluxómetros comerciais foram realizadas no decorrer dos trabalhos desenvolvidos e descritos nesta dissertação. Num desses estudos foi demonstrado que a perfusão microcirculatória apresenta uma grande variação superficial, quando diferentes regiões de pele são monitorizadas. Estas variações estão correlacionadas com as várias arquiteturas microcirculatórias existentes em diferentes regiões da pele. Num segundo estudo realizado em pacientes, constatou-se que a regularidade dos sinais de FLD recolhidos na ponta do dedo, onde circula um fluxo sanguíneo basal, é diferente em pacientes com esclerose sistémica quando comparada com a regularidade de sinais obtidos em indivíduos saudáveis, ou com fenómeno de Raynaud. Este estudo mostra que a análise da entropia pode ser uma ferramenta útil para avaliar pacientes com esclerose sistémica (SSc).

O fluxo sanguíneo no cérebro é regulado local e dinamicamente de modo a responder à demanda energética associada ao aumento da actividade neuronal. A necessidade de se compreender melhor estes mecanismos, levaram os investigadores a recorrer à FLD, pois com esta técnica consegue-se monitorizar o fluxo sanguíneo em tempo real e com uma grande resolução espacial. No entanto, as sondas de FLD existentes no mercado têm dimensões tais (na ordem dos 450  $\mu m$ ), que podem danificar o tecido de tal modo que pode afectar as medições, principalmente quando se pretende monitorizar o fluxo sanguíneo em órgãos pequenos, tais como o cérebro de um rato.

Esta limitação levou-nos à construção de um fluxómetro, sob a forma de protótipo, utilizando duas micro-sondas, uma com um díodo laser de 785 nm e outra com 1308 nm, com diâmetros externos de 260  $\mu m$ . Esta redução de diâmetro obrigou-nos ao recurso à técnica de detecção *self-mixing*. Utilizando esta técnica consegue-se com uma única

fibra óptica emitir luz laser e receber essa luz depois de sofrer desvio Doppler, poupando assim uma segunda, podendo deste modo reduzir significativamente os efeitos nefastos, quando se utiliza com carácter intrusivo.

Os testes *in vitro* e *in vivo* realizados com as duas micro-sondas, demonstraram que estas poderiam ser utilizadas para a monitorização de dispersores sanguíneos em movimento.

Na validação *in vitro*, as sondas apresentaram uma boa linearidade com a velocidade dos dispersores, para os três métodos de processamento de sinal estudados (método das contagens, método da autocorrelação e método do espectro de potência).

Foram realizadas simulações Monte Carlo com o objectivo de definir o posicionamento da micro-sonda na região a ser monitorizada. Os resultados mostraram que a micro-sonda de 785 nm deve ser colocada 150  $\mu\text{m}$  acima da região a ser monitorizada.

Com as micro-sondas estudadas, utilizando os dois comprimentos de onda referidos, foram detectadas alterações do fluxo microcirculatório no cérebro de ratos, como resposta a estímulos químicos. Para além disso, foi obtida uma boa correlação com os resultados obtidos com o sistema comercial Periflux 5000.

Os dados adquiridos com os dois protótipos desenvolvidos (não-invasivo e invasivo) são animadores e podem ser alvo de interesse comercial, uma vez que existem bons indicadores da sua utilidade, tanto a nível clínico, como a nível de pesquisa.

No que diz respeito ao protótipo não-invasivo, este fluxómetro poderá complementar o diagnóstico de certas doenças que afectam o fluxo microcirculatório. No entanto, serão necessários testes em pacientes.

Já o protótipo invasivo, poderá ser útil em diversas áreas, onde há interesse em seguir o fluxo microcirculatório de um modo intrusivo. Foi submetida uma patente com aplicação europeia.

## 8.2 Sugestões para trabalho futuro

Com a consciência de que o percurso de investigação científica nunca tem um fim definido, entende-se que este trabalho pode ser alvo de investigação futura. A apresentação de algumas sugestões de trabalho futuro, consideradas importantes para o enriquecimento deste trabalho, vão ser seguidamente expostas:

- Melhorias nos protótipos (não-invasivo e invasivo) construídos podem ser levadas a cabo, nomeadamente a utilização do processamento de sinal em tempo real.

Neste momento, a recolha e conversão digital dos sinais é feita com uma única placa de aquisição de dados (da família *NI-USB data acquisition*) e o seu processamento é feito *a posteriori*, em ambiente Matlab. Como parêntesis podemos dizer que no protótipo invasivo, é possível seguir-se o valor da perfusão no decorrer das medições (embora com algumas limitações), uma vez que neste caso são adquiridos sinais pela placa de aquisição de dados, utilizando um único canal. Para tal tornar-se-ia necessário acoplar um módulo de processamento digital (DSP) aos sistemas desenvolvidos. Isto implicaria algumas modificações no *hardware* actual, nomeadamente o condicionamento do sinal aos requisitos exigidos pelo DSP, e a realização de algumas operações que, neste momento, são feitas em *hardware* em modo analógico. Esta proposta, está esquematizada nas figuras 8.1 e 8.2.

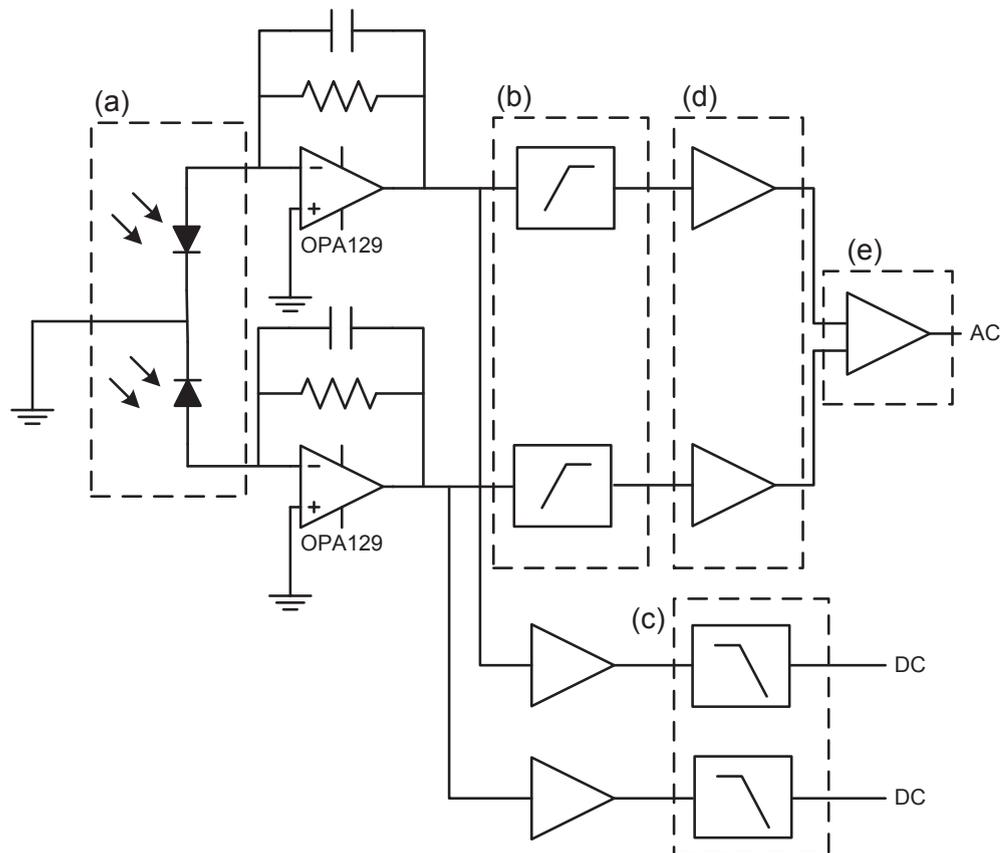


FIGURA 8.1: Esquema de processamento em tempo real, onde se podem ver: (a) o fotodetector bi-celular, (b) o filtro analógico passa alto, (c) o filtro analógico passa baixo, (d) o sistema de amplificação dos sinais AC, e (e) a sua diferenciação.

Tendo em consideração a figura 8.1 os sinais passam do fotodetector bi-celular (detalhe 8.1 (a)) para dois filtros analógicos para separar a componente AC da componente DC do sinal de tensão obtido pelos amplificadores de trans-impedância (detalhes 8.1 (b) e (c)). O sinal AC será então amplificado (detalhe 8.1 (d)) e diferenciado (detalhe 8.1 (e)), usando amplificadores diferenciais, de modo a rejeitar as tensões em modo comum às duas áreas de detecção do fotodetector.

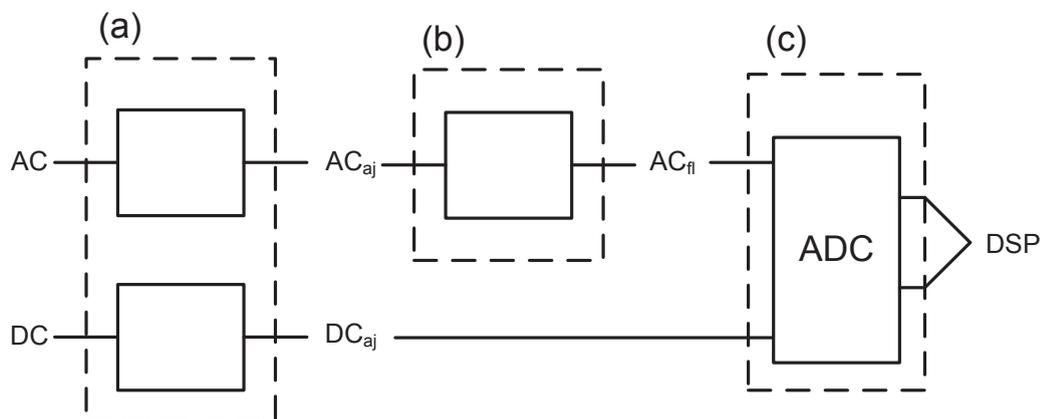


FIGURA 8.2: Esquema de processamento em tempo real, onde se podem ver: (a) os blocos de ajustamento de sinal, (b) o bloco que representa a filtragem anti-aliasing, e (c) o ADC.  $AC_{aj}$  e  $DC_{aj}$  representam as componentes AC e DC ajustadas à entrada do ADC, e  $AC_{fl}$  representa a componente AC filtrada.

As componentes AC e DC, que aparecem no andar final da figura 8.1, terão de ser ajustadas em amplitude e filtradas antes de serem digitalizadas e amostradas pelo DSP. Tendo em conta a figura 8.2 os sinais AC e DC são ajustados à gama de entrada do ADC (detalhe 8.2 (a)). Aqui, o sinal AC é amostrado a 50 kHz, enquanto que o sinal DC o poderá ser a taxas inferiores. Também será conveniente utilizar uma filtragem anti-aliasing (detalhe 8.2 (b)) antes da digitalização e da amostragem pelo ADC (detalhe 8.2 (c)). A saída do ADC alimenta o DSP (*e.g.* TMS320VC5509A da Texas Instruments®).

Esta nova configuração de *hardware* é proposta para os dois protótipos (não-invasivo e invasivo) com as devidas adaptações. Fundamentalmente devido às áreas de detecção que no caso do protótipo não invasivo é uma área dupla e no caso do invasivo é uma área simples

Com a incorporação de um sistema digital de aquisição e processamento de dados, o protótipo não-invasivo estará pronto para ser validado com testes clínicos. Estes serão fundamentais para o estudo de viabilidade da comercialização do protótipo:

- No que diz respeito à calibração do sistema não-invasivo podem ser feitas melhorias, relativamente a uma determinação mais precisa da recta de ruído. O facto de o zero biológico ser inferior no fluxómetro comercial sugere que este fluxómetro é mais eficiente na eliminação de ruído. Um estudo mais profundo do processo de calibração, utilizando uma maior gama de variação das intensidades de luz LED, poderia contribuir para uma redução mais eficaz do ruído.
- Nos dois protótipos desenvolvidos (não-invasivo e invasivo), são necessários trabalhos de validação mais extensos. No protótipo não-invasivo, um estudo da influência da temperatura, que está relacionada com a actividade dos *shunts* arteriovenosos, poderia trazer esclarecimentos adicionais acerca da profundidade medida, assim como ajudar a compreender os mecanismos associados à termo-regulação. Dados a recolher em pacientes com doenças que afectam a microcirculação também poderia trazer mais informação acerca da aplicabilidade clínica do protótipo. Para que isso tenha sucesso, a aplicação de processamento de sinal em tempo real é crucial.
- Outro aspecto importante a desenvolver seria a conjugação das medições reais com simulações Monte Carlo. A proposta consiste na alteração sucessiva do modelo de pele simulado até que o espectro resultante iguale o espectro dos sinais recolhidos *in vivo*. Existe um estudo semelhante [31] associado a medições efectuadas com um protótipo existente no mercado. Este modelo também poderia ser utilizado para estimar a perfusão em unidades absolutas (volume de sangue/100 g tecido  $\times$  mm/s).

A aplicação do algoritmo, desenvolvido por Larsson e Stromberg [162–164], para determinar as velocidades dos dispersores presentes num volume de tecido amostrado poderia ser transportado para tratamento dos dados obtidos com o protótipo não-invasivo desenvolvido. Este algoritmo foi aplicado em pacientes diabéticos sujeitos a testes de variação de temperatura [165], obtendo-se resultados que as relacionam com o fluxo microcirculatório, onde estudaram o efeito da doença na fluxo profundo, nos AVAs (*shunts*) e no fluxo microcirculatório nutricional.

- No que diz respeito ao protótipo invasivo, um estudo estatístico mais profundo da resposta das micro-sondas terá de ser realizado. Para além disso, neste protótipo ficou em suspenso o estudo da sua resposta a estímulos locais, como por exemplo, a utilização da molécula do óxido nítrico (NO). A definição de um método de calibração através do uso de um fantoma específico também poderá trazer vantagens.

## Apêndice A

# Resultados Monte Carlo - Fantoma

Neste apêndice são apresentados os resultados obtidos nas simulações Monte Carlo realizadas com o fantoma.

TABELA A.1: Profundidade média dos eventos Doppler para cada fotão, percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e o número médio de dispersões Doppler por fotão quando é injectado leite no micro-tubo para o comprimento de onda de 635 nm.

DF (mm)	Velocidade (mm/s)	Profundidade média (mm)	Percentagem Doppler (%)	Dispersão média Doppler
0,00	1,56	0,32	10,27	10,08
	3,12	0,32	10,26	10,08
	4,68	0,32	10,19	10,24
	6,25	0,32	10,28	10,07
	7,78	0,32	10,27	10,09
	9,35	0,32	10,18	10,25
0,14	1,56	0,35	41,26	12,66
	3,12	0,35	41,26	12,68
	4,68	0,35	41,25	12,67
	6,25	0,35	41,25	12,65
	7,78	0,35	41,26	12,67
	9,35	0,35	41,27	12,68
0,25	1,56	0,37	56,45	14,27
	3,12	0,38	56,36	14,36
	4,68	0,37	56,48	14,27
	6,25	0,37	56,45	14,25
	7,78	0,38	56,37	14,37
	9,35	0,37	56,49	14,26
1,20	1,56	0,53	87,47	26,63
	3,12	0,53	87,50	26,51
	4,68	0,53	87,51	26,52
	6,25	0,53	87,48	26,56
	7,78	0,53	87,50	26,53
	9,35	0,53	87,52	26,53

TABELA A.2: Profundidade média dos eventos Doppler para cada fotão, percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e o número médio de dispersões Doppler por fotão quando é injectada solução aquosa de leite a 50% no microtubo para o comprimento de onda de 635 nm.

DF (mm)	Velocidade (mm/s)	Profundidade média (mm)	Percentagem Doppler (%)	Dispersão média Doppler
0,00	1,56	0,34	6,73	5,85
	3,12	0,34	6,70	5,97
	4,68	0,34	6,65	5,97
	6,25	0,34	6,73	5,87
	7,78	0,34	6,72	5,87
	9,35	0,34	6,64	5,96
0,14	1,56	0,39	32,35	7,30
	3,12	0,38	32,33	7,40
	4,68	0,39	32,33	7,41
	6,25	0,38	32,18	7,32
	7,78	0,38	32,14	7,32
	9,35	0,39	32,30	7,42
0,25	1,56	0,40	47,76	7,78
	3,12	0,41	48,08	7,78
	4,68	0,41	48,09	7,78
	6,25	0,41	47,72	7,78
	7,78	0,41	48,05	7,78
	9,35	0,41	47,94	7,77
1,20	1,56	0,55	86,00	12,65
	3,12	0,54	85,82	12,60
	4,68	0,55	85,98	12,60
	6,25	0,54	85,82	12,61
	7,78	0,55	86,02	12,62
	9,35	0,55	85,99	12,64

TABELA A.3: Profundidade média dos eventos Doppler para cada fotão, percentagem de fotões que sofreram dispersão Doppler e o número médio de dispersões Doppler por fotão quando é injectada solução aquosa de leite a 25% no microtubo para o comprimento de onda de 635 nm.

DF (mm)	Velocidade (mm/s)	Profundidade média (mm)	Percentagem Doppler (%)	Dispersão média Doppler
0	1,56	0,36	4,77	3,48
	3,12	0,36	4,76	3,46
	4,68	0,36	4,80	3,47
	6,25	0,36	4,78	3,47
	7,78	0,36	4,90	3,50
	9,35	0,36	4,90	3,37
0,14	1,56	0,41	26,00	4,29
	3,12	0,41	25,86	4,29
	4,68	0,41	25,60	4,29
	6,25	0,41	26,10	4,26
	7,78	0,41	26,10	4,25
	9,35	0,41	26,10	4,26
0,25	1,56	0,43	41,23	4,37
	3,12	0,43	41,27	4,40
	4,68	0,43	41,30	4,37
	6,25	0,43	41,20	4,40
	7,78	0,43	41,10	4,40
	9,35	0,43	41,10	4,40
1,20	1,56	0,56	82,00	6,47
	3,12	0,56	82,00	6,49
	4,68	0,56	82,00	6,49
	6,25	0,56	81,90	6,46
	7,78	0,56	81,90	6,46
	9,35	0,56	81,80	6,46

TABELA A.4: Número médio de caminhos percorridos, profundidade média e caminho médio percorrido, quando é utilizado leite como dispersor.

Velocidade (mm/s)	DF (mm)	Caminhos percorridos	Profundidade média (mm)	Caminho total percorrido (mm)
1,56	0,00	3,49	1,41	10,43
	0,14	7,04	0,22	2,53
	0,25	9,53	0,21	2,43
	1,20	27,67	0,45	6,24
3,12	0,00	3,49	1,41	10,43
	0,14	7,05	0,22	2,53
	0,25	9,54	0,21	2,45
	1,20	27,59	0,45	6,23
4,68	0,00	3,51	1,39	10,36
	0,14	7,04	0,22	2,52
	0,25	9,54	0,22	2,44
	1,20	27,59	0,45	6,22
6,25	0,00	3,49	1,41	10,43
	0,14	7,04	0,22	2,52
	0,25	9,52	0,21	2,42
	1,20	27,62	0,45	6,23
7,78	0,00	3,49	1,40	10,43
	0,14	7,04	0,22	2,53
	0,25	9,55	0,22	2,46
	1,20	27,61	0,45	6,23
9,35	0,00	3,51	1,39	10,36
	0,14	7,05	0,22	2,53
	0,25	9,53	0,21	2,43
	1,20	27,62	0,45	6,23

TABELA A.5: Número médio de caminhos percorridos, profundidade média e caminho médio percorrido, quando é utilizada uma solução aquosa com 50% de leite como dispersor.

Velocidade (mm/s)	DF (mm)	Caminhos percorridos	Profundidade média (mm)	Caminho total percorrido (mm)
1,56	0,00	3,37	1,41	10,74
	0,14	7,06	0,24	2,58
	0,25	9,51	0,24	2,45
	1,20	25,91	0,47	6,07
3,12	0,00	3,38	1,40	10,80
	0,14	7,04	0,24	2,58
	0,25	9,64	0,23	2,47
	1,20	26,09	0,46	6,01
4,68	0,00	3,38	1,43	10,80
	0,14	7,04	0,24	2,59
	0,25	9,61	0,22	2,46
	1,20	26,28	0,47	6,07
6,25	0,00	3,37	1,41	10,74
	0,14	6,98	0,23	2,49
	0,25	9,51	0,22	2,45
	1,20	26,10	0,46	6,01
7,78	0,00	3,37	1,41	10,73
	0,14	6,98	0,23	2,48
	0,25	9,61	0,23	2,46
	1,20	26,25	0,47	6,07
9,35	0,00	3,38	1,43	10,80
	0,14	7,05	0,24	2,59
	0,25	9,54	0,22	2,50
	1,20	26,27	0,47	6,07

TABELA A.6: Número médio de caminhos percorridos, profundidade média e caminho médio percorrido, quando é utilizada uma solução aquosa com 25% de leite como dispersor.

Velocidade (mm/s)	DF (mm)	Caminhos percorridos	Profundidade média (mm)	Caminho total percorrido (mm)
1,56	0,00	3,31	1,45	10,66
	0,14	7,00	0,23	2,53
	0,25	9,66	0,23	2,55
	1,20	25,67	0,47	5,95
3,12	0,00	3,31	1,45	10,69
	0,14	7,00	0,23	2,53
	0,25	9,67	0,23	2,55
	1,20	25,72	0,47	5,95
4,68	0,00	3,31	1,45	10,61
	0,14	7,00	0,23	2,53
	0,25	9,68	0,23	2,53
	1,2	25,72	0,47	5,95
6,25	0,00	3,31	1,45	10,63
	0,14	6,97	0,23	2,53
	0,25	9,70	0,23	2,53
	1,20	25,66	0,47	5,95
7,78	0,00	3,33	1,43	10,69
	0,14	6,97	0,23	2,53
	0,25	9,68	0,23	2,55
	1,20	25,67	0,47	5,94
9,35	0,00	3,32	1,44	10,69
	0,14	6,99	0,23	2,53
	0,25	9,69	0,23	2,53
	1,20	25,66	0,47	5,95



## Apêndice B

### Resultados - Fantoma

Neste apêndice são apresentados os resultados obtidos com o PF5000 e com o protótipo, nos dois fantasmas construídos para a validação *in vitro* do protótipo não-invasivo.

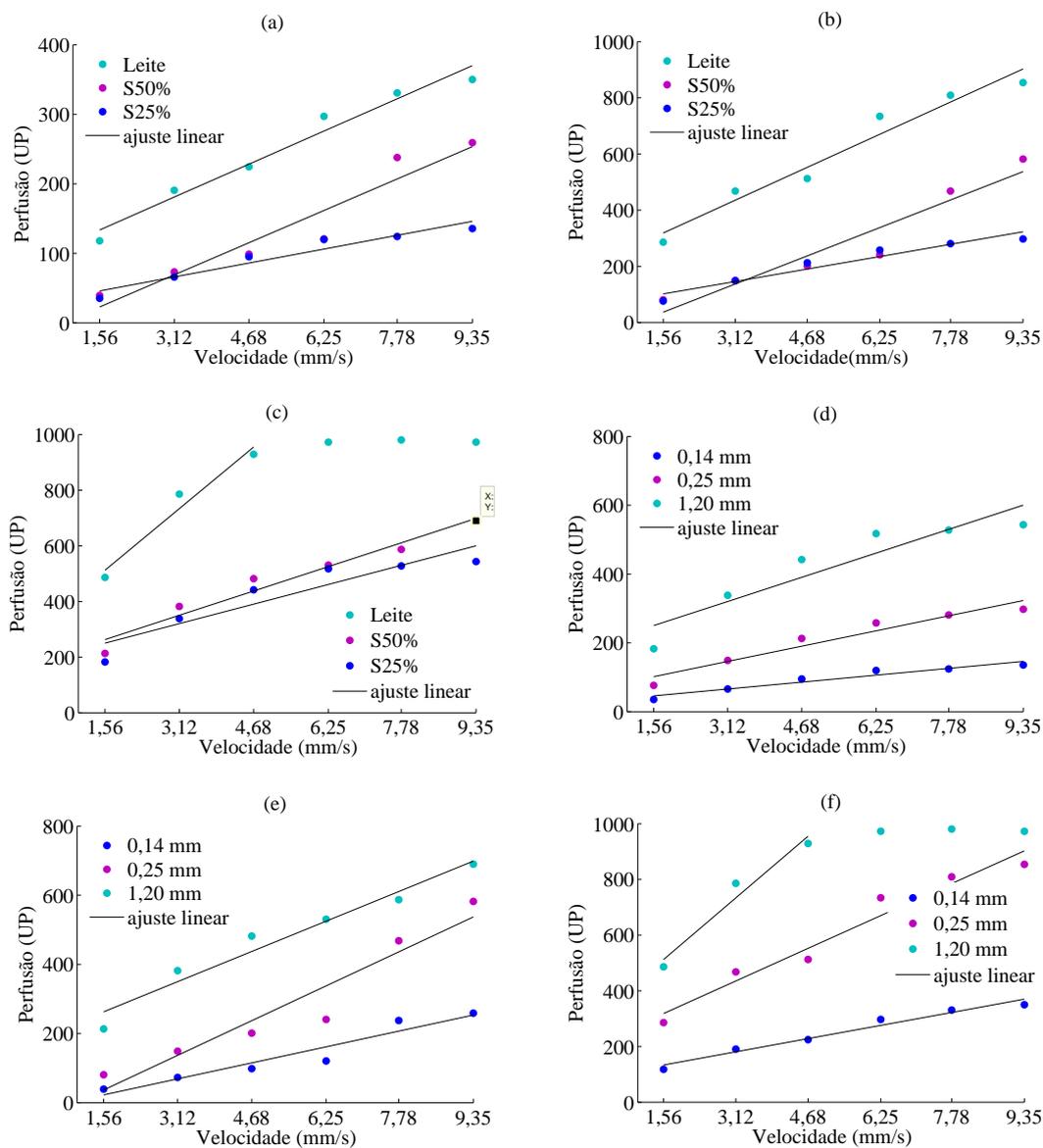


FIGURA B.1: Perfusão obtida no fantoma de teflon® com o PF5000 para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite.

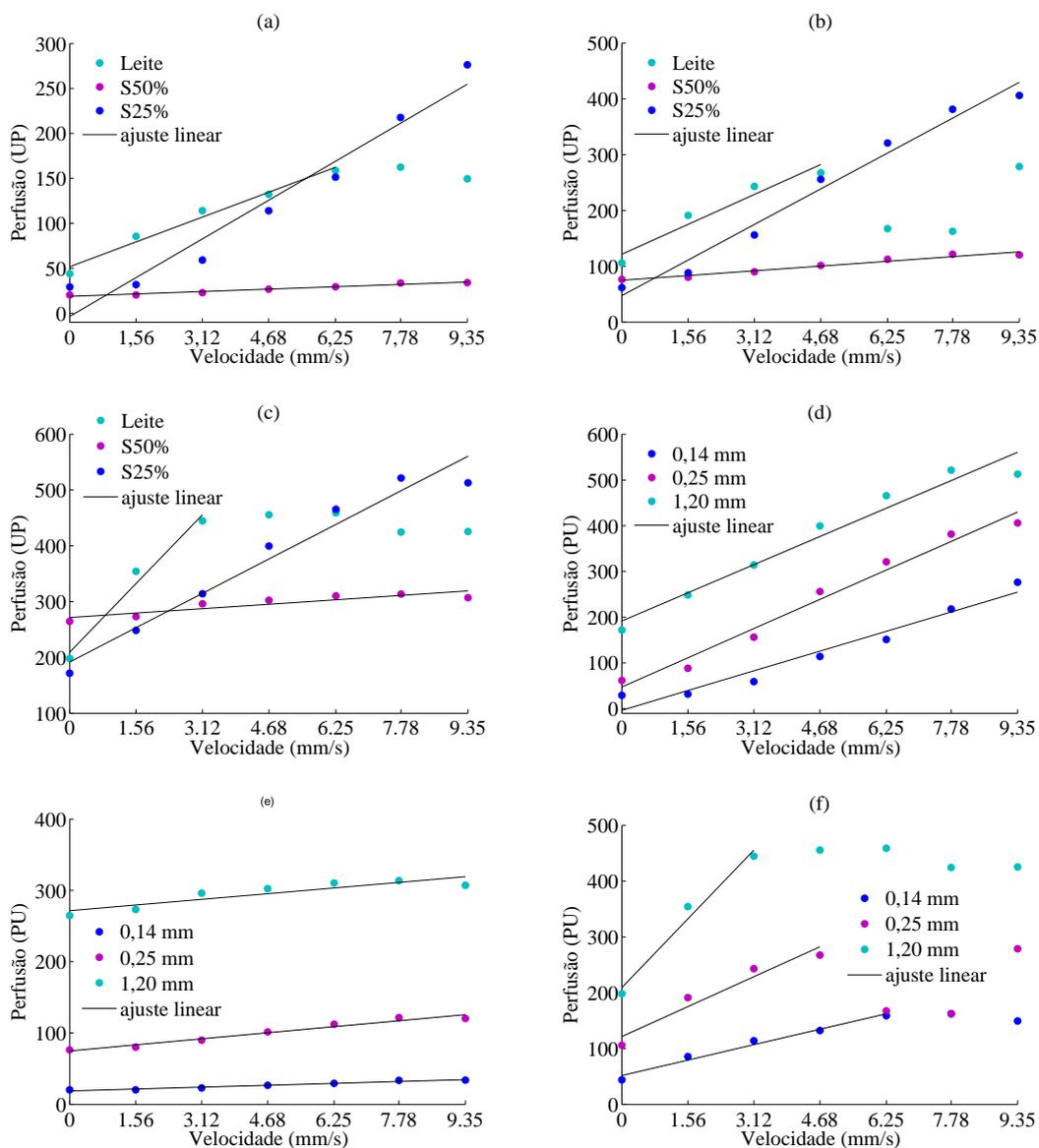


FIGURA B.2: Perfusão obtida no fantoma de teflon® com o comprimento de onda de 635 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite.

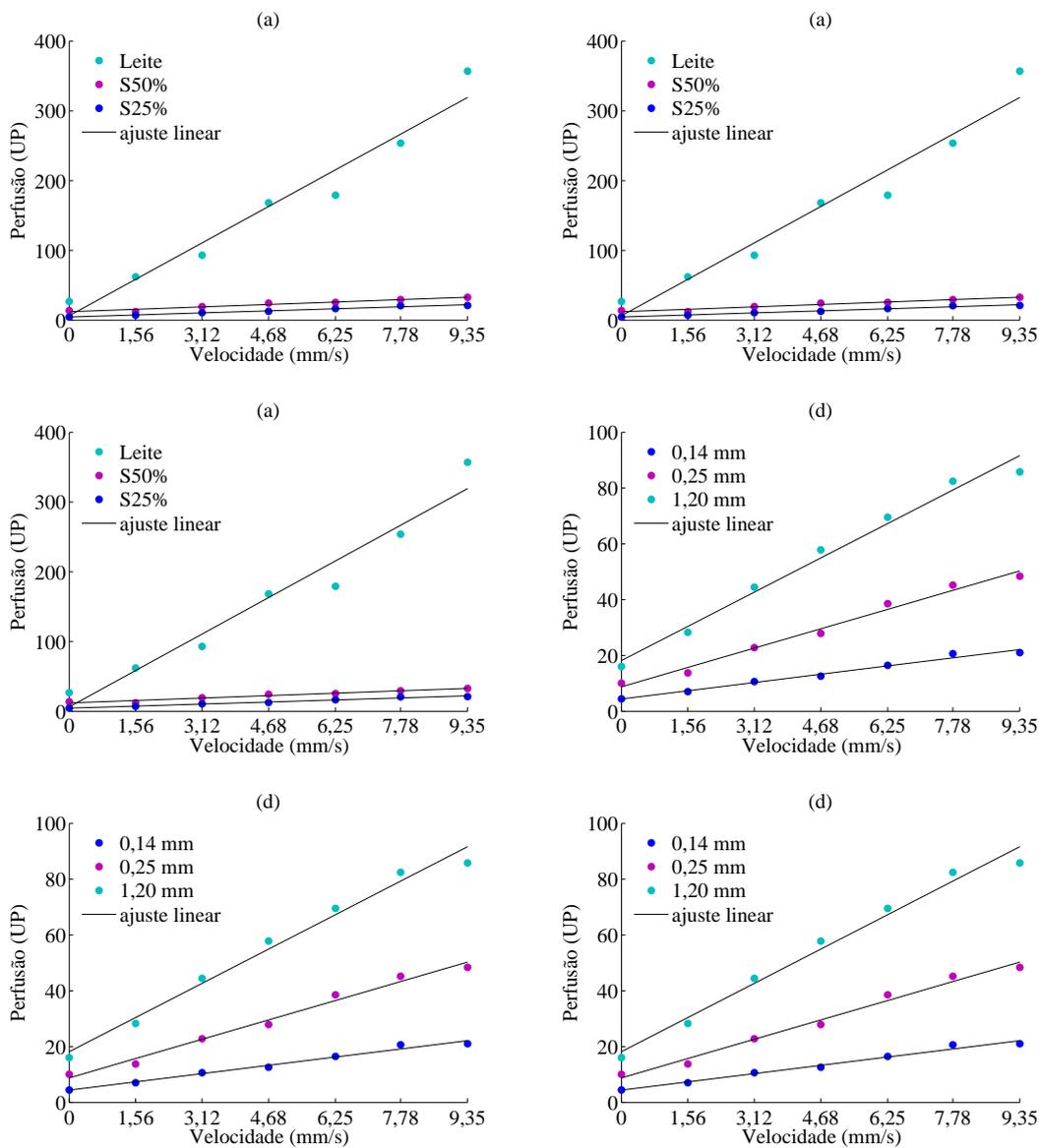


FIGURA B.3: Perfusão obtida no fantoma de teflon® com o comprimento de onda de 785 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite.

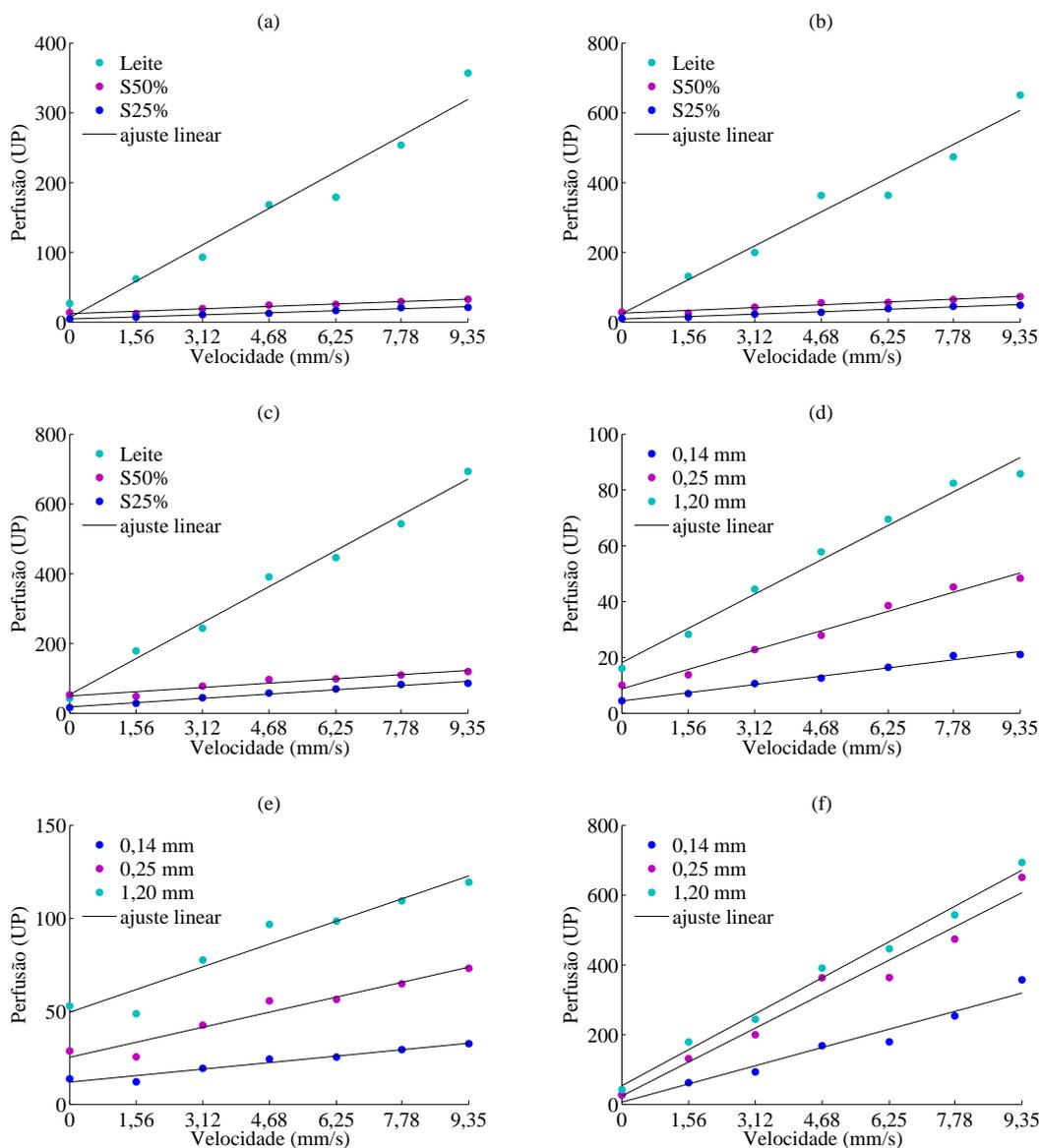


FIGURA B.4: Perfusão obtida no fantoma de teflon® com o comprimento de onda de 830 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite.

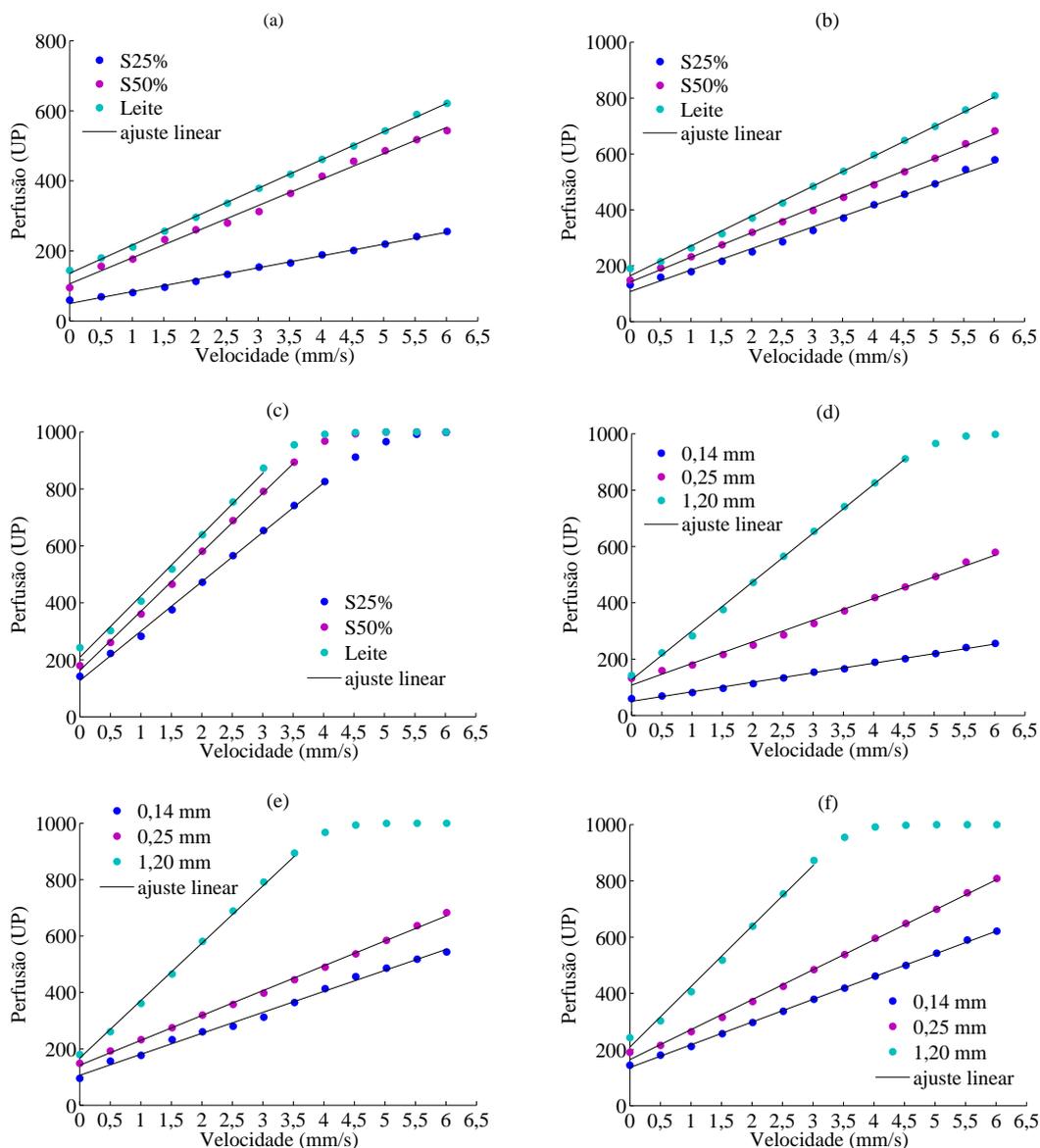


FIGURA B.5: Perfusão obtida no fantoma de acrílico com o PF5000 para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite.

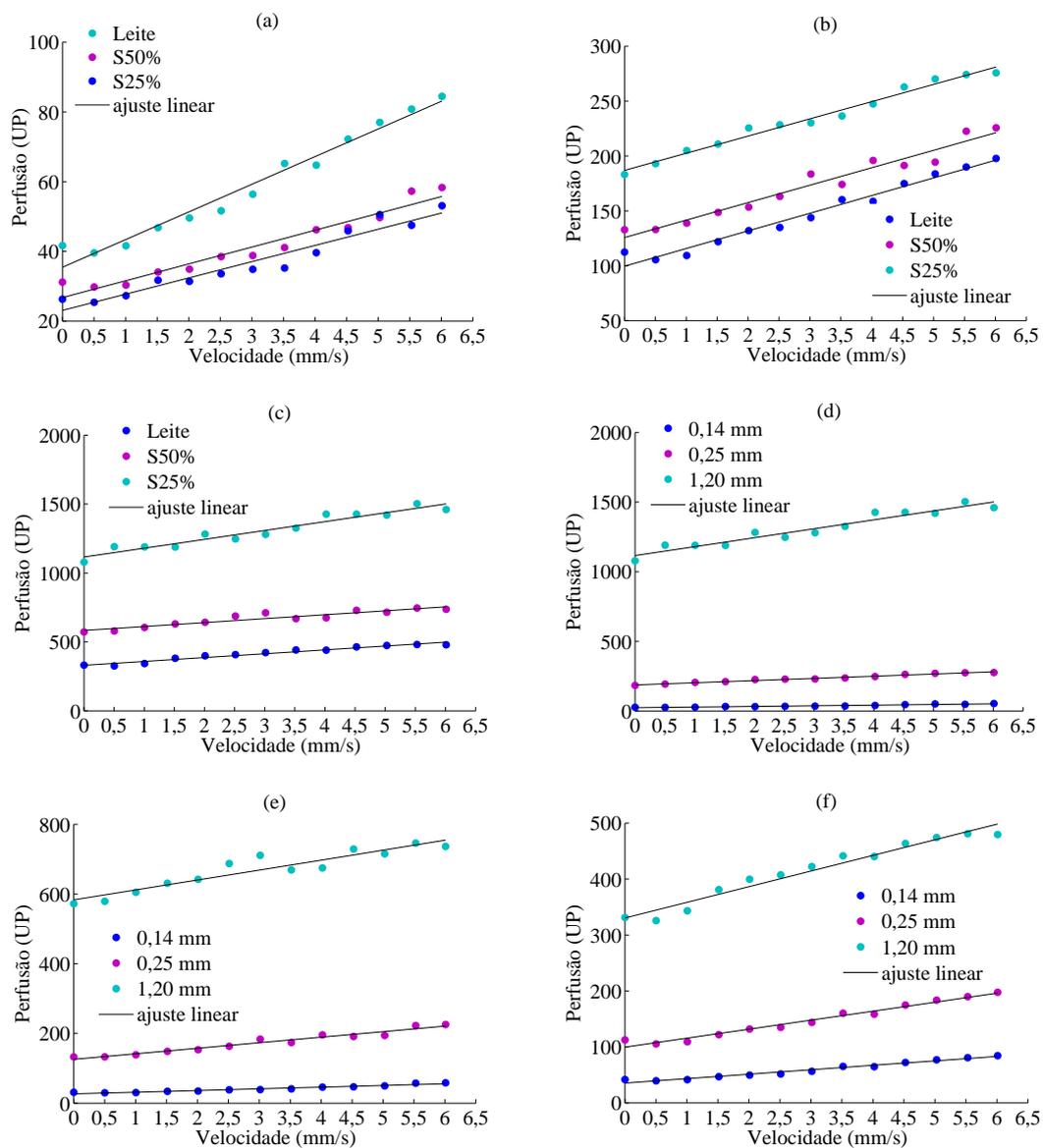


FIGURA B.6: Perfusão obtida no fantoma de acrílico com o comprimento de onda de 635 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite.

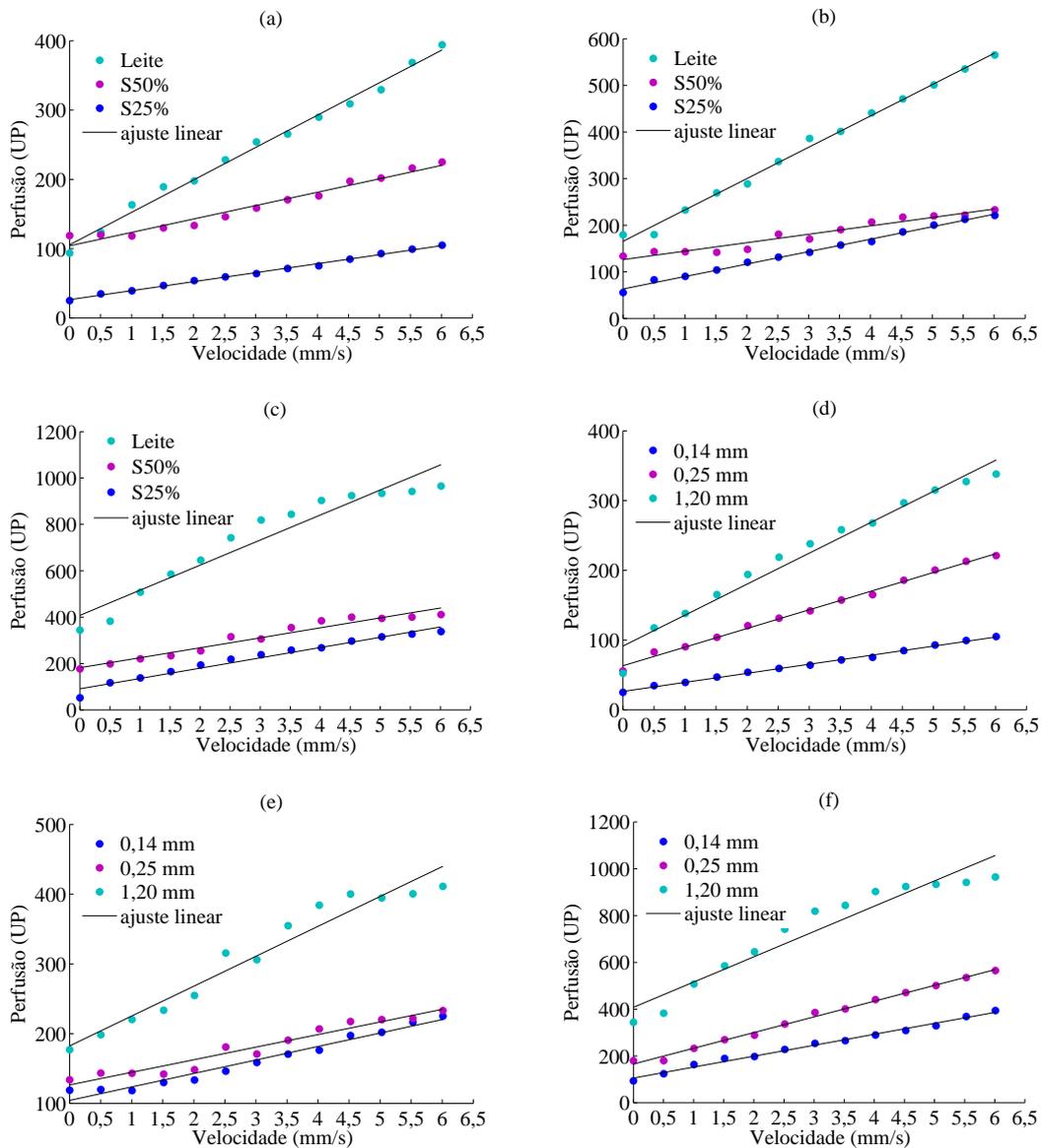


FIGURA B.7: Perfusão obtida no fantoma de acrílico com o comprimento de onda de 785 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite.

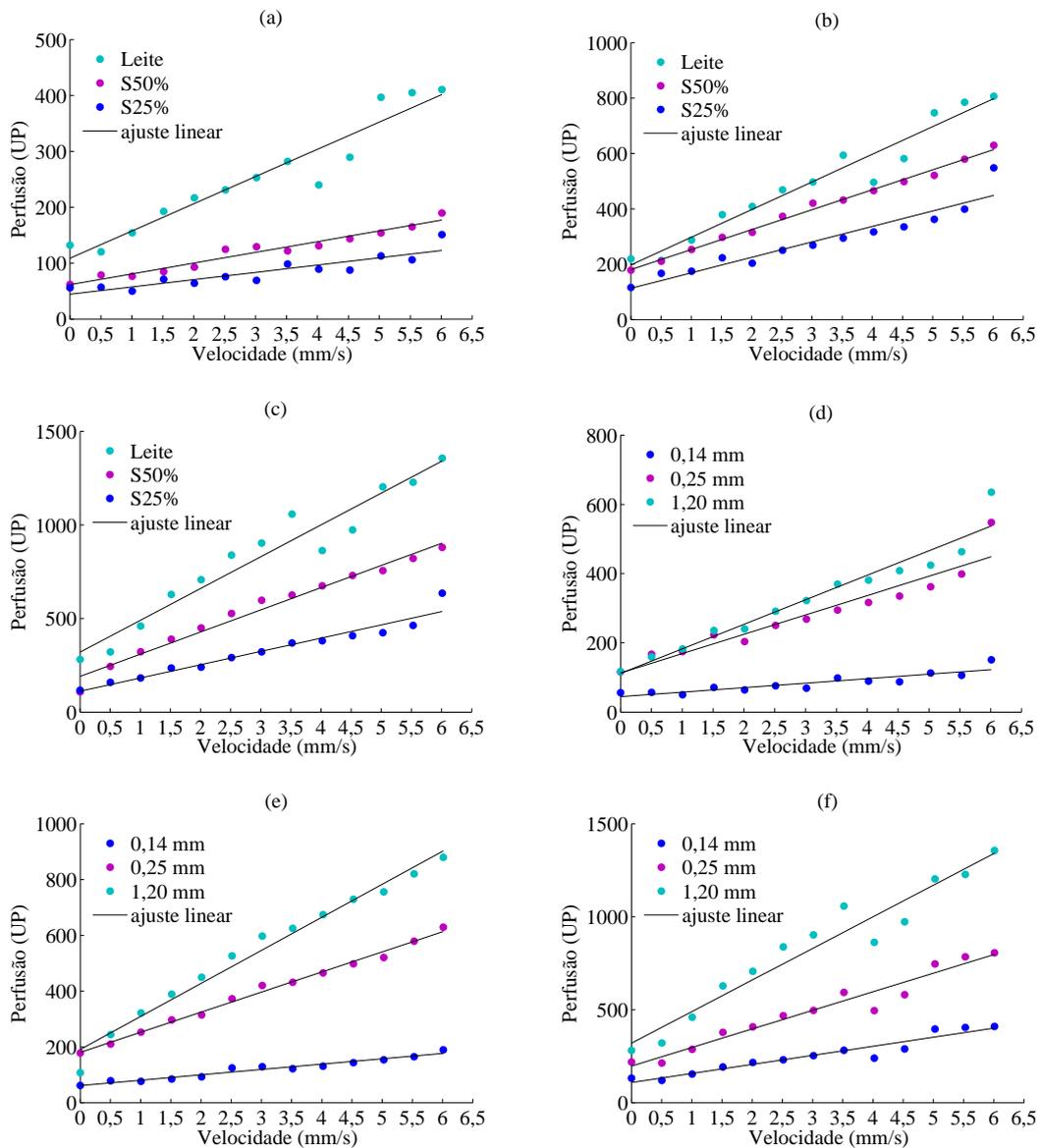


FIGURA B.8: Perfusão obtida no fantoma de acrílico com o comprimento de onda de 830 nm para as fibras localizadas a (a) 0,14; (b) 0,25; e (c) 1,20 mm da fibra emissora; e para (d) 25%, e (e) 50% de solução aquosa de leite, e (f) para o leite.

TABELA B.1: Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos nos resultados da perfusão recolhidos no fantoma de teflon<sup>®</sup>,  $p < 0,01$ , excepto nos casos referidos.

DF (mm)	Solução	C0635 $R^2$	CO785 $R^2$	C0830 $R^2$	PF5000 $R^2$
0,14	Leite	0,97	0,95	0,97	0,97
	S50%	0,96	0,95	0,97	0,96
	S25%	0,95	0,98	0,95	0,96*
0,25	Leite	0,94	0,94	0,97	0,92
	S50%	0,96	0,95	0,94	0,92
	S25%	0,98	0,98	0,97	0,96
1,20	Leite	0,97 <sup>†</sup>	0,99	0,96	0,93
	S50%	0,81	0,93	0,94	0,94
	S25%	0,96	0,98	0,94	0,86

TABELA B.2: Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos nos resultados d perfusão recolhidos no fantoma de acrílico,  $p < 0,01$ .

DF (mm)	Solução	C0635 $R^2$	CO785 $R^2$	C0830 $R^2$	PF5000 $R^2$
0,14	Leite	0,97	0,92	0,99	1,00
	S50%	0,94	0,95	0,97	0,99
	S25%	0,94	0,81	1,00	1,00
0,25	Leite	0,97	0,95	0,99	0,99
	S50%	0,95	0,99	0,95	1,00
	S25%	0,98	0,90	0,99	1,00
1,20	Leite	0,96	0,94	0,93	1,00
	S50%	0,88	0,98	0,95	1,00
	S25%	0,93	0,94	0,97	0,99

\*P=0,13

†P=0,09

## Apêndice C

### Fotografias dos protótipos



FIGURA C.1: Protótipo não-invasivo.



FIGURA C.2: Protótipo invasivo.



# Referências e Bibliografia

- [1] R. J. Gush and T. A. King. Laser doppler perfusion imaging of skin blood flow using red and near-infrared sources. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 29:387–392, 1991.
- [2] A. Jakobsson and G. E. Nilsson. Prediction of sampling depth and photon path-length in laser doppler flowmetry. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 31:301–307, 1993.
- [3] A. Liebert, M. Leahy, and R. Maniewski. Multichannel laser-doppler probe for blood perfusion measurements with depth discrimination. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 36:740–747, 1998.
- [4] B. Varghese, V. Rajan, T. G. V. Leeuwen, and W. Steenbergen. Path-length-resolved optical doppler perfusion monitoring. *Journal of Biomedical Optics*, 12(6):060508(1)–060508(3), 2007.
- [5] E. Figueiras, P. Abraham, L. F. Requicha Ferreira, and A. Humeau. Comparison between laser doppler flowmetry signals recorded in glabrous and non glabrous skin - time and frequency analyses. In *Proceedings of the BIOSIGNALS 2010 - International Conference on Bio-inspired Systems and Signal Processing*, pages 133–138, Valencia, Spain, January 2010.
- [6] P. Carpentier M. Roustit, G. H. Simmons and J. L. Cracowski. Abnormal digital neurovascular response to local heating in systemic sclerosis. *Rheumatology*, 47:860–864, 2008.
- [7] E. Figueiras, M. Roustit, S. Semedo, L. F. Requicha Ferreira, J. L. Cracowski, and A. Humeau. Sample entropy of laser doppler flowmetry signals increases in patients with systemic sclerosis. *Microvascular Research*, 82(2):152–155, 2011.

- [8] G. Bonvento, N. Sibson, and L. Pellerin. Does glutamate image your thoughts? *Trends in Neurosciences*, 25(7):359–364, 2002.
- [9] C. Iadecola. Neurovascular regulation in the normal brain and in alzheimer’s disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5):347–360, 2004.
- [10] R. Steinmeier, I. Bondar, C. Bauhuf, and R. Fahlbusch. Laser doppler flowmetry mapping of cerebrocortical microflow: Characteristics and limitations. *Neuroimage*, 15(1):107–119, 2002.
- [11] M. Fabricius, N. Akgoren, U. Dirnagl, and M. Lauritzen. Laminar analysis of cerebral blood flow in cortex of rats by laser-doppler flowmetry: a pilot study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17:1326–1336, 1997.
- [12] R. Oliveira, S. Semedo, E. Figueiras, L. F. Requicha Ferreira, and A. Humeau. Laser doppler flowmeters for microcirculation measurements. In *1st Portuguese Meeting in Bioengineering - Bioengineering and Medical Sciences - The Challenge of the XXI century. Bioengineering (ENBENG), 2011*, Lisbon, Portugal, March 2011.
- [13] T. M. Odor, T. R. P. Ford, and F. McDonald. Effect of wavelength and bandwidth on the clinical reliability of laser doppler recordings. *Endodontics and Dental Traumatology*, 12:9–15, 1996.
- [14] A. N. Obeid, G. Dougherty, and S. Pettinger. In vivo comparison of a twin wavelength laser doppler flowmeter using he-ne and laser diode sources. *Journal of Medical Engineering and Technology*, 14(3):102–110, 1990.
- [15] N. C. Abbot, W. R. Ferrell, J. C. Lockhart, and J. G. Lowe. Discrimination of capillary and arterio-venular blood flow in skin by laser doppler flowmetry. *The Society for Investigative Dermatology*, 107(6):882–886, 1996.
- [16] R. R. Anderson and J. Parrish. The optics of human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 77:13–19, 1981.
- [17] L. Duteil, J. C. Bernengo, and W. Schalla. A double wavelength laser doppler system to investigate skin microcirculation. *IEEE - Transactions on Biomedical Engineering*, 32(6):439–447, 1985.

- [18] R. F. Bonner and R. Nossal. Modal for laser doppler measurements of blood flow in tissue. *Applied Optics*, 20:2097–2107, 1981.
- [19] A. K. Murray, R. E. Gorodkin, T. L. Moore, R. J. Gush, A. L. Herrick, and T. A. King. Comparison of red and green laser doppler imaging of blood flow. *Lasers in surgery and medicine*, 35:191–200, 2004.
- [20] A. N. Obeid, D. M. Boggett, N. J. Barnett, G. Dougherty, and P. Rolfe. Depth discrimination in laser doppler skin blood flow measurement using different lasers. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 26:415–419, 1988.
- [21] A. K. Murray, A. L. Herrick, T. L. Moore, T. A. King, and C. E. M. Griffiths. Dual wavelength (532 and 633 nm) laser doppler imaging of plaque psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 152:1182–1186, 2005.
- [22] A. K. Murray, T. L. Moore, T. A. King, and A. L. Herrick. Abnormal microvascular response is localized to the digits in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatism*, 54(6):1952–1960, 2006.
- [23] L. Enkema, G. A. Holloway, D. W. Piraino, D. Harry, G. L. Zick, and M. A. Kenny. Laser doppler velocimetry vs heater power as indicators of skin perfusion during transcutaneous  $O_2$  monitoring. *Clinical Chemistry*, 27(3):391–396, 1981.
- [24] T. Tenland. *On laser Doppler flowmetry*. PhD thesis, Linköping University, 1982.
- [25] M. H. Koelink, F. F. M. de Mul, J. Greve, R. Graaff, A. C. M. Dassel, and J. G. Aarnoudse. Laser doppler blood flowmetry using two wavelengths: Monte carlo simulations and measurements. *Applied Optics*, 33(16):3549–3557, 1994.
- [26] W. Jentink, F. F. M. de Mul, G. A. M. Hermsen, R. Graaf, and J. Greve. Monte carlo simulations of laser doppler blood flow measurements in tissue. *Applied Optics*, 29(16), 1990.
- [27] R. J. Gush, T. A. King, and M. I. V. Jayson. Aspects of laser light scattering from skin tissue with application to laser doppler blood flow measurement. *Physics in Medicine and Biology*, 29:1463–1476, 1984.
- [28] M. Larsson, W. Steenbergen, and T. Stromberg. Influence of optical properties and fiber separation on laser doppler flowmetry. *Journal of Biomedical Optics*, 7(2):236–243, 2002.

- [29] F. Morales. *Improving the clinical applicability of laser Doppler perfusion monitoring*. PhD thesis, Universidade de Groningen, 2005.
- [30] W. Steenbergen and F. de Mul. New optical tissue phantom, and its use for studying laser doppler blood flowmetry. *SPIE-proceedings*, 3196:3196–3, 1997.
- [31] I. Fredriksson, M. Larsson, and T. Stromberg. Optical microcirculatory skin model: assessed by monte carlo simulations paired with in vivo laser doppler flowmetry. *Journal of Biomedical Optics*, 13(1):014015–1/014015–12, 2008.
- [32] C. Freccero, P. Wollmer, G. Sundkvist, and H. Svensson. The influence of wavelength and probe configuration on findings of a skin vasoconstriction test when using laser doppler perfusion devices. *Microvascular Research*, 71:64–67, 2006.
- [33] Perimed AB. Periflux system 5000 instrument version 1.70 a 1.79 extended user manual. Instrument version 1.70 a 1.79, 2003.
- [34] I. Fredriksson, M. Larsson, and T. Stromberg. Measurement depth and volume in laser doppler flowmetry. *Microvascular Research*, 78:4–13, 2009.
- [35] M. Salvat-Melis, P. H. Carpentier, A. Moreau-Gaudry, A. Boignard, A. Paris, and J. L. Cracowski. Fourier transform spectral analysis of cutaneous blood flux in systemic sclerosis. *Journal des Maladies Vasculaires*, 32(2):83–89, 2007.
- [36] P. A. Oberg. Laser-doppler flowmetry. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 18:125–163, 1990.
- [37] L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84(24):9265–9269, 1987.
- [38] J. K-J. Li. *Dynamics of the Vascular System*,. 981-02-4907-1. World Scientific Publishing Co. Re. Ltd., 2004.
- [39] G. E. Nilsson, E. G. Sallerud, N. O. T. Stromberg, and K. Wardell. *Laser Doppler Perfusion Monitoring and Imaging*, chapter 15. Biomedical photonics handbook, 2003.

- [40] G. J. Tortora and S. R. Grabowski. *Principles of Anatomy and Physiology*, pages 140–159. John Wiley and Sons, Inc., 2000.
- [41] G. J. Tortora and S. R. Grabowski. *Principles of Anatomy and Physiology*, pages 610–635. John Wiley and Sons, Inc., 2000.
- [42] P. Kvandal, S. A. Landsverk, A. Bernkjak, A. Stefanovska, H. D. Kvernmo, and K. A. Kirkeboen. Low-frequency oscillations of the laser doppler perfusion signal in human skin. *Microvascular Research*, 72:120–127, 2006.
- [43] M. S. Folgosi-Correa. *Caracterizacao das flutuacoes do sinal laser Doppler do fluxo microvascular*. PhD thesis, Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2011.
- [44] A. Stefanovska, M. Bracic, and H. D. Kvernmo. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser doppler technique. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 46(10):1230–1239, 1999.
- [45] H. D. Kvernmo, A. Stefanoska, K. A. Kirkeboen, and K. Kvernebo. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. *Microvascular Research*, 57:298–309, 1999.
- [46] P. A. Oberg. Optical sensoers in medical care. *Sensores Update*, 13, 2004.
- [47] E. Figueiras, V. Loureiro, L. F. Requicha Ferreira, and A. Humeau. Some reasons to build a new laser doppler flowmeter to monitor microvascular blood flow. In *IFMBE Proceedings, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, volume 25/IV, pages 1865–1868, Munich, Germany, 2009.
- [48] M. Roustit and J-L Cracowski. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*, 19(1):47–64, 2012.
- [49] E. Berardesca, J. L. Lã©vãque, and P. Masson. Eemco guidance for the meaasurement of skin microcirculation. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15:442–456, 2002.
- [50] World diabetes foundation, January 2012. <http://www.worlddiabetesfoundation.org/composite-35.htm>.

- [51] L. A. Holowatz, C. S. Thompson-Torgerson, and W. L. Kenney. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *Journal of Applied Physiology*, 105:370–372, 2008.
- [52] O. U. Scremin. *The rat nervous system*, chapter 33, pages 1167–1202. Elsevier, 2004.
- [53] B. Klein, W. Kuschinsky, H. Schrock, and F. Vetterlein. Interdependency of local capillary density, blood flow, and metabolism in rat brains. *American Journal of Physiology*, 251(6):H1333–H1340, 1986.
- [54] P. Coyle. Vascular patterns of the rat hippocampal formation. *Experimental Neurology*, 52:447–458, 1976.
- [55] I. Grivas, H. Michaloudi, C. Batzios, M. Chiotelli, C. Papatheodoropoulos, G. Kostopoulos, and G. C. Papadopoulos. Vascular network of the rat hippocampus is not homogeneous along the septotemporal axis. *Brain Research*, 971:245–249, 2003.
- [56] C. Riva, B. Ross, and G. B. Benedek. Laser doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 11(11):936–44, 1972.
- [57] M. D. Stern. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature*, 254:56–58, 1975.
- [58] I. Fredriksson, C. Fors, and J. Johansson. Laser doppler flowmetry - a theoretical framework. Technical report, Department of Biomedical Engineering, Linköping University, 2007.
- [59] J. D. Briers. Laser doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiological Measurement*, 22:R35–R66, 2001.
- [60] P. G. R. King and G. J. Steward. Metrology with an optical maser. *New Scientist*, page 17:180, 1963.
- [61] M. J. Rudd. A laser doppler velocimeter employing the laser as a mixer- oscillator. *Applied Optics*, 1:723–726, 1968.
- [62] S. Shinohara, A. Mochizuki, H. Yoshida, and M. Sumi. Laser doppler velocimeter using the self-mixing effect of a semiconductor laser diode. *Applied Optics*, 25:1417–1419, 1986.

- [63] T. Shibata, S. Shinohara, H. Ikeda, H. Yoshida, and M. Sumi. Automatic measurement of velocity and length of moving plate using self-mixing laser diode. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 48:1062–1067, 1999.
- [64] S. K. Ozdemir, T. Takasu, S. Shinohara, H. Yoshida, and M. Sumi. Automatic measurement of velocity and length of moving plate using self-mixing laser diode. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 48:1062–1067, 1999.
- [65] S. Donati, G. Giuliani, and S. Merlo. Laser diode feedback interferometer for measurement of displacement without ambiguity. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 31:113–119, 1995.
- [66] T. Gharbi, A. Courteville, and A. Chebbour. Backscatter-modulated laser diode for low-frequency small-amplitude vibration measurement. *Applied Optics*, 35:8233–8237, 1997.
- [67] F. Gouaux, N. Servagent, and T. Bosch. Absolute distance measurement with an optical feedback interferometer. *Applied Optics*, 37:6684–6689, 1998.
- [68] G. Mourat, N. Servagent, and T. Bosch. Distance measurement using the self-mixing effect in a three-electrode distributed bragg reflector laser diode. *Optical Engineering*, 39:738–743, 1998.
- [69] P. J. Rodrigo, M. Lim, and C. Saloma. Optical-feedback semiconductor laser michelson interferometer for displacement measurements with directional discrimination. *Applied Optics*, 40:506–513, 2001.
- [70] S. K. Ozdemir, I. Ohno, and S. Shinohara. A comparative study for the assessment on blood flow measurement using self-mixing laser speckle interferometer. *IEEE Transactions on instrumentation and measurement*, 57(2):355–363, 2008.
- [71] F. F. M. Mul, M. H. Koelink, A. L. Weijers, J. Greve, J. G. Aarnoudse, R. Graaff, and A. C. M. Dassel. Self-mixing laser-doppler velocimetry of liquid flow and of blood perfusion in tissue. *Applied Optics*, 31:5844–5851, 1992.
- [72] S. K. Ozdemir, S. Shinohara, S. Takamiya, and H. Yoshida. Noninvasive blood flow measurement using speckle signals from a self-mixing laser diode: in vitro and in vivo experiments. *Optical Engineering*, 39:2574–2580, 2000.

- [73] K. Meigas, H. Hinrikus, R. Kattai, and J. Lass. Coherent photodetection for pulse profile registration. *Proceedings of SPIE*, 3598:195–202, 1999.
- [74] K. Meigas, R. Kattai, and J. Lass. Continuous blood pressure monitoring using pulse wave delay. In *Proceedings of the 23rd Annual EMBS International Conference*, pages 3171–3174, Istambul, Turkey, 2001.
- [75] A. Courteville, T. Gharbi, and J. Y. Cornu. Noncontact mmg sensor based on the optical feedback effect in a diode laser. *Journal of Biomedical Optics*, 3:281–285, 1998.
- [76] A. Humeau, W. Steenbergen, H. Nilsson, and T. Stromberg. Optical sensoers in medical care. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 45:421–435, 2007.
- [77] Marcus Larsson. *Influence of Optical Properties on Laser Doppler Flowmetry*. PhD thesis, Universidade de Linkoping, 2004.
- [78] V. Rajan, B. Varghese, T. G. Van Leeuwen, and W. Steenbergen. Review of methodological developments in laser doppler flowmetry. *Lasers in Medical Science*, 2007.
- [79] J. D. Briers. Laser doppler and time-varying speckle: a reconciliation. *Journal of the Optical Society of America A*, 13:345–350, 1996.
- [80] G. Heinzl, A. Rudiger, and R. Schilling. Spectrum and spectral density estimation by the discrete fourier transform (dft), including a comprehensive list of window functions and some new flat-top windows. report, Albert-Einstein-Institut, February 2002.
- [81] J. Hast. *Self-mixing interferometry and its applications in noninvasive pulse detection*. PhD thesis, Department of Electrical and Information Engineering, University of Oulu, 2003.
- [82] W. Huang, H. Gui, L. Lu, J. Xie, H. Ming, D. He, H. Wang, and T. Zhao. Effect of angle of incidence on self-mixing laser doppler velocimeter and optimization of the system. *Optics Communications*, 281:1662–1667, 2007.

- [83] K. Meigas, H. Hinrikus, R. Kattai, and J. Lass. Self-mixing in a diode laser as a method for cardiovascular diagnostics. *Journal of Biomedical Optics*, 8(1):152–160, 2003.
- [84] W. M. Wang, W. J. O. Boyle, K. T. V. Grattan, and A. W. Palmer. Self-mixing interference in a diode laser: experimental observations and theoretical analysis. *Applied Optics*, 32(9):1551–1558, 2003.
- [85] P. J. de Groot, G. M. Gallatin, and S. H. Macomber. Ranging and velocimetry signal generation in a backscatter-modulated laser diode. *Applied Optics*, 27:4475–4480, 1988.
- [86] K. Petermann. *Laser Diode Modulation and Noise*. Kluwer Academic Publishers, 1991.
- [87] M. K. Koelink, M. Slot, F. F. M. de Mul, J. Greve, R. Graaff, A. C. M. Dassel, and J. G. Aarnoudse. Glass-fibre self-mixing diode-laser doppler velocimeter. *Measurement Science and Technology*, 3:33–37, 1992.
- [88] M. H. Koelink, M. Slot, F. F. M. de Mul, J. Greve, R. Graaff, A. C. M. Dassel, and J. G. Aarnoudse. Laser doppler velocimeter based on the self-mixing effect in a fiber-coupled semiconductor laser: theory. *Applied Optics*, 31:3401–3408, 1992.
- [89] P. J. de Groot and G. M. Gallatin. Backscatter-modulation velocimetry with external-cavity laser diode. *Optics Letters*, 14:165–167, 1989.
- [90] C. P. Favazza, L. A. Cornelius, and L. V. Wang. In vivo functional photoacoustic microscopy of cutaneous microvasculature in human skin. *Journal of Biomedical Optics*, 16(2):026004, 2011.
- [91] N. Metropolis and S. Ulam. The monte carlo method. *Journal of the American Statistical Association*, 44:335–341, 1949.
- [92] E. Figueiras, L. F. Requicha Ferreira, F. F M De Mul, and A. Humeau. *Numerical Simulations - Applications, Examples and Theory*, chapter 7, pages 149–172. Intech, 2011.
- [93] F. F. M. De Mul. *Monte-Carlo simulation of Light transport in Turbid Media*. Kluwer Publishers, third edition, 2004.

- [94] E. Figueiras, R. Campos, R. Oliveira, L. F. Requicha Ferreira, F. de Mul, and A. Humeau-Heurtier. Laser doppler flowmeters prototypes validation using monte carlo simulations. In *5<sup>th</sup> International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies - Biodevices 2012*, pages 24–33, Vilamoura, Portugal, 2012.
- [95] W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 26(12):2166–2185, 1999.
- [96] Optical properties spectra, 2011. <http://omlc.ogi.edu/spectra/index.html>.
- [97] Melanosome absorption coefficient, 2011. <http://omlc.ogi.edu/spectra/melanin/mua.html>.
- [98] J. Mobley, T. Vo-Dinh, and V. V. Tuchin. *Biomedical Photonics Handbook*, chapter 2. CRC Press, 2010.
- [99] C. F. Bohren and D. R. Huffman. *Absorption and scattering of light by small particles*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2007.
- [100] L. Wang and S. L. Jacques. Monte carlo modeling of light transport in multi-layered tissues in standard c. Technical report, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, 1992.
- [101] S. A. Prahl. *Light Transport in Tissue*. PhD thesis, University of Texas at Austin, 1988.
- [102] M. Larsson, H. Nilsson, and T. Stromberg. In vivo determination of local skin optical properties and photon path length by use of spatially resolved diffuse reflectance with applications in laser doppler flowmetry. *Applied Optics*, 24:124–134, 2003.
- [103] M. Hammer, D. Schweitzer, B. Michel, E. Thamm, and A. Kolb. Single scattering by red blood cells. *Applied Optics*, 37(31):7410–7418, 1998.
- [104] A. Roggan, M. Friebel, K. Dorschel, A. Hahn, and G. Muller. Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400-2500 nm. *Applied Optics*, 4(1):36–46, 1999.

- [105] E. Figueiras, R. Campos, R. Oliveira, L. F. Requicha Ferreira, and A. Humeau-Heurtier. A new laser doppler flowmeter prototype for microcirculation skin depth monitoring - in vitro validation and in vivo preliminary results. In *5<sup>th</sup> International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies - Biodevices 2012*, pages 154–159, Vilamoura, Portugal, 2012.
- [106] E. Figueiras, R. Campos, S. Semedo, R. Oliveira, L. F. Requicha Ferreira, and A. Humeau-Heurtier. A new laser doppler flowmeter prototype for depth dependent monitoring of skin microcirculation. *aceite para publicação na Review of Scientific Instruments*.
- [107] E. Goran Salerud and P. Ake Oberg. Single-fibre laser doppler flowmetry - a method for deep tissue perfusion measurements. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 25:329–334, 1987.
- [108] A. K. Murray, A. L. Herrick, and T. A. King. Laser doppler imaging: a developing technique for application in the rheumatic diseases. *Rheumatology*, 43(10):1210–1218, 2004.
- [109] ICNIRP. *International Standard, Safety of lasers products - Part 1: Equipment classification, requirements and user's guide*. ICNIRP, 1.2 edition, 2001.
- [110] O. Larsson. *Digital Implementation of a Laser Doppler Perfusion Monitor*. PhD thesis, Universidade de Linkoping, 2006.
- [111] E. Figueiras, L. F. Requicha Ferreira, and A. Humeau. Phantom validation for depth assessment in laser doppler flowmetry technique. In *EOS Topical Meeting on Diffractive Optics*, page 024193, Koli, Finland, February 2010.
- [112] M. D. Waterworth, B. J. Tarte, A. J. Joblin, T. van Doorn, and H. E. Niesler. Optical transmission properties of homogenized milk used as a phantom material in visible wavelength imaging. *Australasian Physical and Engineering Sciences in Medicine*, 18(1):39–44, 1995.
- [113] S. Wojtkiewicz, A. Liebert, H. Rix, N. Zolek, and R. Maniewski. Laser-doppler spectrum decomposition applied for the estimation of speed distribution of particles moving in a multiple scattering medium. *Physics in Medicine and Biology*, 54:679–697, 2009.

- [114] Q. Li, B. J. Lee, Z. M. Zhang, and D. W. Allen. Light scattering of semitransparent sintered polytetrafluoroethylene films. *Journal of Biomedical Optics*, 13(5):050464, 2008.
- [115] R. Campos. Two new types of laser doppler flowmeters - prototypes validation. Master's thesis, Universidade de Coimbra, 2011.
- [116] C. R. Simpson, M. Kohl, M. Essenpreis, and M. Cope. Near infrared optical properties of ex-vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the monte carlo inversion technique. *Physics in Medicine and Biology*, 43:2465–2478, 1998.
- [117] R. Campos, E. Figueiras, L. F. Requicha Ferreira, and A. Humeau-Heurtier. Spectral analysis of laser doppler flowmetry signals. In *2<sup>nd</sup> Portuguese Meeting in Bioengineering*, Coimbra, Portugal, 2012.
- [118] G. Clough, A. Chipperfield, C. Byrne, F. de Mul, and R. Gush. Evaluation of a new high power, wide separation laser doppler probe: potential measurement of deeper tissue blood flow. *Microvascular Research*, 78:155–161, 2009.
- [119] B. Fagrell. The relationship between macro-and microcirculation clinical aspects. *Acta Pharmacologica Toxicologica*, 58(2):67–72, 1986.
- [120] O. V. Bobyleva and O. S. Glazachev. Microcirculation characteristics in apparently healthy subjects during acute hypoxia and intermitten hypoxic training. *Human Physiology*, 34(6):735–741, 2008.
- [121] T. E. Wilson, R. Zhang, B. D. Levine, and C. G. Crandall. Dynamic autoregulation of the cutaneous circulation: differential control in glabrous vs. non-glabrous skin. *American Journal of Physiology*, 289:H385–H391, 2005.
- [122] K. Lossius, M. Eriksen, and L. Walloe. Fluctuations in blood flow to acral skin in humans: connection with heart rate and blood pressure variability. *Journal of Physiology*, 460:641–655, 1993.
- [123] J. A. Schmidt, P. Borgstrom, G. P. Firestone, W. P. Von, M. Intaglietta, and A. Fronek. Periodic hemodynamics (flow motion) in peripheral arterial occlusive disease. *Journal of Vascular Surgery*, 18:207–215, 1993.

- [124] M. Thoresen and T. Walloe. Skin blood flow in humans as a function of environmental temperature measured by ultrasound. *Acta Physiologica*, 109:333–341, 1980.
- [125] A. C. Burton. The range and variability of the blood flow in the human fingers and the vasomotor regulation of body temperature. *American Journal of Physiology*, 127:437–453, 1939.
- [126] D. I. Abramson and K. H. Katzenstein. Spontaneous volume changes in the extremities. *American Heart Journal*, 21:191–198, 1941.
- [127] J. D. Coffman. Total and nutritional blood flow in the finger. *Clinical Science*, 42:243–250, 1972.
- [128] N. Freeman. The effect of temperature on the rate of blood flow in the normal and in the sympathectomized hand. *American Journal of Physiology*, 113:384–398, 1935.
- [129] C. Freccero, F. Holmlund, S. Bornmyr, J. Castenfors, A. M. Johansson, G. Sundkvist, H. Svensson, and P. Wollmer. Laser doppler perfusion monitoring of skin blood flow at different depths in finger and arm upon local heating. *Microvascular Research*, 66:183–189, 2003.
- [130] J. Dushanova D. Popivanov, A. Mineva. Dynamic characteristics of laser-doppler flux data. *Technology and Health Care*, 7:205–218, 1999.
- [131] P. C. Ivanov, L. A. N. Amaral, A. L. Goldberger, S. Havlin, M. G. Rosenblum, H. E. Stanley, and Z. R. Struzik. From 1/f noise to multifractal cascades in heartbeat dynamics. *Chaos*, 11:641–652, 2001.
- [132] J. P. Cooke and J. M. Marshall. Mechanisms of raynaud’s disease. *Vascular Medicine*, 10(4):293–307, 2005.
- [133] A. L. Herrick. Vascular function in systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*, 12(6):527–533, 2000.
- [134] H. R. Maricq and E. C. LeRoy. Patterns of finger capillary abnormalities in connective tissue disease by ‘wide-field’ microscopy. *Arthritis and Rheumatism*, 16(5):619–628, 1973.

- [135] E. C. LeRoy and T. A. Medsger Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *Journal of Rheumatology*, 28(7):1573–1576, 2001.
- [136] S. M. Pincus. Approximate entropy (apen) as a complexity measure. *Chaos*, 5(7):110–117, 1995.
- [137] D. E. Lake, J. S. Richman, M. P. Griffin, and J. R. Moorman. Sample entropy analysis of neonatal heart rate variability. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 283:R789–R797, 2002.
- [138] J. S. Richman and J. R. Moorman. Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 278:H2039–H2049, 2000.
- [139] H. M. Al-Angari and A. V. Sahakian. Use of sample entropy approach to study heart rate variability in obstructive sleep apnea syndrome. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 54:1900–1904, 2007.
- [140] S. M. Pincus and A. L. Goldberger. Physiological time-series analysis: what does regularity quantify? *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 266:H1643–H1656, 1994.
- [141] J. A. Palazzolo, F. G. Estafanoux, and P. A. Murray. Entropy measures of heart rate variation in conscious dogs. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 274:H1099–H1105, 1998.
- [142] L. J. Groome, D. M. Mooney, S. B. Holland, L. A. Smith, J. L. Atterbury, and P. C. Loizou. Human fetuses have nonlinear cardiac dynamics. *Journal of Applied Physiology*, 87:530–537, 1999.
- [143] A. Wolf, J. B. Swift, H. L. Swinney, and J. A. Vastano. Determining lyapunov exponents from a time series. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 16:285–317, 1985.
- [144] S. M. Pincus. Approximate entropy as a measure of system complexity. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*, volume 88, pages 2297–2301, USA, 1991.
- [145] S. M. Pincus and R. Viscarello. Approximate entropy: a regularity measure for fetal heart rate analysis. *Obstetrics and Gynecology*, 79:249–255, 1992.

- [146] M. Roustit, S. Blaise, C. Millet, and J. L. Cracowski. Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser doppler flowmetry. *Microvascular Research*, 79(2):102–108, 2010.
- [147] C. T. Minson, L. T. Berry, and M. J. Joyner. Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *Journal of Applied Physiology*, 91:1619–1626, 2001.
- [148] F. Liao, D. W. Garrison, and Y. K. Jan. Relationship between nonlinear properties of sacral skin blood flow oscillations and vasodilatory function in people at risk for pressure ulcers. *Microvascular Research*, 80:44–53, 2010.
- [149] J. R. Landis and G. G. Koch. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33:159–174, 1977.
- [150] R. A. Harris, J. Padilla, K. P. Hanlon, L. D. Rink, and J. P. Wallace. Reproducibility of the flow-mediated dilation response to acute exercise in overweight men. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 33:1579–1585, 2007.
- [151] E. Figueiras, R. Oliveira, C. F. Lourenco, R. Campos, R. M. Barbosa, J. Laranjinha, L. F. Requicha Ferreira, F. F. M. de Mul, and A. Humeau-Heurtier. Self-mixing microprobe to monitor microvascular perfusion in rat brain. *submetido para IEEE Transactions on Biomedical Engineering*.
- [152] S. K. Ozdemir, S. Takamiya, S. Ito, S. Shinohara, and H. Yoshida. Self-mixing laser speckle velocimeter for blood flow measurement. *IEEE Transactions on instrumentation and measurement*, 49(5):1029–1035, 2000.
- [153] S. K. Ozdemir, S. Ito, S. Shinohara, H. Yoshida, , and M. Sumi. Correlation-based speckle velocimeter with self-mixing interference in a semiconductor laser diode. *Applied Optics*, 38:6859–6865, 1999.
- [154] S. K. Ozdemir, T. Takasu, S. Shinohara, H. Yoshida, and M. Sumi. Simultaneous measurement of velocity and length of moving surfaces by a speckle velocimeter with two self-mixing laser diodes. *Applied Optics*, 38:1968–1974, 1999.
- [155] M. Slot, M. H. Koelink, F. G. Scholten, F. F. M. de Mul, A. L. Weijers, J. Greve, R. Graaff, A. C. M. Dassel, J. G. Aarnoudse, and F. H. B. Tuijnman. Blood flow

- velocity measurements based on the self-mixing effect in a fibre-coupled semiconductor laser: in vivo and in vitro measurements. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 30(10):441–446, 1992.
- [156] J. R. Tucker, J. L. Baque, Y. L. Lim, A. V. Zvyagin, and A. D. Rakic. Parallel self-mixing imaging system based on an array of vertical-cavity surface-emitting lasers. *Applied Optics*, 46:6237–6246, 2007.
- [157] S. Shinohara, N. Yonezu, H. Ikeda, and M. Sumi H. Yoshida and. Coherence dependence of fiber-optic laser doppler velocimeter output using self-mixing laser diode. In *IEEE - Instrumentation and Measurement Technology Conference*, pages 420–425, Irvine, CA, USA, 1993.
- [158] L. M. Hamberg, G. J. Hunter, D. Kierstead, E. H. Lo, R. G. Gonzalez, and G. I. Wolf. Measurement of cerebral blood volume with subtraction three-dimensional functional ct. *American Journal of Neuroradiology*, 17(10):1861–1869, 1996.
- [159] M. Jonasz. Water structure and science, September 2011. <http://www.tpdsci.com/Tpc/AbsCf0fWaterQuerry1991.txt>.
- [160] A. G. Pinder, E. Pittaway, K. Morris, and P. E. James. Nitrite directly vasodilates hypoxic vasculature via nitric oxide-dependent and -independent pathways. *British Journal of Pharmacology*, 157:1523–1530, 2009.
- [161] S. K. Ozdemir, I. Ohno, and S. Shinohara. Assessment on self-mixing laser interferometry for blood flow measurement over skin surface. In *IEEE - Instrumentation and Measurement Technology Conference*, pages 27–31, Sorrento (Italy), 2006.
- [162] M. Larsson and T. Stromberg. Towards a velocity resolved microvascular blood flow measure by decomposition of the laser doppler spectrum. *Journal of Biomedical Optics*, 11:14024, 2006.
- [163] I. Fredriksson, M. Larsson, and T. Stromberg. Absolute flow velocity components in laser doppler flowmetry. In *Proceedings of SPIE - Optical Diagnostics and Sensing VI*, volume 6094, pages 48–59, 2006.
- [164] I. Fredriksson. *Quantitative laser Doppler flowmetry*. PhD thesis, Department of Biomedical Engineering, Linköping University, 2009.

- [165] I. Fredriksson, M. Larsson, F. H. Nystrom, T. Lanne, C. J. Ostgren, and T. Stromberg. Reduced arterio-venous shunting capacity after local heating and redistribution of baseline skin blood flow in type 2 diabetes assessed with velocity-resolved quantitative laser doppler flowmetry. *Diabetes*, 59(7):1578–1584, 2010.