



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Programa de Pós-Graduação em Física

Erica Muniz de Miranda

Desenvolvimento de um sistema de geração de imagens fotoacústicas

Recife
2020

Erica Muniz de Miranda

Desenvolvimento de um sistema de geração de imagens fotoacústicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestra em Física.

Área de concentração: Óptica

Orientador: Anderson Stevens Leônidas Gomes.

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2105

M672d Miranda, Erica Muniz de
Desenvolvimento de um sistema de geração de imagens fotoacústicas / Erica
Muniz de Miranda. – 2020.
84f.: il., fig., tab.

Orientador: Anderson Stevens Leônidas Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Física,
Recife, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Óptica. 2. Efeito fotoacústico. 3. Método de geração de imagens fotoacústicos.
4. Odontologia. I. Gomes, Anderson Stevens Leônidas. (orientador) II. Título.

535.2

CDD (22. ed.)

UFPE-CCEN 2020-201

Erica Muniz de Miranda

Desenvolvimento de um sistema de geração de imagens fotoacústicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestra em Física.

Dissertação aprovada. Recife, 23 de outubro de 2020:

Anderson Stevens Leônidas Gomes.
Anderson Stevens Leônidas Gomes
(DF-UFPE)

Sandra Sampaio Vianna
(DF-UFPE)

Denise Maria Zezell
(IPEN)

Recife
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a Avishek Das por todo o empenho no desenvolvimento do sistema de imagens fotoacústicas, sem o seu apoio este trabalho certamente não existiria. Também agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desta dissertação, e gostaria de destacar alguns nomes: Solange Muniz, Bruna Miranda, Bran Miranda, Meg Miranda, Bento Montenegro, Rejane Ferreira, Cássia Corso, Anderson Gomes, Manoel Leonardo, Álvaro Guimarães, Telma Muniz, Tânia Muniz, Vânda Muniz, Vânia Muniz, Jerônimo Miranda, César Fernández, Diego Cirne, Mariana Lima e José Edvaldo.

RESUMO

A incidência de radiação eletromagnética pulsada ou modulada em uma amostra absorciva pode levar à geração de ondas acústicas. Este fenômeno, bem conhecido por efeito fotoacústico, tem sido utilizado no estudo da absorção óptica de materiais. Os métodos de geração de imagens fotoacústicas (PAI, do inglês *PhotoAcoustic Imaging*) são técnicas que mapeiam amostras com base nos sinais fotoacústicos gerados por suas diferentes regiões. Nas últimas décadas, as aplicações da PAI nas ciências médicas e biológicas foram muito exploradas e apresentaram resultados promissores, principalmente no diagnóstico. A PAI apresenta as principais vantagens das modalidades de imagens ultrassônicas e ópticas, uma vez que tem alta sensibilidade, alto contraste e é capaz de detectar regiões internas dos tecidos biológicos. Empregando dispositivos relativamente simples, as modalidades PAI são capazes de fornecer informações anatômicas e fisiológicas de organismos. Neste trabalho foi desenvolvido em laboratório um sistema PAI, utilizando como fonte de radiação o laser Nd:YAG (pulsado, 10 Hz, 5 ns) e, como detector de ondas acústicas, um transdutor ultrassônico piezoelétrico. O aparato completamente automatizado escaneia uma região bidimensional em torno da amostra, coletando os sinais fotoacústicos gerados em diversas localizações, e produz mapas de contorno. O sistema apresenta alta sensibilidade na detecção da absorção óptica, permite a geração de imagens no visível e IR, e foi caracterizado em 532 nm e 1064 nm, alcançando resolução espacial de 0,4 mm. A imagem fotoacústica de dentes em diferentes estados de saúde foi obtida com o sistema PAI, a fim de se analisar a viabilidade da aplicação da técnica no diagnóstico odontológico. O foco foi dado para a detecção de cáries incipientes, pois ainda não existe um método objetivo bem estabelecido para este diagnóstico, e, quando detectada precocemente, a cárie pode ser tratada de maneira menos invasiva e com menos destruição dos tecidos dentários.

Palavras-chave: Efeito fotoacústico. Método de geração de imagens fotoacústicas. Odontologia. Cárie incipiente.

ABSTRACT

The incidence of pulsed or modulated electromagnetic radiation in a absorptive sample can lead to the generation of acoustic waves. This phenomenon, well known as photoacoustic effect, has been utilised in studying optical absorption in materials. The photoacoustic images, PAI (lit. PhotoAcoustic Imaging), are techniques that map samples based on the photoacoustic signals generated by their different regions. In recent decades, the applications of PAI in medical and biological sciences were widely explored and have presented promising results since then, especially in diagnosis. The PAI shows great advantages in modalities of optic and ultrasonic images, since it has great sensibility, high contrast and is capable of detecting inner regions of biological tissues. By using relatively simple devices, the PAI modalities are capable of providing anatomical and physiological information of organisms. In the present work, a PAI system was developed in the laboratory by utilizing as radiation source the Nd:YAG laser (pulsed, 10 Hz, 5 ns) and, as photoacoustic waves detector, an ultrasonic piezoelectric transducer. The completely automatized apparatus scans a bidimensional region at the sample, collecting photoacoustic signals generated in various localities and producing contour maps. The system has high sensitivity for detecting optical absorption, can imaging in visible and IR, and was characterized at 532 nm and 1064 nm, with 0,4 mm spatial resolution. The photoacoustic image of teeth in different health states was obtained with the PAI system with the aim of analysing the viability of the application of the technique in dentistry diagnosis. Special attention was paid to the detection of incipient caries, because currently there is no well established method to this kind of diagnosis and, the sooner the caries are detected, the higher the possibility of treating them in a less incisive way (that is, with less damage to dental tissue).

Keywords: Photoacoustic effect. Photoacoustic Imaging. Odontology. Incipient Caries.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da geração de ondas fotoacústicas.	15
Figura 2 – Sítios de absorção.	19
Figura 3 – Espectros de absorção de agentes de contraste endógenos.	26
Figura 4 – Espectro fotoacústico de 10 tipos de solos distintos.	33
Figura 5 – Concentração de etileno x tempo.	34
Figura 6 – Esquema sistema PAI.	35
Figura 7 – OR-PAM de Fibroblastos.	40
Figura 8 – AR-PAM de Melanoma.	41
Figura 9 – PAT de corpo inteiro de rato de 3 ângulos distintos.	42
Figura 10 – PAT de palma da mão.	43
Figura 11 – Diagrama do Sistema de Imagem Fotoacústica.	44
Figura 12 – Interface do programa.	46
Figura 13 – Suporte eppendorf.	47
Figura 14 – Sinais fotoacústicos gerados por soluções de Rh 6G a diferentes concentrações.	49
Figura 15 – Espectros de absorção óptica de soluções Rh 6G a diferentes concentrações.	51
Figura 16 – Concentração x Distância vale-pico do sinal fotoacústico.	52
Figura 17 – Concentração x Absorbância máxima.	52
Figura 18 – Sinais fotoacústicos gerados por soluções de Rh 6G a diferentes concentrações - baixíssimas concentrações.	53
Figura 19 – Concentração x Distância vale-pico do sinal fotoacústico - baixíssimas concentrações.	54
Figura 20 – Amostra construída com tubo de caneta para teste de mapeamento.	55
Figura 21 – Resultado do teste de mapeamento fotoacústico com tubo de caneta.	55
Figura 22 – Estágios da cárie.	57
Figura 23 – Imagens Fotoacústicas de dentes em diferentes estados de saúde.	60
Figura 24 – Intensidade do sinal fotoacústico x Posição do detector.	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	EFEITO FOTOACÚSTICO: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES	14
2.1	EFEITO FOTOACÚSTICO	14
2.1.1	Considerações gerais	14
2.1.2	Abordagem Matemática	18
2.1.2.1	<i>Confinamento térmico e confinamento de tensão</i>	18
2.1.2.2	<i>Variação de pressão inicial</i>	20
2.1.2.3	<i>Equação geral da fotoacústica: geração e propagação da onda acústica</i>	21
2.1.2.4	<i>Resolução da equação de onda fotoacústica em uma região homogênea termicamente e acusticamente</i>	23
2.2	APLICAÇÕES	24
2.2.1	Espectroscopia fotoacústica	26
2.2.1.1	<i>Técnicas espectrométricas</i>	26
2.2.1.2	<i>Definições e aspectos gerais</i>	27
2.2.1.3	<i>Instrumentação</i>	28
2.2.1.3.1	Fontes de radiação eletromagnética	28
2.2.1.3.2	Célula fotoacústica	30
2.2.1.3.3	Detectores acústicos	30
2.2.1.3.4	Dispositivos eletrônicos para controle e automação de medidas	31
2.2.1.4	<i>Aplicações da PAS</i>	31
2.2.2	Métodos de geração de imagens fotoacústicos	33
2.2.2.1	<i>Considerações gerais</i>	33
2.2.2.2	<i>Instrumentação</i>	37
2.2.2.3	<i>Microscopia Fotoacústica</i>	38
2.2.2.4	<i>Tomografia Fotoacústica</i>	40
3	DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE IMAGENS FOTOACÚSTICAS	44
3.1	DESCRIÇÃO DO APARATO EXPERIMENTAL	44
3.2	SOFTWARE PARA AUTOMAÇÃO DO ESCANEAMENTO E GERAÇÃO DA IMAGEM FOTOACÚSTICA	45
3.3	TESTES PARA AVALIAÇÃO DO SISTEMA	46
3.3.1	Testes com Rodamina 6G: avaliação da resposta do sistema a coeficientes de absorção óptica distintos	46
3.3.1.1	<i>Altas concentrações</i>	46

3.3.1.1.1	Materiais e métodos	46
3.3.1.1.2	Resultados	49
3.3.1.2	<i>Baixas concentrações</i>	50
3.3.1.2.1	Materiais e métodos	50
3.3.1.2.2	Resultados	52
3.3.2	Testes com tubo de caneta: avaliação da capacidade de mapeamento do sistema	54
3.3.2.1	<i>Materiais e métodos</i>	54
3.3.2.2	<i>Resultados</i>	55
4	APLICAÇÃO EM ODONTOLOGIA: SISTEMA PAI NA DETECÇÃO DE CÁRIE INCIPIENTE	56
4.1	CÁRIE INCIPIENTE	56
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.2.1	Obtenção, classificação e manipulação das amostras	58
4.2.2	Realização dos experimentos	58
4.3	RESULTADOS	59
4.3.1	Imagens Fotoacústicas	59
4.3.2	Avaliação da propagação da onda PA no tecido dentário	60
5	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO	71
	ANEXO B – E-MAILS DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	83

1 INTRODUÇÃO

Quando um material é iluminado por radiação eletromagnética (EM) não estacionária (pulsada ou modulada), e, em decorrência disto, emite ondas acústicas (ondas sonoras ou ultrassônicas), diz-se que ocorreu o efeito fotoacústico (PA do inglês *PhotoAcoustic*). Tal fenômeno pode ser dividido nos seguintes processos: absorção óptica, relaxamento não radiativo, aquecimento localizado, geração e emissão de ondas acústicas [1]. Com base nestes eventos, é possível inferir diversas propriedades físico-químicas de amostras a partir da análise do sinal fotoacústico gerado quando as mesmas são submetidas a radiação EM de características bem conhecidas.

Propriedades mecânicas e térmicas de materiais têm sido bastante estudadas empregando o efeito PA, como pode ser exemplificado pelas referências [2] e [3], respectivamente. Entretanto, é a análise da capacidade de absorção óptica das amostras, através do fenômeno, que fundamenta as aplicações do efeito PA que serão abordadas neste trabalho, são elas: espectroscopia fotoacústica e os métodos de geração de imagens fotoacústicas. A absorção óptica está intimamente associada à composição química do absorvedor, e desta decorrem grande parte das propriedades do mesmo.

Apesar de ser descrito como fenômeno em 1880 [4], o efeito PA passou a ser aplicado e investigado de forma mais aprofundada apenas após o surgimento dos primeiros lasers, na década de 60. As fontes capazes de emitir radiações EM de alta pureza espectral e com altíssimas potências possibilitou o estudo de uma grande diversidade de materiais. Os avanços tecnológico que culminaram em melhorias nos detectores de sinais acústicos, tais como microfones e dispositivos piezoelétricos, também tiveram um papel fundamental no desenvolvimento das técnicas fotoacústicas. Os artigos mais antigos que aplicaram o efeito PA o utilizaram para a análise química, e deram origem ao que se conhece hoje por espectroscopia fotoacústica (PAS, do inglês *PhotoAcoustic Spectroscopy*). Apenas na década de 90, após a popularização dos computadores, foram publicados os primeiros trabalhos [5, 6] que realizaram o mapeamento da amplitude das ondas fotoacústicas, surgiram, então, as modalidades de geração de imagens fotoacústica (PAI, do inglês *PhotoAcoustic Imaging*) [7].

O vasto e crescente número trabalhos que desenvolveram sistemas PAS, e o aplicaram nas mais diversas áreas, é justificado quando se compara a técnica às espectrometrias ópticas tradicionais. Na PAS, se obtém a absorbância óptica pela medida direta de uma grandeza proporcional à absorção (a amplitude do sinal PA). Os métodos tradicionais, por outro lado, calculam a absorbância a partir da medida da potência luminosa que atravessou a amostra. Tal característica torna a PAS apta a analisar materiais altamente espalhadores de forma simples, enquanto os métodos mais conhecidos necessitam de aparatos de medição

ou softwares computacionais complexos para realizar o mesmo [8]. A medição direta da absorção óptica também viabiliza a investigação de materiais altamente absorvedores (opacos) pela PAS, o que não é possível de ser realizado pelos métodos espectrométricos usuais. A alta sensibilidade da técnica é mais um fator que amplia e diversifica os tipos de amostra analisáveis pela PAS, uma vez que permite a avaliação de materiais altamente transparentes [9].

Outra relevante característica da PAS é a alta seletividade, decorrente do uso de fontes de radiação que emitem em comprimentos de onda bem definidos, isso confere ao método uma altíssima capacidade de diferenciar componentes. A simplicidade na operação dos sistemas PAS e a não necessidade de preparação das amostras, na maioria dos casos, também são vantagens destacáveis da técnica [10]. Evidentemente, a aplicação mais direta e o fundamento das demais aplicações da PAS é a análise química. São destacáveis inúmeras aplicações da PAS com grande êxito nas avaliações ambientais [11, 9], nas ciências biológicas [12] e em diagnósticos médicos [13]. Atualmente existem diversos sistemas PAS portáteis e robustos o suficiente para a realização de medidas *in locu* e em tempo real que ampliam ainda mais as possibilidades de aplicações da técnica.

As modalidades de geração de imagens fotoacústicas desfrutam dos principais benefícios das técnicas de imagem puramente ópticas e ultrassônicas, e não apresenta as mais notáveis desvantagens de cada uma das modalidades [14]. Por utilizar a diferenciabilidade da absorção óptica para geração de imagens, a PAI tem como característica o alto contraste. Outra qualidade notável do método é a capacidade de avaliar regiões profundas das amostras, mesmo quando os materiais em estudo são espalhadores de luz. Esta última propriedade é típica dos sistemas ultrassônicos e não ocorre nas modalidades puramente ópticas.

As principais aplicações da PAI são nas áreas biológicas e médicas, especialmente no diagnóstico. Entre as demais modalidades de diagnóstico, a PAI se destaca por ser capaz de obter informações de regiões internas dos tecidos biológicos de forma não invasiva e sem utilizar radiação ionizante. A PAI fornece informações anatômicas, funcionais, metabólica e moleculares de alta resolução dos organismos. Os aparatos utilizados em um sistema PAS também são mais simples e econômicos se comparados a modalidades diagnóstico por imagens de alto contraste usuais, tais como a ressonância magnética nuclear, a tomografia por emissão de pósitrons e a tomografia computadorizada [15, 12].

A resolução, a capacidade de penetração, a velocidade de escaneamento e a dimensão das imagens geradas pelos sistemas PAI podem ser modificadas alterando os componentes do sistema. Essa versatilidade permitiu o desenvolvimento de diferentes modalidades PAI para propósitos diversos. Entre as técnicas PAI destacam-se a microscopia fotoacústica (PAM, do inglês *PhotoAcoustic Microscopy*) e a tomografia fotoacústica (PAT, do inglês *PhotoAcoustic Tomography*). Como o nome sugere, a microscopia fotoacústica tem alta

resolução e é indicada na análise de pequenas estruturas, tais como células e organelas. A PAT, por sua vez, é aplicada no mapeamento de tecidos e órgãos [16].

Nas últimas duas décadas, os métodos PAI foram bastante desenvolvidos e revelaram excelentes resultados nas análises de tecidos moles, entretanto poucas estudos foram realizadas com tecidos duros. A quantidade de trabalhos é ainda mais reduzida se a área de interesse é restringida a odontologia. Apesar disso, podemos destacar os artigos de Cheng et al. [17], Kim et al. [18], Koyama et al. [19], Hughes et al. [20] e Li et al. [21] que aplicaram a fotoacústica no diagnóstico da cárie e obtiveram resultados promissores.

Uma pauta que tem despertado grande interesse dos pesquisadores da área de odontologia é o diagnóstico de cáries incipientes. Diz-se que um dente apresenta cárie incipiente quando observa-se degradação no tecido dentário mais externo (esmalte) mas ainda não há cavitação, ou seja, a dentina ainda não foi deteriorada. Neste estágio, é possível reverter a situação sem a necessidade da restauração, procedimento invasivo, com desgaste dentário e muitas vezes bastante doloroso. O único sintoma da cárie incipiente é a aparição de manchas brancas no dente, de forma que é extremamente difícil se diagnosticar a doença ainda nesta etapa do processo cariogênico. Em geral, as manchas brancas são detectadas apenas pela inspeção visual de profissionais altamente experientes, além disso, a depender da região dentária desgastada, nem mesmo estes profissionais são capazes de observá-las. Diante disso, fica evidente a importância do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de cárie incipiente mais objetivos e abrangente. Nos últimos anos foram realizados testes com diversas técnicas avançadas, tais como: as radiografias digitais, a transiluminação por fibra óptica e a tomografia por coerência óptica; e, apesar dos resultados promissores, ainda não há um método objetivo bem estabelecido para a detecção de cáries incipientes clinicamente.

Para o presente trabalho, foi desenvolvido um sistema PAI capaz mapear a absorção óptica nas superfícies das amostras. O aparato é completamente automatizado, e, após o escaneamento superficial, gera imagens fotoacústicas bidimensionais. Este dispositivo PAI foi utilizado para avaliar a viabilidade do diagnóstico de cáries incipientes com as técnicas fotoacústicas.

Esta dissertação é dividida em 5 capítulos:

No capítulo 2 é apresentada uma revisão de literatura da teoria que descreve o efeito PA e de suas principais aplicações. A seção 2.1 discute o fenômeno e desenvolve o formalismo matemático que descreve a geração de ondas fotoacústicas por amostras sólidas e líquidas. A seção 2.2 trata das aplicações, a PAS e PAI são destacadas e exploradas com maiores detalhes.

No capítulo 3 é realizada uma descrição do sistema PAI desenvolvido em laboratório. Também são discutidos alguns testes realizados para avaliar as capacidades do sistema.

Ainda neste capítulo, os resultados dos testes são expostos e comentados.

O capítulo 4 trata das imagens fotoacústicas de dentes em diferentes estágios de saúde obtidas com o sistema descrito no capítulo anterior. O objetivo destes experimentos é avaliar a capacidade das técnicas fotoacústicas no diagnóstico de cáries, com destaque para as cáries incipientes.

Por fim, no capítulo 5, são apresentadas as conclusões e perspectivas de trabalhos futuros.

2 EFEITO FOTOACÚSTICO: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

Este capítulo contempla toda a revisão de literatura de interesse ao presente trabalho. A seção 2.1 apresenta a teoria que descreve o efeito fotoacústico, enquanto que a 2.2 discute importantes aplicações do fenômeno. A espectroscopia fotoacústica é tratada em 2.2.1 e a geração de imagens fotoacústicas é explorada em 2.2.2. A seção 2.2.2 comenta especialmente as técnicas fotoacústicas de imagem microscópicas e tomográficas nas seções 2.2.2.1 e 2.2.2.2, respectivamente.

2.1 EFEITO FOTOACÚSTICO

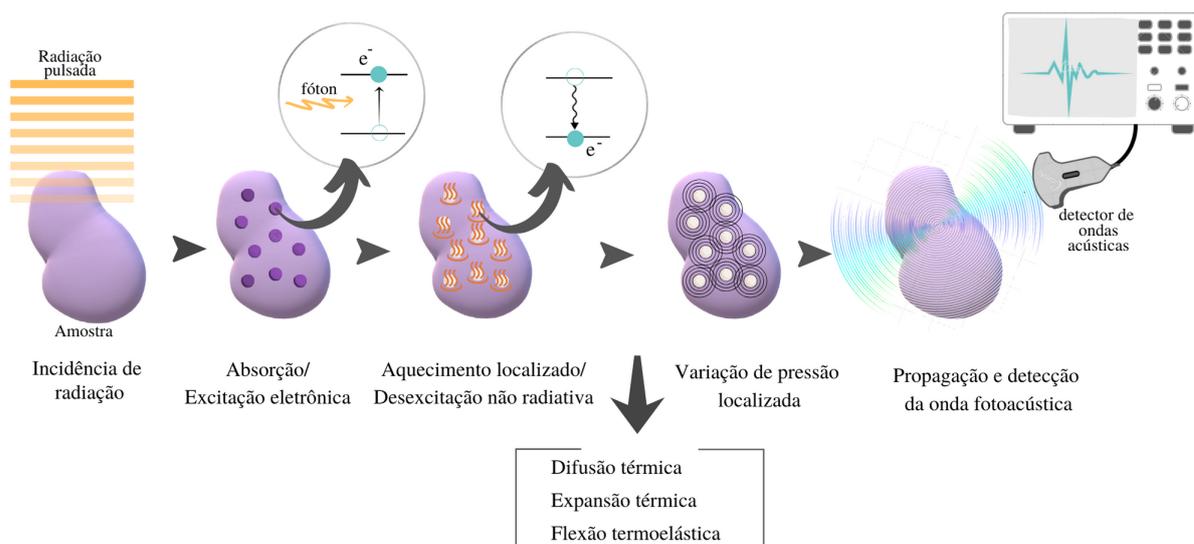
A teoria do efeito fotoacústico será abordada nesta seção. A subseção 2.1.1 define o fenômeno, discute amplamente suas etapas e fornece uma breve visão histórica do desenvolvimento de trabalhos que o investigaram. Em 2.1.2 é explorada a descrição matemática da geração e propagação de pulsos fotoacústicos originados por sólidos e líquidos que absorveram pulsos curtos de laser (da ordem de nanosegundos).

2.1.1 Considerações gerais

O efeito fotoacústico (PA, do inglês *PhotoAcoustic*), também chamado de opticoacústico, consiste fundamentalmente na geração de ondas acústicas por um material, em decorrência da absorção de radiação eletromagnética (EM) modulada ou pulsada [14]. Quando o pulso eletromagnético é absorvido pela amostra, elétrons da mesma são excitados eletronicamente e vibracionalmente e desexcitados em tempos da ordem de nanosegundos. Se o decaimento eletrônico ocorre sem emissão de radiação, ou seja, o elétron passa para um nível eletrônico menos energético e um nível vibracional mais energético, mantendo sua energia constante [22], há um aquecimento localizado das regiões absorvedoras irradiadas da amostra. Tais aquecimentos culminam em variações de pressão localizadas que se sobrepõem e dão origem aos pulsos acústicos [23, 24]. Com vários pulsos eletromagnéticos atingindo o material periodicamente, o processo descrito acima se repete e ondas PAs são originadas e propagadas. A figura 1 ilustra esquematicamente a geração de ondas PAs.

Apesar de ter sido descoberto em 1880 por Bell, somente várias décadas depois o efeito PA pôde ser amplamente explorado, pois no início não haviam tecnologias que permitissem investigações mais profundas com análises quantitativas. Encontram-se na literatura alguns trabalhos que estudaram o efeito em gases a partir da realização de experimentos e desenvolvimento de fundamentações teóricas no período de 1930 a 1960, tais como os artigos de Veingerov em 1946 [25], Luft em 1943 [26] e Cottrell em 1950 [27]. Na década de 60, o surgimento de lasers (fontes de radiação EM que apresentam alta pureza

Figura 1 – Esquema da geração de ondas fotoacústicas.



Fonte: Elaborada pela autora.

espectral, alta estabilidade, alta potência e que propiciam a reprodutibilidade em diversos laboratórios) proporcionou a exploração aprofundada do efeito fotoacústico. Nas décadas subsequentes, foram publicados numerosos artigos que elaboraram experimentos com a fotoacústica em sólidos, líquidos e gases, trataram do fenômeno analiticamente e propuseram diferentes aplicações para o efeito, como pode ser exemplificado pelas referências [28, 29, 30]. A aparição de modelos de detectores ultrassônicos com alta sensibilidade no mercado, tais como microfones condensadores e transdutores piezoelétricos, também contribuiu para a melhor compreensão do fenômeno [7, 24]. Atualmente, os modelos teóricos e computacionais que são a base para a descrição do efeito PA estão bem estabelecidos. Além disso, observa-se um notável interesse de pesquisadores no desenvolvimento de equipamentos fotoacústicos sofisticados, tais como sensores de temperatura, espectrômetros, microscópios e tomógrafos fotoacústicos. Aplicações destes dispositivos nas mais variadas áreas do conhecimento também tem sido amplamente exploradas e revelado resultados promissores. [7, 12, 16, 31].

As observações físicas e os modelos matemáticos desenvolvidos para a descrição da geração de ondas fotoacústicas concordam a respeito das etapas de transformação de energia EM em energia térmica e divergem com relação ao modo como os aquecimentos periódicos locais dão origem às ondas PA. Além das divergências intrínsecas ao fato de que autores diferentes abordaram o problema isoladamente, observa-se também na literatura que para descreverem esta última etapa do processo, teorias distintas foram necessárias quando materiais diferentes foram avaliados, ou sistemas diferentes foram utilizados para estudar uma amostra. Ou seja, ainda que pulsos eletromagnéticos originem ondas acústicas em todos os casos analisados, as interpretações físicas e conseqüentemente as teorias matemáticas que descrevem a transformação do aquecimento em ondas de pressão

dependem do aparato utilizado e da amostra avaliada. A geração de ondas acústicas a partir dos aquecimentos periódicos locais comumente se dá pelos seguintes fenômenos: difusão térmica, flexão termoelástica e expansão térmica [7, 32, 33, 34].

A descrição da geração de ondas fotoacústicas a partir da difusão térmica considera que a interação da radiação EM modulada com uma amostra sólida gera aquecimentos periódicos que se difundem pela amostra até chegarem a sua superfície, que faz fronteira com um fluido circundante (em geral ar ou água). Como a difusão é um fenômeno de transporte altamente dissipativo, apenas uma fina camada do fluido é aquecida e expandida periodicamente. Esta passa a funcionar como um pistão oscilatório que comprime e expande o restante do fluido, motivo que pelo qual o modelo é chamado de “pistão térmico”, produzindo no mesmo ondas acústicas [34]. O modelo do pistão térmico foi proposto em 1975 por Resencwaig e Gersho (RG) e sua abordagem matemática detalhada pode ser encontrada na referência [28].

A fim de obter melhores interpretações do sinal fotoacústico e investigar mais profundamente a relação deste com a absorção óptica de amostras sólidas e líquidas, McDonald e Wetsel desenvolveram em 1978 uma teoria que incluía a vibração da amostra decorrente da expansão térmica periódica de toda sua extensão como efeito gerador das ondas fotoacústicas. Para tal, eles resolveram equações diferenciais de pressão e temperatura acopladas para um sistema onde a amostra ficava dentro de uma célula preenchida com gás, tornando o modelo do pistão térmico mais completo. Os autores observaram que uma analogia entre o efeito que a amostra causava no gás em seu entorno e o efeito de um pistão vibratório, então batizaram o seu modelo de “pistão composto” [34]. A teoria completa está contida na referência [29].

O efeito da flexão termoelástica ocorre quando os aquecimentos ocasionados pela radiação EM modulada produzem na amostra um gradiente de temperatura, perpendicular ao plano que contém suas duas maiores dimensões, responsável pela formação ondas de pressão dentro da amostra que se propagam para o fluido circundante onde são detectadas. A flexão termoelástica pode ser entendida como uma parte do “pistão vibratório” que não foi considerada por McDonald e Wetsel, visto que também é ocasionada por expansões da amostra. No caso da primeira, a expansão é localizada em pontos da amostra, enquanto que na segunda o corpo expande-se por inteiro. A teoria foi publicada por Rousset e colaboradores em 1983 [30], anos após as da difusão térmica e expansão térmica. Assim, o autor pôde considerar os três casos em seu artigo e obter uma abordagem teórica mais completa e abrangente da geração das ondas acústicas.

Considera-se que em geral os três fenômenos ocorrem simultaneamente na transformação do aquecimento periódico em ondas fotoacústicas, mas alguns efeitos podem se tornar predominantes e/ou desprezíveis, a depender das seguintes características do sistema experimental: coeficiente de absorção óptica da amostra, taxa de repetição e duração do

pulso eletromagnético. Em materiais pouco absorvedores, ou seja, transparentes, a radiação atinge todas as regiões da amostra com intensidade semelhante, levando a um aquecimento uniforme e expansões totais periódicas são mais propícias a ocorrerem. Considerando um dado material, se forem utilizadas radiações com baixas frequências de modulação e pulsos mais longos, o efeito da difusão térmica predomina em detrimento dos demais. Em oposição, as altas frequências de modulação e os pulsos curtos minimizam o efeito da difusão térmica de modo que expansão térmica e flexão termoelástica se sobressaem. Quando a difusão térmica em uma dada amostra pode ser negligenciada devido a frequência de modulação e duração do pulso utilizado, diz-se que o sistema está em regime de confinamento térmico. Muitos materiais respondem neste regime quando são irradiados por lasers de nanosegundos. Baseados nisto, pesquisadores desenvolveram um modelo teórico para a geração de ondas fotoacústicas onde o desprezo do termos associados a difusão térmica levou a simplificações matemáticas consideráveis. Este será apresentado em detalhes na próxima seção [7, 32, 33].

As radiações EM moduladas podem ser classificadas em dois grupos com base na diferença entre os tempos de iluminação e escuridão: se os períodos de iluminação são muito curtos, comparados aos de escuridão, elas são ditas pulsadas, e caso sejam caracterizadas por intervalos de tempo de iluminação e escuridão iguais e formas de ondas quadradas ou senoidais, as radiações não apresentam uma denominação específica, e são em geral chamadas simplesmente de radiações moduladas. As fontes de radiação pulsada mais empregadas para geração de ondas fotoacústica são os lasers pulsados de nanosegundos, capazes de emitir pulsos com duração da ordem de 10^{-9} s com frequências da ordem de dezenas de Hz. Por outro lado, para se obter a radiação modulada a ser utilizada na fotoacústica são comumente utilizados lasers contínuos interrompidos mecanicamente e lâmpadas moduladas. Uma diferença notável entre as ondas acústicas geradas por radiação pulsada e modulada é que as primeiras apresentam uma banda larga de frequências enquanto que as segundas têm uma frequência bem definida: a mesma frequência de modulação da radiação EM [15].

Os modos de detecção da onda fotoacústica podem ser direto, quando o detector é justaposto à amostra ou indireto, quando há um fluido entre a amostra e o detector pelo qual a onda acústica se propaga. Apesar de também ser utilizada na análise de líquidos e sólidos, a detecção direta é mais empregada no estudo de materiais gasosos, para os quais foram desenvolvidas as células fotoacústicas com ressonância: câmaras com tamanho equivalente a n comprimentos de onda capazes de amplificar os sinais fotoacústicos nela gerados devido à ressonância. As células fotoacústicas também são aplicadas na avaliação de sólidos ou líquidos com detecção indireta, porém a diferença de impedância acústica entre o gás que preenche a célula e as amostras causa distorções e diminuição da intensidade do sinal detectado. Com o desenvolvimento dos detectores de imersão foi possível realizar experimentos de fotoacústica com a amostra (líquida ou sólida) e o detector submersos em

líquidos, em geral a água, o que melhorou significativamente a qualidade do sinal detectado devido a um melhor acoplamento acústico entre líquidos e sólidos ou outros líquidos [35].

2.1.2 Abordagem Matemática

Nesta seção será exposta a teoria matemática de interesse ao presente trabalho, isto é, equações que descrevem o efeito fotoacústico em sólidos e líquidos opacos devido a incidência de pulsos curtos de laser (da ordem de nanosegundos) serão discutidas, com maior foco na obtenção de propriedades ópticas e no estudo de materiais biológicos. Tais equações são utilizadas como fundamentos no desenvolvimento de softwares de equipamentos de espectroscopia e geração de imagens fotoacústicas. Toda a teoria abordada aqui considera apenas o fenômeno da flexão termoelástica como gerador da onda fotoacústica, a difusão e a expansão térmica serão justificadamente desprezadas nos estudos.

A seção 2.1.2.1 discute os regimes e condições nos quais as equações que aparecerão nas seções subsequentes podem ser utilizadas. A 2.1.2.2 visa ilustrar o fenômeno fotoacústico matematicamente. Ela mostra de forma simplificada como a partir dos pulsos fotoacústicos se obtém diversas propriedades do material que o gerou, chegando de maneira trivial e intuitiva a uma relação entre a variação de pressão inicial (imediatamente após a absorção óptica) e as grandezas térmicas, mecânicas e ópticas da amostra. As seções 2.1.2.3 e 2.1.2.4 apresentam uma abordagem matemática mais rigorosa e expõem as equações comumente utilizadas nos softwares dos espectroscópios e nos programas de reconstrução de imagens fotoacústicas. Em 2.1.2.3 se chega a partir de equações fundamentais da Física à equação diferencial que descreve a geração e propagação da onda fotoacústica (a equação geral da fotoacústica), enquanto que em 2.1.2.4 a solução na forma integral desta equação para o caso de um material homogêneo e um pulso com duração temporal descrita por uma delta de Dirac é obtida.

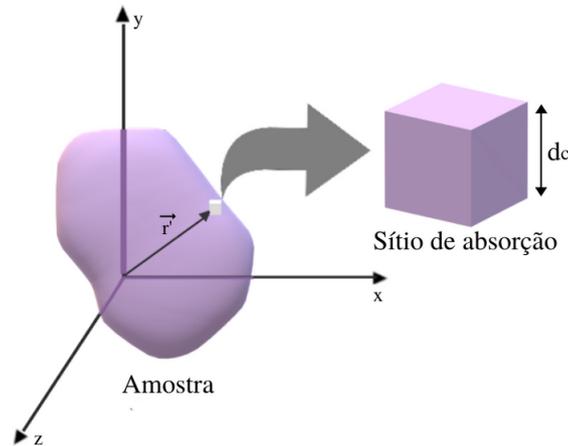
2.1.2.1 Confinamento térmico e confinamento de tensão

No contexto da abordagem matemática dos sinais fotoacústicos gerados por uma dada amostra duas grandezas temporais características do sistema são de suma importância: o tempo de relaxação térmica, também denominado de tempo de difusão térmica, τ_{th} , e o tempo de relaxação de tensão, τ_s [15].

Para compreender estes tempos imagina-se que a amostra é dividida em pequenos cubos iguais com lados medindo d_c aqui denominados de sítios de absorção (figura 2). O tamanho dos sítios de absorção está intimamente relacionado à capacidade de diferenciabilidade do sistema fotoacústico empregado na análise da amostra. Pode-se distinguir as características ópticas, térmicas e acústicas de dois sítios mas não de dois pontos que pertençam a um mesmo sítio, ou seja, cada cubinho tem propriedades correspondentes. Se tratando da geração de imagens a partir dos sinais fotoacústicos, os sítios representam os

voxels da imagem que será construída e seus tamanhos podem ser ajustados modificando parâmetros do aparato utilizado a fim de se obter a resolução desejada para a imagem [15, 14, 24, 7].

Figura 2 – Sítios de absorção.



Fonte: Elaborada pela autora.

O tempo de relaxação térmica é definido por:

$$\tau_{th} = \frac{d_c^2}{\alpha_{th}}, \quad (2.1)$$

onde $\alpha_{th}(m^2/s)$ é a difusividade térmica do material.

O tempo de relaxação de tensão é definido por:

$$\tau_s = \frac{d_c}{v_s}, \quad (2.2)$$

onde $v_s(m/s)$ é a velocidade do som na amostra [15, 14].

Se a duração do pulso eletromagnético responsável pela geração da onda PA na amostra (τ_l) é menor do que τ_{th} , ou seja, o tempo de iluminação não é suficiente para o calor gerado se difundir pela amostra por uma distância mínima, diz-se que o sistema está operando sob o regime de confinamento térmico. Quando tal regime é alcançado a difusão térmica não contribui para a formação dos pulsos acústicos, visto que o tempo de duração da iluminação não é suficiente para que o fenômeno seja detectado, então pode-se desprezar os termos matemáticos associados a difusão térmica, como será realizado nas próximas seções [15, 14, 7].

Se a duração do pulso eletromagnético incidente (τ_l) for menor que τ_s , o sistema atingiu o confinamento de tensão. A consideração deste regime também permitirá algumas simplificações matemáticas nas seções subsequentes [15, 14, 7].

Em resumo, os regimes de confinamento térmico e de tensão são representados respectivamente pelas seguintes equações:

$$\tau_l < \tau_s \quad (2.3a)$$

$$\tau_l < \tau_{th} \quad (2.3b)$$

Observa-se que os artefatos utilizados nas medições fotoacústicas realizadas por vários autores foram escolhidos de forma a respeitarem os regimes de confinamento térmico e de tensão para que a análise teórica do sistema seja simplificada. Os experimentos que serão apresentados no capítulo 4, utilizando os aparatos experimentais descritos no capítulo 3, foram realizados sob ambos os confinamentos. [14, 7].

2.1.2.2 Variação de pressão inicial

Nesta seção será calculado o aumento de pressão em um sítio imediatamente após o mesmo absorver um pulso de laser curto com características conhecidas operando sob os regimes de confinamento térmico e de tensão. O resultado explicita como a partir da variação de pressão inicial (pulso acústico no tempo e local em que foi gerado) se obtém propriedades térmicas, ópticas e acústicas do sítio.

A variação de volume relativa de um sítio (dV/V) decorrente da absorção de um pulso óptico logo após tal fenômeno é fornecida pela seguinte equação

$$\frac{dV}{V} = -\kappa p + \beta T, \quad (2.4)$$

onde $\kappa(Pa^{-1})$ é a compressibilidade isotérmica, $\beta(K^{-1})$ é o coeficiente térmico de expansão volumétrica e $p(Pa)$ e $T(K)$ são respectivamente os aumentos com relação aos valores no equilíbrio ambiente (antes do pulso óptico atingir a amostra) de pressão e temperatura do sítio imediatamente após a absorção da radiação EM.

Se o sistema opera sob os regimes de confinamento térmico e de tensão, isto é, as equações (2.3a) e (2.3b) são satisfeitas, a variação de volume se torna desprezível e obtém-se

$$p = \frac{\beta T}{\kappa}. \quad (2.5)$$

Percebendo que toda a energia responsável pela alteração local de temperatura foi proveniente da absorção óptica mas nem toda a energia absorvida contribui para esta variação visto que podem haver desexcitações radiativas além das não radiativas no material, infere-se que

$$T = \frac{\eta_{th} A_e}{\rho C_V}, \quad (2.6)$$

onde η_{th} (adimensional) representa a razão entre a energia luminosa transformada em calor e a absorvida e depende do material analisado e A_e consiste na deposição de energia óptica específica (J/m^3) do pulso de laser.

Substituindo (2.6) em (2.5), chega-se a:

$$p = \frac{\beta}{\kappa\rho C_V} \eta_{th} A_e. \quad (2.7)$$

A fim de simplificar a visualização da equação (2.7) o parâmetro de Gruneisen Γ será introduzido

$$\Gamma = \frac{\beta}{\kappa\rho C_V}. \quad (2.8)$$

É importante notar que Γ engloba as grandezas associadas às características mecânicas e térmicas do sítio. Com a substituição de Γ , p se torna:

$$p = \Gamma \eta_{th} A_e. \quad (2.9)$$

No caso da absorção de fóton único (absorção linear) há uma relação direta entre A_e e o coeficiente de absorção óptica associado ao sítio:

$$A_e = \mu_a F, \quad (2.10)$$

com $\mu_a (m^{-1})$ representando o coeficiente de absorção óptica e $F (J/m^2)$ a fluência óptica, grandeza corriqueiramente medida em laboratório de forma simples. A equação (2.9), então, se torna:

$$p = \Gamma \eta_{th} \mu_a F. \quad (2.11)$$

A equação (2.11) revela a relação direta entre os termos ópticos η_{th} e μ_a , os termos térmicos e acústicos inclusos no parâmetro de Gruneisen e a variação de pressão sofrida pelo sítio de absorção que possibilita a investigação das propriedades dos materiais a partir de métodos fotoacústicos. A inferência da energia óptica absorvida por regiões localizadas da amostra a partir do pulso acústico é a base das principais aplicações do efeito fotoacústico.

Se Γ e η_{th} são características do material conhecidas e F é medido, com a aferição de p , μ_a pode ser facilmente obtido. Entretanto o p não é medido diretamente, mas sim a magnitude do pulso acústico que no tempo e local em que foi gerado tinha a magnitude p . Em geral, se obtém p a partir do pulso detectado por meio de métodos computacionais. A expressão aqui encontrada para p será utilizada na seção 2.1.2.4 para a resolução da equação que descreve a geração e propagação da onda fotoacústica.

2.1.2.3 Equação geral da fotoacústica: geração e propagação da onda acústica

Aqui será considerado que a região de propagação do pulso de pressão é acusticamente homogênea, ou seja, as grandezas contidas no parâmetro de Gruneisen serão

consideradas constantes em toda a amostra e região de propagação do pulso de pressão e não dependente da localização.

Tal situação é analisada porque nos materiais mais estudados pelos sistemas PAS e PAI assim como nas amostras de interesse deste trabalho à diferenciabilidade das propriedades ópticas se sobrepõe fortemente a diferenciabilidade das propriedades térmicas e mecânicas. A razão entre a energia transformada em calor e a energia absorvida, η_{th} , também pode ser considerada constante sem grandes perdas nas situações de interesse.

A partir das equações acopladas que descrevem a temperatura e a pressão de um meio da dinâmica dos fluidos (página 282 de [36]) obtém-se as equações a seguir

$$\rho C_p \frac{\partial T(\vec{r}, t)}{\partial t} = H(\vec{r}, t), \quad (2.12)$$

$$\left[\nabla^2 - \frac{1}{v_s^2} \frac{\partial}{\partial t^2} \right] p(\vec{r}, t) = -\frac{\beta}{\kappa v_s^2} \frac{\partial^2 T(\vec{r}, t)}{\partial t^2}, \quad (2.13)$$

$p(\vec{r}, t)$ e $T(\vec{r}, t)$ são respectivamente os aumentos de pressão e temperatura no ponto \vec{r} e tempo t do meio com relação aos seu valores no equilíbrio com o ambiente. ρ , C_p , κ e β , v_s são, nesta ordem, a densidade, a capacidade térmica isobárica, a compressibilidade isotérmica, o coeficiente térmico de expansão volumétrico e a velocidade do som relativos ao meio onde a onda acústica se propaga na condição de equilíbrio ambiente [15, 24, 37]. H representa a energia térmica (decorrente da absorção óptica) por unidade de volume por unidade tempo, logo se associa a deposição de energia óptica por volume $A_e(\vec{r}', t)$ através de

$$H(\vec{r}, t) = \eta_{th} \frac{\partial A_e(\vec{r}', t)}{\partial t}. \quad (2.14)$$

Para se chegar a equação (2.12) o termo fonte associado ao aumento de temperatura devido ao pulso óptico ($H(\vec{r}, t)/\rho C_p$) foi acrescentado [38]. Além disso, considerou-se que o sistema estava sobre o regime de confinamento térmico de modo que o termo associado a difusão térmica foi desprezado. Também utilizou-se a aproximação válida para a maioria dos líquidos de que o calor específico a pressão constante é igual ao calor específico a volume constante [37].

Para se obter a equação de onda (2.13), denominada de equação geral da fotoacústica [24, 15], considerou-se que o fluido onde a onda se propagava era inviscível (sem viscosidade). Além disso, foi considerado que o calor específico a pressão constante é igual ao calor específico a volume constante [37].

Substituindo as equações 2.12 e 2.14 na equação 2.13 e utilizando a igualdade da termodinâmica $\kappa = C_p/C_v \rho v_s^2$ e a condição $C_p = C_v$, obtém-se

$$\left[\nabla^2 - \frac{1}{v_s^2} \frac{\partial}{\partial t^2} \right] p(\vec{r}, t) = -\frac{\beta}{C_p} \frac{\partial H(\vec{r}, t)}{\partial t}. \quad (2.15)$$

Pode-se observar que do lado esquerdo da equação estão os termos associados à propagação da onda de pressão (acústica), enquanto que do lado direito verifica-se o termo fonte que gera a onda e está relacionado diretamente às propriedades do pulso óptico por 2.14.

A equação 2.15 é válida para ondas acústicas geradas por pulsos de laser sob o regime de confinamento térmico em líquidos não viscosos. É importante salientar que a equação juntamente com a condição inicial obtida em 2.1.2.2 também descreve bem o sinal gerado por alguns materiais sólidos, tais como tecidos biológicos, e propagado em líquidos não viscosos e por esta razão é amplamente utilizada no desenvolvimento de softwares de geração de imagem fotoacústicas.

A próxima seção mostrará a solução desta equação na forma integral (que em geral é resolvida numericamente) e comentará alguns casos específicos onde a solução pode ser encontrada analiticamente.

2.1.2.4 Resolução da equação de onda fotoacústica em uma região homogênea termicamente e acusticamente

A solução da equação (2.15) na forma integral pode ser obtida pelo método da função de Green. Este método fornece que [39]

$$p(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi} \int_{-\infty}^{\infty} G(\vec{r}, t; \vec{r}', t') \frac{\beta}{C_p} \frac{\partial H(\vec{r}', t')}{\partial t'} d\vec{r}' dt', \quad (2.16)$$

onde $G(\vec{r}, t; \vec{r}', t')$ é a função de Green associada ao operador

$$\nabla^2 - \frac{1}{v_s^2} \frac{\partial}{\partial t^2}, \quad (2.17)$$

e os demais termos dentro da integral são exatamente o termo fonte da equação 2.15. Segundo a referência [39], a função de Green retardada de (2.17) numa região sem fronteiras é

$$G(\vec{r}, t; \vec{r}', t') = \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} \delta \left[t' - \left(t - \frac{|\vec{r} - \vec{r}'|}{v_s} \right) \right]. \quad (2.18)$$

Assim $p(\vec{r}, t)$ é dado por

$$p(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi} \frac{\beta}{C_p} \frac{\partial}{\partial t} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} H \left[\vec{r}', \left(t - \frac{|\vec{r} - \vec{r}'|}{v_s} \right) \right] d\vec{r}'. \quad (2.19)$$

Considerando que o comportamento temporal do pulso é descrito por uma função $\delta(t)$, $H(\vec{r}', t')$ pode ser escrito como:

$$H(\vec{r}', t') = \eta_{th} A_e(\vec{r}', 0) \delta(t'). \quad (2.20)$$

Substituindo (2.20) e (2.10) em (2.19):

$$p(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi} \frac{\beta}{C_p} \eta_{th} \frac{\partial}{\partial t} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} \mu_a(\vec{r}') F(\vec{r}', 0) \delta \left(t - \frac{|\vec{r} - \vec{r}'|}{v_s} \right) d\vec{r}'. \quad (2.21)$$

A equação (2.21) revela a relação entre o pulso acústico (variação de pressão) detectada no tempo t e na posição \vec{r} , onde se situa o detector, e os coeficientes de absorção óptica dos pontos localizados em \vec{r}' .

Pode-se também associar o pulso detectado à variação de pressão inicial $p(\vec{r}', 0)$. Para tal será utilizada a equação (2.7) obtida em 2.1.2.2 considerando que o tamanho de cada sítio é tão pequeno com relação ao volume total da amostra que a variação de pressão inicial de um sítio pode ser considerada a variação de pressão no tempo $t=0$ no ponto r' onde o sítio está localizado e de um problema discreto migra-se para o contínuo.

Esta consideração juntamente com a igualdade termodinâmica [24]

$$\kappa\rho = \frac{C_p}{C_v v_s^2}, \quad (2.22)$$

com $C_p = C_v$ resulta em:

$$p(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi v_s^2} \frac{\partial}{\partial t} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} p(\vec{r}', 0) \delta\left(t - \frac{|\vec{r} - \vec{r}'|}{v_s}\right) d\vec{r}'. \quad (2.23)$$

As integrais espaciais em 2.21 e 2.23 representam o soma dos pulsos gerados por cada um dos sítios de absorção e em geral, podem ser resolvidas computacionalmente. Soluções analíticas para casos onde a geometria da amostra é simples com ótimas concordâncias com os resultados experimentais podem ser encontradas nas referências [40, 41]. Os fundamentos matemáticos discutidos até este ponto são a base dos métodos computacionais utilizados nos programas que integram sistemas de espectroscopia e geração de imagens fotoacústicas. Estes métodos tratam o problema de forma inversa e a partir de $p(\vec{r}, t)$ são capazes de encontrar informações sobre propriedades ópticas e termodinâmicas de regiões localizadas da amostra bem como a sua geometria.

2.2 APLICAÇÕES

Esta seção aborda duas importantes aplicações do efeito fotoacústico: a espectroscopia fotoacústica (2.2.1) e as modalidades fotoacústicas de geração de imagens (2.2.2). A microscopia fotoacústica e a tomografia fotoacústica são destacadas em 2.2.2.1 e 2.2.2.1, respectivamente.

Como discutido na seção 2.1, entre a produção e a detecção das ondas fotoacústicas existem 5 processos físicos: absorção óptica, geração de ondas térmicas, propagação de ondas térmicas, geração de ondas elásticas e propagação de ondas elásticas. Com base nestes eventos, pode-se diferenciar propriedades de amostras distintas, ou mesmo de partes distintas de determinada amostra, pela análise de seus sinais fotoacústicos. Além de características térmicas e mecânicas, pode-se obter, a partir da inspeção da onda acústica, o coeficiente de absorção óptica dos materiais estudados. Isto propiciou o surgimento de várias técnicas baseadas no efeito fotoacústico, tais como a calorimetria fotoacústica, a

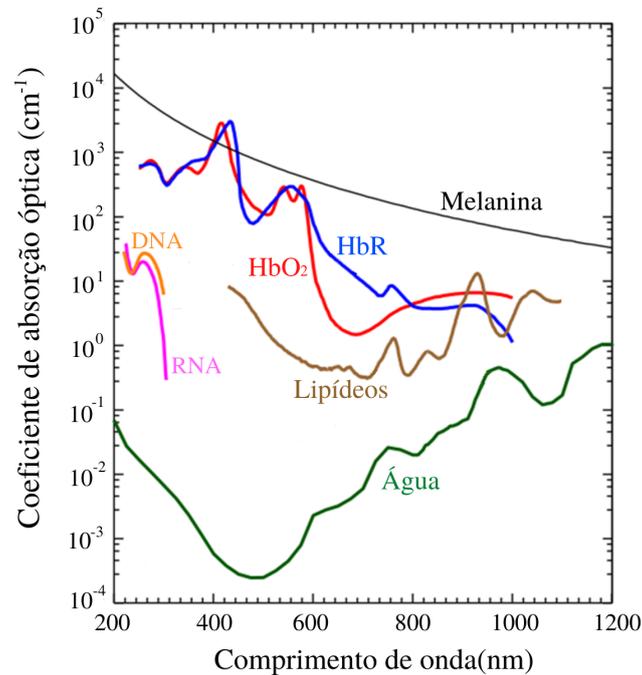
espectroscopia fotoacústica (PAS) e a modalidade de geração de imagem fotoacústica (PAI). O coeficiente de absorção óptica apresenta altíssima especificidade e técnicas PAS e PAI estão embasadas em sua diferenciação. A exploração, busca por aperfeiçoamento e o crescente número de aplicações recentes da PAS e da PAI podem ser evidenciadas pelas referências [16, 42, 43, 15, 44, 1], e as próximas seções se focarão em tais técnicas.

Encontra-se uma vasta quantidade de estudos na área de ciências dos materiais que aplicaram a fotoacústica na investigação de propriedades de amostras orgânicas e inorgânicas. A implementação destas técnicas para análise de materiais biológicos propiciou o desenvolvimento de novas modalidades de diagnóstico, baseadas no efeito, que já foram bastante exploradas e apresentaram excelentes resultados [16, 42, 43]. Esta seção focará, principalmente, na fotoacústica aplicada a tecidos biológicos, sob a seguinte justificativa: os trabalhos realizados para esta dissertação (apresentados nos capítulos 3 e 4) consistiram na construção de um sistema capaz de imagens fotoacústicas, e na avaliação da viabilidade de seu uso no diagnóstico odontológico.

Para que um material possa ser estudado por meio das técnicas fotoacústicas, é necessário que em sua composição haja substâncias capazes de absorver radiação EM nos comprimentos de onda utilizados pelo aparato o suficiente para gerar sinais acústicos passíveis de serem detectadas pelo sistema. Essas substâncias são denominadas de cromóforos e, no contexto das modalidades de imagem de tecidos biológicos, são intituladas de agentes de contraste. Estes se classificam em dois tipos: os agentes de contraste endógenos, que a priori já faziam parte da composição natural do tecido, e os exógenos, que são produzidos externamente e introduzidos nas amostras por meio da intervenção humana [15, 42].

Exemplos de agentes de contraste endógenos comuns são a hemoglobina (pode-se diferenciar a oxi-hemoglobina da desoxi-hemoglobina), a melanina, os ácidos nucleicos, os lipídeos e a água. Utilizando a absorção de radiações EMs visíveis e infravermelhas pela hemoglobina, obtém-se informações a respeito da morfologia e da fisiologia de vasos sanguíneos [43, 15]. Pode-se descobrir informações extremamente importantes para o diagnóstico de melanoma pela análise do sinal fotoacústico gerado pela melanina [45]. A partir da absorção da radiação ultravioleta pelos ácidos nucleicos são construídas imagens de núcleos celulares. Os lipídeos permitem a investigação preventiva de doenças vasculares tais como a arterosclerose [46], já a absorção da água possibilita o estudo de lesões. Uma grande vantagem do uso dos cromóforos endógenos nas técnicas fotoacústicas é a simplificação do procedimento; uma vez que todas as etapas de produção e administração dos agentes de contraste não são necessárias, e também não haverá motivos para preocupações com alterações na amostra devido a introdução de substâncias [15, 47]. Ademais, diversos agentes de contraste exógenos utilizados no diagnóstico por imagem desencadeiam efeitos colaterais nos pacientes. O espectro de absorção dos cromóforos endógenos mais usuais é mostrado na figura 3

Figura 3 – Espectros de absorção de agentes de contraste endógenos.



Fonte: Adaptado de [15].

Os agentes de contraste exógenos são administrados nas amostras, a fim de intensificar o sinal oriundo de alguma substância, ou conferir maior seletividade a determinados componentes dos tecidos analisados. É comum o uso de nanopartículas e os corantes orgânicos, tais como o azul de metileno e a indocianina verde, como agentes de contraste exógenos. Uma discussão aprofundada sobre estes e outros diversos agentes de contraste exógenos, bastante utilizados atualmente, foi realizada por Fu et al. em 2019 [47].

2.2.1 Espectroscopia fotoacústica

2.2.1.1 Técnicas espectrométricas

O termo espectroscopia refere-se de forma genérica ao estudo das interações das radiações eletromagnéticas (EM) com a matéria. As técnicas espectrométricas experimentais (espectrometrias) consistem fundamentalmente na análise do espectro das radiações EM absorvidas ou emitidas por um material, a fim de deduzir a composição química do mesmo, e, conseqüentemente, algumas de suas propriedades físico-químicas. Tais técnicas são referidas, na grande maioria dos estudos, também pelo termo espectroscopia e este trabalho fará da mesma forma. A espectroscopia proporcionou grande parte dos conhecimentos atuais acerca das estruturas submicroscópicas da matéria, de forma que pode-se afirmar que o estado da arte da física atômica e molecular, da química e da biologia molecular só foi possível graças a esta técnica [48].

O espectro (de emissão ou absorção) de uma dada amostra está intimamente relacionado com a distribuição eletrônica dos materiais que a constituem. A partir do comprimento de onda das linhas espectrais, deduz-se os níveis de energia de sistemas atômicos e moleculares; a intensidade de uma dada linha espectral fornece a probabilidade de determinada transição (eletrônica, rotacional ou vibracional) acontecer; já a largura natural de uma linha espectral propicia o cálculo do tempo de vida médio de estados excitados. Estes são alguns exemplos de como a espectroscopia pode ser utilizada na inferência das estruturas eletrônicas de átomos e moléculas, e, conseqüentemente, na dedução das estruturas das moléculas e dos tipos de interações entre as mesmas. Uma enorme quantidade de linhas espectrais foram correlacionadas com elementos, moléculas e ligações; e tabeladas. Atualmente ao investigar uma substância desconhecida por espectroscopia, compara-se seu espectro aos dados tabelados [48].

As técnicas espectrométricas tradicionais, ou seja, as espectroscopias ópticas, podem ser divididas em 4 grupos, a depender do fenômeno físico responsável pela geração do espectro a ser analisado. O primeiro deles engloba as espectroscopias de emissão atômica, que investigam as amostras a partir das radiações emitidas pelos seus constituintes. Estas técnicas são amplamente utilizadas na Astronomia, para o estudo dos corpos celestes que estão situados em locais de difícil acesso mas emitem radiações para regiões acessíveis. O segundo grupo inclui as espectroscopias de luminescência, que também utilizam as radiações emitidas pelos materiais, porém, diferentemente das espectroscopias de emissão atômica, as de luminescência excitam a amostra para que ela emita a radiação a ser analisada. Os principais tipos de espectroscopia de luminescência são a quimiluminescência, a espectrometria de fluorescência e a espectrometria de fosforescência. As técnicas classificadas no terceiro grupo analisam as radiações espalhadas, e por isso são denominadas espectroscopias de espalhamento; técnicas representantes deste grupo são a espectrometria Raman, a turbidimetria e nefelometria. No quarto grupo estão as espectroscopias de absorção, ou seja, as técnicas que identificam o espectro absorvido por dada amostra para sua análise [49].

2.2.1.2 Definições e aspectos gerais

O efeito fotoacústico (PA, do inglês *PhotoAcoustic*) permite a aferição da energia óptica absorvida por uma amostra através da análise de pulsos acústicos. Como a onda fotoacústica é gerada em decorrência da absorção óptica, as grandezas que a descrevem fornecem as informações necessárias à realização de medidas espectrométricas. O termo espectroscopia fotoacústica (PAS, do inglês *PhotoAcoustic Spectroscopy*) refere-se à técnica espectrométrica baseada no efeito PA [1], este método é classificado como uma espectroscopia de absorção. A PAS é considerada uma técnica de medição de composição química e de concentração de componentes, com alta sensibilidade e alta seletividade.

A diferença fundamental entre a PAS e as espectroscopias ópticas convencionais está na natureza da grandeza física medida. As técnicas usuais aferem a potência dos fótons transmitidos, espalhados ou refletidos pela amostra para produzirem os espectros a serem analisados. Já na PAS, informações espectrais são obtidas a partir da medição direta de uma grandeza proporcional a absorção óptica, a amplitude do sinal fotoacústico. [1, 8, 31].

Um grande desafio para as espectroscopias de absorção óptica é a determinação da parcela de energia que foi efetivamente absorvida pelo material. Para tal, detecta-se o espectro de uma dada fonte luminosa antes e depois de atravessar a amostra, e, subtrai-se o segundo espectro obtido do primeiro. Esta diferença fornece a atenuação, ou seja toda a parcela de energia incidente que não chegou ao detector (devido à absorção e espalhamento). Para se obter espectros de absorção de materiais espalhadores, são necessários cálculos computacionais, aprimoramentos do aparato experimental e até mesmo preparações especiais das amostras. Estes procedimentos em geral são complicados e dependem de características específicas dos materiais analisados. Como no caso da PAS a medição da absorção ocorre de forma direta, os fótons associados a outros fenômenos ópticos naturalmente não são contabilizados. Isto é uma notável vantagem da PAS, uma vez que a técnica possibilita a realização de análises espectrométricas com experimentos simples, até mesmo em materiais altamente espalhadores, sem a necessidade de tratamentos das amostras.

Outro relevante benefício da PAS é sua alta sensibilidade, que permite a detecção de absorbâncias da ordem de 10^{-10}cm^{-1} [10]. Além disso, a PAS é capaz de fornecer o espectro de absorção de materiais altamente absorventes, e até mesmo completamente opacos, o que, obviamente, não pode ser obtido empregando a espectroscopia de absorção óptica. Assim, a PAS é adequada na análise de uma vasta quantidade de materiais, com diferentes características ópticas, em diversos formatos e em qualquer estado físico [8, 31].

2.2.1.3 Instrumentação

Um sistema de medidas fotoacústicas é constituído fundamentalmente pelos seguintes componentes: uma fonte luminosa modulada ou pulsada; uma célula fotoacústica, dentro da qual são dispostas as amostras; um detector (ou um conjunto de detectores) de sinais acústicos; alguns dispositivos eletrônicos, para amplificar e ler o sinal; e um sistema computacional para controlar todo o aparato e processar os dados coletados [35].

2.2.1.3.1 Fontes de radiação eletromagnética

Considera-se que uma fonte de luz ideal para a PAS é aquela que [35]:

- Emite comprimentos de onda bem definidos por meio de sintonização;
- Apresenta um método de modulação intrínseco com frequência estável e controlável. As frequências mais adequadas são as da faixa de kHz, pois as ondas acústicas são geradas na mesma frequência e há uma ampla variedade de detectores acústicos compactos nesta faixa de frequências;
- É capaz de emitir luz a alta potência, pois as amplitude das ondas fotoacústicas são proporcionais à potência da luz incidente;
- Emitem feixes que podem ser colimados a diâmetros estreitos.

Os lasers cumprem com praticamente todos estes requisitos. Por tal motivo, pouco tempo após a criação dos primeiros lasers, foram desenvolvidos de sistemas PAS utilizando os dispositivos como fontes luminosas [50]. Além disso, atualmente, os lasers são as fontes mais empregadas nos diversos sistemas PAS existentes. São facilmente encontrados trabalhos que produziram sistemas PAS utilizando lasers a gás de CO_2 [51, 52], lasers de diodo [53, 54], lasers de cascata quântica [55, 56] e lasers Q-switched Nd:YAG [57], como exemplificado pelas referências citadas [35].

Os lasers de CO_2 emitem na região do infravermelho médio, compreendendo a faixa das frequências que ocasionam grande partes das transições roto-vibacionais, bem conhecida por *região de impressão de digital* dos compostos. Estas fontes de radiação de alta potência possibilitaram o surgimento de sistemas PAS bastante sensíveis. As principais desvantagens da utilização dos lasers de CO_2 nos sistemas PAS são o alto custo do equipamento e de sua manutenção. Além disso, muitos lasers de CO_2 não apresentam um método de modulação intrínseco, sendo, nestes casos, necessária a modulação mecânica do feixe [35].

Provavelmente as fontes de luz mais utilizadas nos aparatos fotoacústicos são os lasers de diodo de retroação distribuídas (DFB, do inglês *Distributed FeedBack*). Estes laser emitem modos únicos, são sintonizáveis, compactos, robustos e seus feixes podem ser modulados por variação de corrente ou temperatura. Tais características, juntamente com o fato dos lasers de diodo poderem ser acoplados a fibras ópticas, permitiram o desenvolvimento de sistemas PAS menores, mais estáveis e resistentes, capazes de realizar medidas *in locu* e não apenas em laboratório [35].

Os lasers Q-switched Nd:YAG emitem radiação pulsada de alta potência em um único comprimento de onda (1064nm). Quando combinados com componentes de conversão de comprimento de onda, estes laser são ótimas fontes de radiação para sistemas PAS de alta sensibilidade. A associação de lasers Nd:YAG com osciladores paramétricos ópticos (OPOs), por exemplo, permitiu a detecção de concentrações menores que parte por bilhão (ppb) [35].

O desenvolvimento de LEDs (*light-emitting diodes*) modulados a altas frequência, com alta potência e capazes de emitir bandas de comprimentos de onda estreitas permitiu o desenvolvimento de sistemas PAS utilizando LEDs como fonte luminosa. Os LEDs apresentam a grande vantagem por serem muito mais econômicos e compactos do que os lasers [58, 59, 60, 61].

2.2.1.3.2 Célula fotoacústica

Uma célula fotoacústica consiste simplesmente em um recipiente onde são colocadas as amostras a serem estudadas e o detector acústico. A célula PA influencia diretamente o formato e a amplitude das ondas PAs geradas pela amostra. Os ruídos dos sistemas também dependem da célula PA, então, pode-se dizer que a sensibilidade de um aparato PAS está associada ao tipo de célula PA utilizada. O recipiente mais indicado para cada sistema depende da natureza da amostra que será analisada [31].

No estudo de gases, a amostra pode preencher toda a célula fotoacústica, e o tamanho e formato da célula podem ser ajustados de modo que haja ressonância das ondas PAs dentro da célula. As células fotoacústicas ressonantes aumentam a amplitude da onda fotoacústica, melhorando a sensibilidade do sistema.

Na análise de sólidos e líquidos, muitas vezes é indicado que se preencha a célula PA com algum líquido (em geral a água) a fim de se obter um melhor acoplamento acústico entre a amostra e o meio que a circunda e também entre o meio e o detector [35, 62, 31].

2.2.1.3.3 Detectores acústicos

Os detectores acústicos são fundamentalmente equipamentos que convertem sinais acústicos (variações de pressão) em sinais elétricos. Os dispositivos de detecção mais usuais são os microfones capacitivos e os transdutores piezoelétricos ultrassônicos [31].

Microfones capacitivos são capacitores com distância entre as placas variáveis. Quando a distância entre as placas dos capacitores se ajusta em decorrência da pressão a qual o aparelho está submetido, geram-se pulsos elétricos proporcionais aos pulsos acústicos. Os pulsos elétricos podem ser lidos pelos dispositivos eletrônicos que serão discutidos na próxima seção. Os microfones capacitivos mais empregados a PAS são os de eletreto, estes dispositivos são compactos, econômicos e resistentes. Atualmente existe no mercado uma ampla variedade de pequenos microfones de eletreto, que abrangem uma vasta região de frequências sonoras e ultrassônicas. Os microfones são mais indicados nas PAS de amostras gasosas [35].

Transdutores (ou detectores) piezoelétricos (PZT do inglês *PieZoelecTric*) são equipamentos que transformam os estresses mecânicos em sinais elétricos devido a presença de um material PZT em seu interior. Materiais PZT são aqueles que, quando submetidos a

variações de pressão, se polarizam e geram correntes proporcionais aos estresses mecânicos. Exemplos de materiais PZT comumente empregados na confecção de transdutores são o quartzo e a turmalina. Também existem detectores PZT cerâmicos, que, diferentemente dos de cristal único, utilizam um conjunto de camadas de materiais diferentes como elemento piezoelétrico. Comparações entre os diversos tipos de transdutores podem ser encontradas na referência [63, 31].

Os transdutores piezoelétricos oferecem grandes vantagens na análise de materiais nos estados líquidos e sólidos. A otimização do casamento de impedância acústica entre o transdutor e a amostra no estado sólido, quando o dispositivo é posto em contato direto com a mesma, fornece maior sensibilidade e confiabilidade aos sistemas PAS. O desenvolvimento de transdutores PZT de imersão, detectores que podem ser submersos em diversos líquidos, possibilitou um acoplamento ainda mais sofisticado, uma vez que a célula fotoacústica pode ser preenchida pelo líquido que melhor se adequa a dada amostra. Outro benefício dos detectores PZT é a capacidade de responder rapidamente aos estresses mecânicos. Em decorrência desta característica, os transdutores PZT são muito mais indicados em sistema PAS que operam com radiações pulsadas [64, 35, 62, 31].

2.2.1.3.4 Dispositivos eletrônicos para controle e automação de medidas

Amplificadores eletrônicos capazes de filtrar e amplificar os sinais provenientes do detector acústico são dispositivos fundamentais a PAS, uma vez que a relação sinal-ruído dos sinais fotoacústicos é muito pequena para a grande maioria das amostras estudadas. Após serem transformados em sinais elétricos e amplificados, os sinais fotoacústicos precisam ser digitalizados para posteriormente serem tratados e armazenados em computadores. Para realizar a digitalização, são utilizados processadores de sinais digitais, tais como osciloscópios, que também permitem controle do modo como o sinal será armazenado. Além disso, para a automatização completa do sistema, são necessárias unidades de automação e controle eletrônicas altamente integradas, bem como um software que trate os dados e forneça os espectros das amostras.

Nos casos em que são utilizadas radiações moduladas, também podem ser necessários controladores de corrente e temperatura dos lasers. Além disso, nos casos específicos de estudos de amostras gasosas, podem ser desejáveis dispositivos mecânicos e eletrônicos para ejetarem as amostras para dentro das células PA e expulsarem os gases das mesmas.

2.2.1.4 Aplicações da PAS

De modo geral, a aplicação da PAS é a análise química quantitativa e qualitativa [65]. Como a análise química fornece uma grande quantidade de informações relevantes a respeito das propriedades dos materiais, a PAS é bastante aplicada em ciências de materiais [66, 67]. A técnica também foi amplamente empregada em estudos ambientais, avaliando

propriedades dos solos [68, 69] e concentração de gases poluentes no ar [56, 53]. Diversas aplicações da PAS nas áreas médicas e biológicas também são encontradas facilmente na literatura, uma vez que é possível inferir características fisiológicas de organismos a partir da análise química de tecidos biológicos [70, 71]. Estes são apenas alguns poucos exemplos das inúmeras aplicações da PAS.

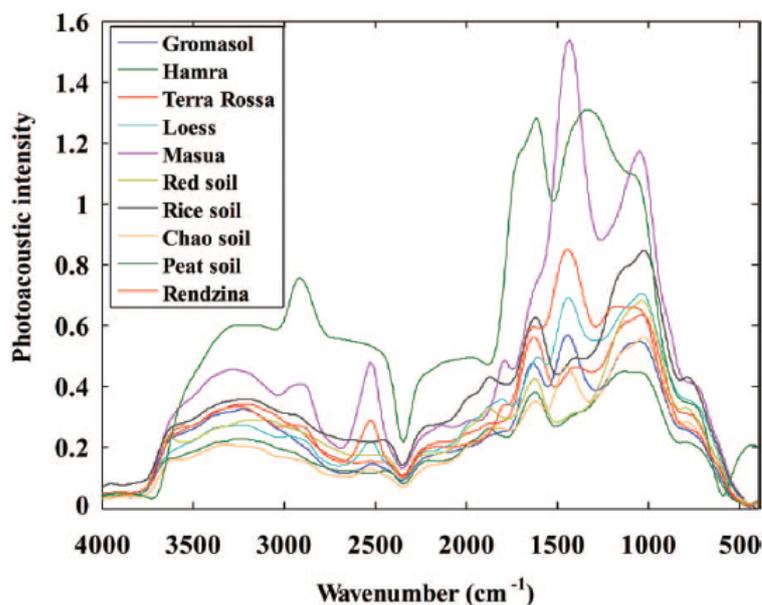
Como comentado, através da PAS torna-se possível a análise das linhas espectrais de materiais altamente transparentes e altamente absorvedores (opacos), o que não ocorre no caso das técnicas espectrométricas de absorção tradicionais. Tal qualidade amplia bastante os campos de aplicação da PAS. A seguir serão discutidos alguns resultados relevantes obtidos com a PAS visando ilustrar o potencial da técnica. Outras aplicações interessantes podem ser encontradas nas referências [8, 72, 51, 65, 31]. É importante salientar que a PAS permanece em crescente desenvolvimento sendo aplicada cada vez mais em diversas áreas.

Uma notável aplicação da PAS é o estudo dos componentes dos solos. O conhecimento do tipo de solo de um local é de extrema importância para a agricultura, uma vez que conhecendo as propriedades dos solos pode-se avaliar a viabilidade do plantio de dada cultura, assim como realizar seu manejo adequado. Usualmente o estudo de solos é realizado por inspeção laboratorial, nas quais uma porção da terra é retirada, tratada e posta para reagir com diversos componentes. Este processo é longo, complexo, demanda mão de obra especializada e pode produzir resíduos danosos ao meio ambiente. As espectroscopias, por outro lado, tem se mostrado como métodos mais rápidos, mais econômicos (a longo prazo), sem contato, não poluentes e objetivos para análise de solos. A espectroscopia fotoacústica destaca-se entre os métodos espectrométricos tradicionais por não necessitar de preparações das amostras, podendo a avaliação ser realizada até mesmo *in loco*, e por garantir maior sensibilidade e especificidade às análises.

Os solos são compostos fundamentalmente por água, matéria orgânica e minerais argilosos, tais como carbonato de cálcio, a caulinita e a bentonita. Os componentes dos solos podem ser distinguidos a partir de seus espectros fotoacústicos (ou espectros de absorção) característicos. Existe certa dificuldade na identificação da transição associada a cada pico de absorção no espectro de uma dada amostra de solo devido à sobreposição das absorções associadas a um grande número de compostos. Apesar disso, cada tipo de solo apresenta absorções características bem conhecidas e a partir da espectroscopia fotoacústica é possível classificar os solos bem como inferir suas propriedades. A figura (figura 4) mostra os espectros fotoacústicos na região do infravermelho de 10 tipos de solos bem conhecidos [68, 69].

Uma outra aplicação da PAS extremamente relevante, na área de medicina, foi demonstrada na referência [73]. O artigo utilizou a PAS para monitorar a quantidade de etileno contida no ar expirado por pacientes enquanto os mesmos eram submetidos a

Figura 4 – Espectro fotoacústico de 10 tipos de solos distintos.



Fonte: Adaptado de [68].

cirurgias cardíacas. Neste caso a concentração de etileno na expiração está intimamente relacionada com a peroxidação de lipídios, que, por sua vez, está associado à resposta cirúrgica. Um equipamento PAS comercial foi capaz de fornecer a concentração de etileno em amostras do ar expirado pelos pacientes em tempo real. A figura 5 mostra a concentração de etileno em função do tempo de duração da cirurgia. O artigo [73] comprova a viabilidade da aplicação da PAS, método não invasivo e de alta sensibilidade, na análise em tempo real a peroxidação de lipídeos, que pode ser utilizada para estudos clínicos e em períodos perioperatórios [73, 74]. Outras aplicações da PAS na análise de componentes do ar exalado por indivíduos com objetivo de diagnóstico podem ser encontrados em [74].

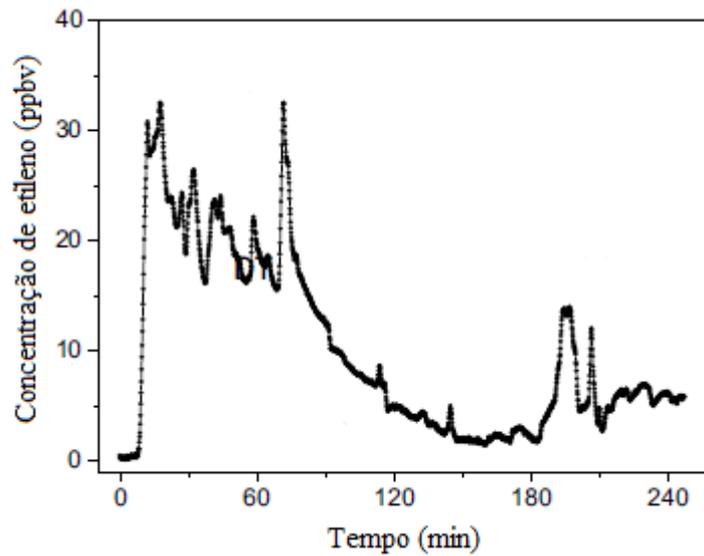
Vale salientar que a análise de materiais biológicos com a PAS apresenta grandes vantagens: a técnica é capaz de obter informações do material a partir de amostras muito pequenas, e sem a necessidade de contato físico com a mesma, o que possibilita a reutilização de amostras e o estudo *in vivo*. Entre estes trabalhos, destacam-se artigos que avaliaram o espectro de absorção do sangue através da PAS, a fim de inferir aspectos fisiológicos de tecidos biológicos e diagnosticá-los. [12, 8].

2.2.2 Métodos de geração de imagens fotoacústicos

2.2.2.1 Considerações gerais

O surgimento de técnicas de geração de imagens biológicas causou grande impacto nas ciências e na medicina, especialmente no diagnóstico, uma vez que permitiu o acesso a informações anatômicas e fisiológicas a respeito de organismos de forma não invasiva *in vitro* ou *in vivo*. Existem atualmente diversos equipamentos no mercado capazes de

Figura 5 – Concentração de etileno x tempo.



Fonte: Adaptado de [73].

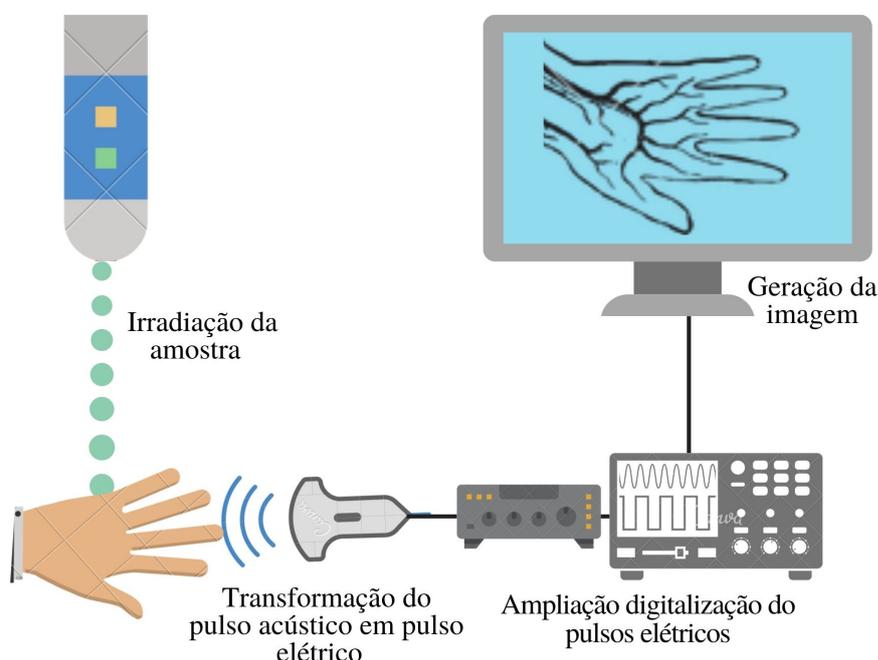
realizar imagens de tecidos biológicos por meio de diferentes modalidades que já são bem conhecidos e utilizados em estudos clínicos, pré-clínicos e no diagnóstico médico. As modalidades de imagem mais comuns podem ser divididas em 4 grupos: o primeiro engloba as que utilizam radiações ionizantes tais como a radiografia convencional, a tomografia computadorizada e a tomografia por emissão de pósitrons; o segundo é constituído pelas modalidades ópticas, e tem a microscopia de fluorescência confocal, a microscopia de fluorescência de dois fótons e a tomografia por coerência óptica como representantes; no terceiro grupo estão as ultrassonografias e no quarto as ressonâncias magnéticas. Cada uma das técnicas citadas acima apresentam benefícios e ônus de forma que a decisão da mais adequada para o estudo de dado sistema deve ser realizada com cautela levando em conta a resolução espacial, os agentes de contraste, o tempo despendido para gerar a imagem, a profundidade que se deseja alcançar, etc [42].

Na segunda metade da década de 90, foram publicados artigos que empregaram sinais fotoacústicos na geração de imagens biomédicas e sugeriram o uso das mesmas para diagnóstico [5], surgiu então, a modalidade de geração de imagens fotoacústicas (PAI, do inglês PhotoAcoustic Imaging). Isto despertou o interesse de um grande número de pesquisadores, que rapidamente apresentou novas tecnologias para a otimização da técnica e a testaram em diversos tecidos biológicos [16, 7].

Para realizar a PAI, irradia-se a amostra com pulsos curtos de laser (em geral da ordem ns) e detecta-se, em pontos que circundam a mesma, ondas ultrassônicas de banda larga emitidas por ela. Posteriormente, os dados coletados são processados computacionalmente e a imagem é gerada. As ondas ultrassônicas são geradas em decorrência da absorção óptica pelos cromóforos presentes nos tecidos biológicos. Os cromóforos estão situadas

em pontos específicos da amostra e, absorções seguidas de decaimentos não radiativos culminam no surgimento de sítios absorvedores aquecidos na amostra. Tais sítios originam pulsos acústicos que são propagados no material, no meio em que o cerca e finalmente detectados e processados por um algoritmo de reconstrução de imagem. As amplitudes dos pulsos ultrassônicos determinam os coeficientes de absorção óptica dos sítios absorvedores enquanto que o atraso temporal destes pulsos com relação ao pulso de luz incidente é utilizado para localizar os sítios absorvedores no tecido [75, 76]. Com estas informações pode-se construir uma imagem mapeando os coeficientes de absorção óptica ao longo da amostra [24, 42]. A figura 6 representa esquematicamente um sistema PAI.

Figura 6 – Esquema sistema PAI.



Fonte: Elaborada pela autora.

A análise de imagens fotoacústicas fornece informações anatômicas, funcionais e metabólicas dos tecidos, que são bastante úteis em estudos clínicos, pré clínicos e no diagnóstico. A alta especificidade do coeficiente de absorção óptica propicia à PAI alto contraste. Já a elevada penetrabilidade das ondas acústicas nos tecidos permite a geração de imagens fotoacústicas biológicas com boa resolução em profundidades relativamente altas [42, 14]. O crescente desenvolvimento de pesquisas sobre a PAI nas duas últimas décadas é, em parte, justificado quando se compara a modalidade às técnicas de diagnóstico por imagem mais utilizadas atualmente.

A PAI não utiliza radiação ionizante, logo a ausência dos riscos à saúde e da necessidade de construção de dispendiosas instalações para cumprir com as normas de segurança do uso de radiações ionizantes são notáveis vantagens da PAI sobre as técnicas que utilizam raios-X.

A diferença fundamental entre a ultrassonografia convencional e a PAI está na forma como as ondas ultrassônicas detectadas e utilizadas para a formação da imagem são originadas. Na primeira, as oscilações tratam-se apenas de reflexões de pulsos de mesma natureza que foram incididos no tecido, já na segunda, elas são consequência de aquecimentos resultantes da absorção de radiação eletromagnética pelo material biológico. Desta forma, a US se baseia nas propriedades mecânicas e elásticas das substâncias para distingui-las, já a PAI, utiliza a capacidade de absorção óptica para tal. Isto confere a PAI um contraste muito mais elevado do que o observado em imagens ultrassônicas pois a diferença entre os coeficientes de absorção óptica de materiais biológicos diferentes são bastante acentuadas, ainda que suas propriedades mecânicas e elásticas sejam altamente semelhantes. Ademais, a absorção óptica depende do comprimento de onda da radiação, logo, o contraste da imagem pode ser controlado pela variação desta grandeza na fonte de radiação incidente [14].

Quando a PAI é comparada a técnicas de diagnóstico por imagem puramente ópticas observa-se que a natureza das oscilações emitidas pelos tecidos, detectadas e utilizadas para a formação da imagem é o que substancialmente difere os métodos. No caso das modalidades ópticas são as ondas eletromagnéticas que darão a informação necessária para a geração da imagem. Como os fenômenos ópticos de espalhamento e atenuação ocorrem fortemente em materiais biológicos, tal característica confere às técnicas uma enorme diminuição da resolução espacial das imagens com o aumento da profundidade da região de interesse. O uso das modalidades ópticas apenas é viável quando deseja observar camadas que distam cerca 1 milímetro da superfície. Já no caso da PAI, um algoritmo combina pulsos ultrassônicos (mecânicos) provenientes do material biológico a fim de formar a imagem [14, 42]. Os tecidos biológicos são aproximadamente 1000 vezes mais transparentes ao ultrassom do que a luz conferindo à PAI a possibilidade de gerar imagens de regiões situadas a alguns centímetros da superfície com resolução espacial comparável ou até maior que a das obtidas por modalidades ópticas [16]. Há sistemas PAI com resolução espacial de até centenas de nanômetros. A resolução das imagens diminui com o aumento da profundidade da região de interesse, ainda assim foram desenvolvidos sistemas PAI capazes obter imagens de camadas que estão até poucas dezenas de centímetros distantes da superfície [75, 77].

Uma outra grande vantagem da PAI é a capacidade de realização de imagens vasculares de alta resolução utilizando a hemoglobina como cromóforo endógeno. As angiografias por tomografia computadorizada ou por ressonância magnética necessitam da introdução de agentes de contraste externos para produzir imagens vasculares. Normalmente os agentes utilizados, tais como o iodixanol e o iopamidol, causam efeitos adversos no paciente. Ainda usufruindo da absorção da hemoglobina, é possível realizar com a fotoacústica oximetrias, ou seja, medidas do nível de saturação de oxigênio no sangue. Para tal, analisa-se a diferença entre as absorções pelo sangue em dois ou mais comprimentos de onda e estima-se a

concentração de oxihemoglobina (HbO_2) e de desoxihemoglobina (Hb) levando em conta o espectro de absorção de cada uma (figura 3). A descoberta de neovascularização, hipoxia e isquemia são informações extremamente valiosas no diagnóstico de tumores, doenças vasculares e artrite que podem ser obtidas pela PAI empregando a hemoglobina como cromóforo [43, 12].

A compatibilidade com outras modalidades, especialmente as ópticas e as ultrasonografias, também é um benefício da PAI. As imagens PA podem ser sobrepostas às imagens originadas por outras técnicas a fim de se obter informações mais completas e precisas das amostras [42]. Além disso, pode-se destacar que os sistemas PAI são mais compactos e econômicos se comparados aos sistemas que utilizam radiação ionizante e aos que realizam ressonância magnética nuclear [43].

2.2.2.2 Instrumentação

As fontes de radiação eletromagnéticas empregadas nos sistemas PAI em geral são lasers pulsados capazes de fornecer pulsos monocromáticos, curtos e de alta potência. O tipo de laser é escolhido de acordo com o material que se deseja analisar de modo que o comprimento de onda emitido seja fortemente absorvido pela substância. Os mais usuais são o Q-switched Nd:YAG de nanosegundo, o Ti:Safira, os lasers de corantes e os lasers de diodo. Estes últimos permitiram o desenvolvimento de aparatos PAI mais compactos e econômicos [42].

Para a detecção das ondas ultrassônicas normalmente se empregam transdutores ultrassônicos (UST do inglês *ultrassound transducers*) receptores, equipamentos capazes de transformar perturbações mecânicas em perturbações elétricas que podem ser facilmente digitalizadas. Os UST mais empregados aos sistemas PAI são os piezoelétricos. A depender do sistema, os transdutores podem ser instalados sozinhos ou em arranjos com geometrias diversas. Conjuntos de transdutores fornecem imagens de melhor qualidade em um tempo muito menor, se comparados aos elementos únicos [43]. A escolha do UST influencia diretamente na resolução e na capacidade de penetração do sistema. Transdutores que captam ondas acústicas de altas frequências fornecem maior resolução espacial. Por outro lado, a capacidade de penetração do sistema diminui com o aumento da frequência central de detecção do transdutor devido ao aumento da atenuação acústica com a frequência [15]. O aumento da largura da banda de frequências que o transdutor está apto a coletar também refina a resolução. [76]

Além dos equipamentos utilizados para a irradiação da amostra e para a detecção do sinal ultrassônico os seguintes artefatos comumente compõem os sistemas PAI: um amplificador de sinal elétrico, um osciloscópio e um computador (figura 6). O amplificador é acoplado ao UST e, como comentado anteriormente, seu uso se faz necessário devido ao fato das ondas fotoacústicas apresentarem amplitudes baixas e serem muitas vezes

confundidas com os ruídos. Osciloscópios são utilizados em laboratório para digitalizar os sinais elétricos provenientes do transdutor e aparatos mais compactos com esta mesma função são empregados nos dispositivos PAI comerciais, desenvolvidos para a prática clínica. O computador controla as regiões que precisam se deslocar para o escaneamento, realiza a sincronização do escaneamento com a detecção e executa os algoritmos de geração das imagens [15, 42].

Os modos como são realizadas a iluminação óptica, a detecção ultrassônica e a geração computacional modificam as características das imagens PA obtidas e classificam os sistema PAI em diferentes técnicas. As principais formas de implementação da PAI são a tomografia fotoacústica (PAT do inglês *PhotoAcoustic Tomography*), também referida por tomografia fotoacústica computadorizada (PACT do inglês *PhotoAcoustic Computed Tomography*) e a microscopia fotoacústica (PAM do inglês *PhotoAcoustic Microscopy*)¹ [15, 16].

A PAT se destaca pela sua capacidade de fornecer imagens de estruturas biológicas internas ao tecido situadas distantes de sua superfície. Comumente a PAT apresenta resolução da ordem de $10^{-4}m$ e alcança camadas localizadas a alguns centímetros da superfície. Um sistema PAT típico mapeia a absorção óptica da amostra a partir da formação de imagens baseada na reconstrução, método similar ao utilizado na tomografia computadorizada convencional e na tomografia por emissão de pósitrons; os sistemas PAM usuais, por outro lado, em geral realizam o escaneamento focado. A PAM é indicada no estudo de estruturas orgânicas superficiais que não podem ser vistas a olho nu pois gera imagens de alta resolução (da ordem $10^{-6}m$) mas tem a capacidade penetração limitada a poucos milímetros [15, 16].

Cada um dos métodos serão discutido nas seções subsequentes e as principais diferenças entre os sistema PAM e PAT usuais estão resumidas na tabela 1.

2.2.2.3 Microscopia Fotoacústica

Em geral, os sistemas PAM mapeiam a absorção óptica com base no escaneamento focado, ou seja, tanto o feixe óptico quanto o detector realizam a varredura a passos curtos de pequenas regiões em torno do material estudado.

Para garantir que as imagens sejam geradas por escaneamento focado em um tempo razoável são empregados pulsos de lasers com alta taxa de repetição que podem chegar a centenas de megahertz [16]. Diferente da técnica PAT que emprega pulsos lasers com energia maior que 10mJ, a PAM geralmente utiliza pulsos com energia menores que 1mJ pois a região iluminada é muito pequena [42]. Os UST dos sistemas PAM apresentam abertura angular e largura de banda menores se comparados aos aplicados ao PAT.

¹ As referências [15], [15] e [42] utilizam o termo PACT para se referir ao que neste trabalho é denominado de PAT e o termo PAT para se referir a um grupo que engloba a PACT e a PAM.

Tabela 1 – Diferenças notáveis entre os sistemas PAT e PAM convencionais

	PAM	PAT
Modo de iluminação	Focado ou difuso	Difuso
Modo de detecção	Um transdutor ou um arranjo de transdutores	Um único transdutor
Ordem da resolução típica das imagens	Ordem de μm	Ordem de 0,1mm
Profundidade usualmente alcançada	Poucos mm	Poucos cm
Principais aplicações	Corpo inteiro de pequenos animais e órgãos humanos	Células, organelas e capilares
Agilidade no escaneamento de dada área	Lenta	Rápida

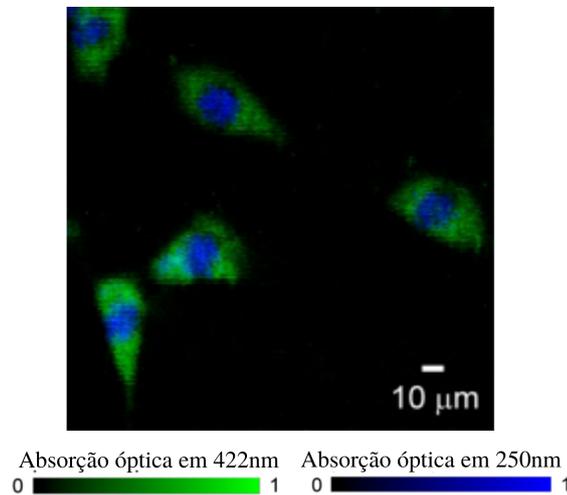
Fonte: Elaborada pela autora com base em [16], [24], [15], [44], [43], [42].

Se a resolução máxima do sistema PAM for determinada pelos componentes ópticos, classifica-se a técnica como microscopia fotoacústica de resolução óptica (OR-PAM do inglês *optical resolution photoacoustic microscopy*) já se o UST limita a resolução máxima, denomina-se a modalidade de microscopia fotoacústica de resolução acústica (AR-PAM do inglês *optical resolution photoacoustic microscopy*). Os aparatos da OR-PAM são equipados com lentes ópticas de forma que o feixe seja focalizado em minúsculas áreas da amostra com seu diâmetro podendo variar de alguns micrômetros a centenas de nanômetros, a depender da resolução espacial desejada [15]. A AR-PAM pode utilizar um feixe focalizado com grande diâmetro ou até mesmo difuso. Em geral a OR-PAM fornece maior resolução, enquanto que a AR-PAM permite a realização de imagens de camadas mais profundas dos tecidos. Por apresentar altíssima resolução superficial (da ordem de micrômetros ou até centenas de nanômetros), a OR-PAM é indicada para a obtenção de imagens de células e organelas e para a detecção de tumores pela avaliação da angiogênese de capilares [42]. A AR-PAM, por outro lado, foi bastante aplicada na análise de estruturas macroscópicas de pequenos animais.

A figura 7 trata-se da imagem de fibroblastos obtida por OR-PAM. A OR-PAM empregado continha um oscilador paramétrico óptico (OPO) e um UST com frequência central em 40MHz. Os agentes de contraste endógenos que viabilizaram a obtenção da imagem foram os citocromos contidos nos citoplasmas (em verde) e os ácidos nucleicos nos núcleos (em azul). Para ser absorvido pelos citocromos o OPO foi sintonizado em

422nm e em 250nm para os ácidos nucleicos. A amostra foi escaneada duas vezes, uma em cada comprimento de onda, e as duas imagens geradas foram sobrepostas para originar a imagem reproduzida na figura 7.

Figura 7 – OR-PAM de Fibroblastos.



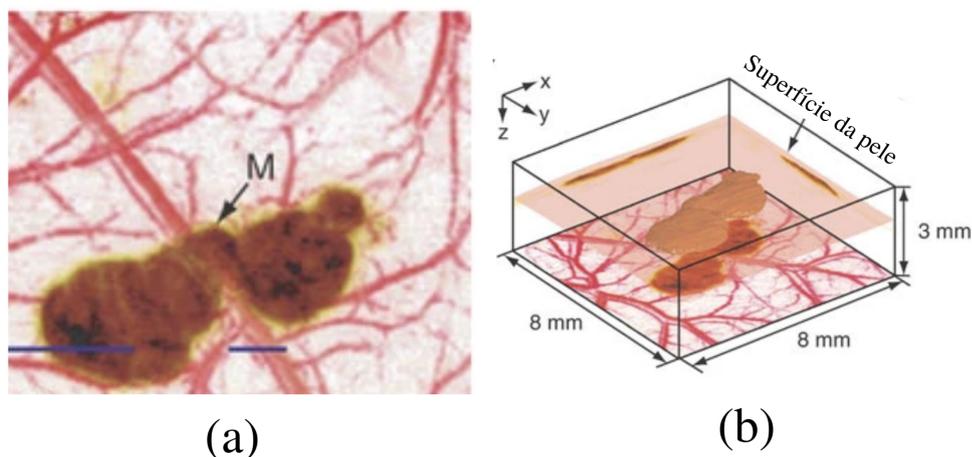
Fonte: Adaptado de [78].

A referência [76] expõe um sistema AR-PAM com capacidade de fornecer o mapeamento da absorção óptica em diversos comprimentos de onda e produzir imagens com resolução da ordem de dezenas de micrometros de regiões localizadas a alguns milímetros da superfície do tecido. Para tal, foram empregados um laser de corante pulsado sintonizável emitindo pulsos de 6ns e um UST com frequência central em 50MHz. A partir das imagens originadas pelo sistema podem ser obtidas informações funcionais além das anatômicas, por isto os autores referem-se ao mesmo por *functional photoacoustic microscopy* (fPAM), de animais e humanos *in vivo*. Combinando medidas realizadas com o laser operando em 584nm e 764nm, o sistema foi capaz de identificar um melanoma em um rato e localizá-lo através da construção de uma imagem tridimensional do tumor e dos vasos sanguíneos que o circundam 8. A figura 8 (a) representa uma projeção ortogonal da área escaneada, enquanto que a figura 8 (b) trata-se de uma superposição destas projeções para a visualização tridimensional do tumor, inferência do seu volume e profundidade na pele. A figura revela o grande potencial de aplicabilidade da AR-PAM no diagnóstico de câncer de pele.

2.2.2.4 Tomografia Fotoacústica

O método de formação de imagens baseadas na reconstrução, normalmente aplicado na PAT em geral forma a imagem sem a necessidade de grandes deslocamentos do feixe luminoso e dos detectores. Por outro lado, na formação da imagem por escaneamento focado, principal técnica aplicada aos sistemas PAM, os transdutores e os feixes percorrem toda a região de interesse da amostra.

Figura 8 – AR-PAM de Melanoma.



Fonte: Adaptado de [76].

A irradiação das amostras nos sistemas PAT em geral é feita por feixes de lasers pulsados e difusos, capazes de iluminar completamente o material a cada pulso. A alta potência da radiação é extremamente importante nesta modalidade pois além empregar feixes com grande diâmetro ela visa obter informações de camadas profundas dos tecidos biológicos [42]. Como não se faz necessário a varredura do laser por todo o campo de visão (FOV do inglês *field of view*) para a realização da PAT, os pulsos de lasers aplicados aos sistemas PAT em geral são mais longos e com menores taxas de repetição do que os utilizados nos sistemas PAM e isto não compromete a velocidade da geração da imagem na PAT.

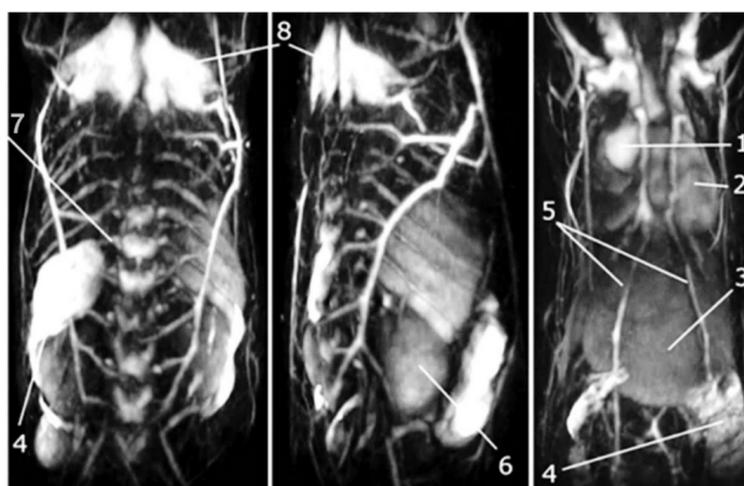
Para a captação das ondas ultrassônicas a PAT utiliza detectores de banda larga, ou seja, capazes de receber diversos comprimentos de ondas acústicas, e com um amplo ângulo de abertura para captar pulsos provenientes de diversas regiões. O sistema pode dispor de um único transdutor ou de um arranjo de transdutores e há necessidade de deslocamento em ambos os casos para a obtenção de uma amostragem de dados espacialmente densa. É fato que caminho a ser percorrido pelo elemento único é muito maior do que o associado ao conjunto de transdutores logo, gerar imagens utilizando o primeiro depende muito mais tempo, apesar da vantagem econômica. Por esta razão, pode-se dizer que os sistemas que operam com um único transdutor são adequados para estudos de amostras estáticas mas não para investigações de tecidos biológicos *in vivo* ou aplicações clínicas [16].

A fim de escanear as amostras completamente os detectores de ultrassom são deslocados na direção das coordenadas das geometrias esféricas, cilíndricas ou planares até percorrerem todo o FOV coletando os dados. A depender do aparato utilizado o FOV pode ser ter uma, duas ou três dimensões [15]. Os arranjos de transdutores empregados nos sistemas PAT com geometria esférica tem forma de arco ou de hemisfério oco. Nos casos de geometria cilíndrica, os arranjos têm em geral forma de anel e nos aparatos que

seguem geometria planar, os arranjos são lineares ou retangulares [16, 42].

Com o sistema PAT exposto na referência [79] foram realizadas imagens tridimensionais do corpo inteiro de ratos *in vivo* nas quais se podem localizar e diferenciar muito bem diversos órgãos (Figura 9). Os números 1 e 2 indicam o coração do animal, sendo 1 o átrio esquerdo e 2 os ventrículos. O 3 rotula o fígado, o 4 o baço, o 5 os vasos torácicos e o 6 um dos rins. O 7 indica a coluna e o 8 aponta para tecido adiposo. Para tal, foram utilizados pulsos de $10ns$ oriundos um OPO operando no comprimento de onda de $800nm$. A detecção das ondas fotoacústicas foram realizadas por um arranjo hemisférico contendo 256 transdutores ultrassônicos com frequência central de $4MHz$. A resolução espacial obtida por este sistema PAT varia de $250\ \mu m$ a $500\ \mu m$.

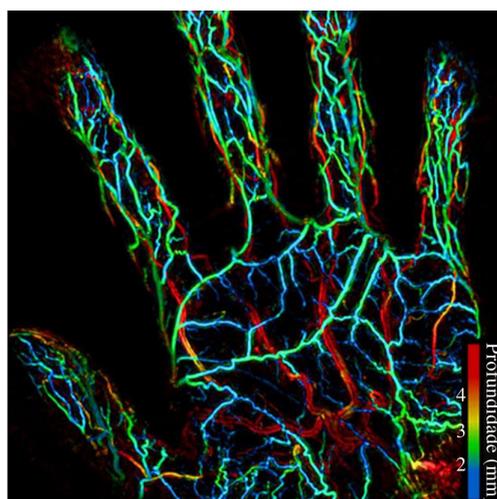
Figura 9 – PAT de corpo inteiro de rato de 3 ângulos distintos.



Fonte: Adaptado de [79].

A referência [80] discute a importância da análise morfológica de vasos sanguíneos periféricos no diagnóstico preventivo de diversas doenças tais como a arterosclerose, as varizes e a endocardite infecciosa. O artigo aponta os motivos pelos quais as modalidades de imagem usuais não são compatíveis com este tipo de estudo e indica a PAT como uma técnica adequada para tal análise mapeando a rede de vasos sanguíneos da palma da mão humana. A PAT foi capaz de gerar imagens tridimensionais de alta resolução de forma não invasiva e sem o uso de agentes de contraste exógenos das veias e artérias contidas na mão que permitiu a visualização das formas dos vasos e de suas localizações (figura 910). O sistema PAT utilizado contém um arranjo em formato hemisférico de transdutores ultrassônicos com frequência central em $2MHz$ e largura de banda de 70% e empregou pulsos lasers com comprimento de onda em $795nm$ para escanear a mão [80].

Figura 10 – PAT de palma da mão.



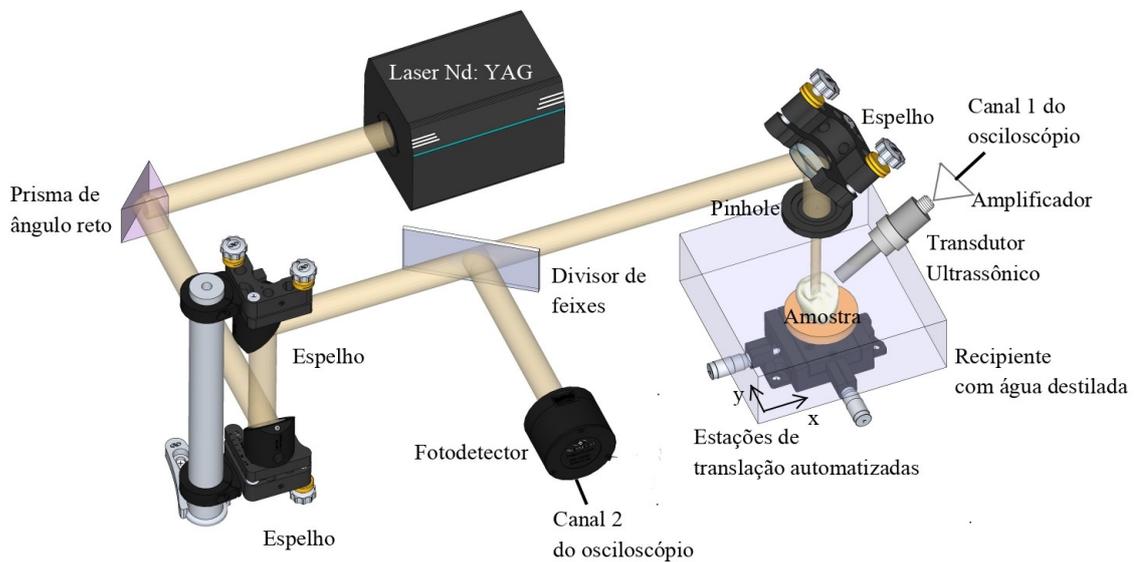
Fonte: Adaptado de [80].

3 DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE IMAGENS FOTOACÚSTICAS

3.1 DESCRIÇÃO DO APARATO EXPERIMENTAL

A figura 11 ilustra o aparato experimental desenvolvido para a geração de imagens fotoacústicas. O sistema é capaz de escanear superfícies de objetos, e fornecer mapas de contorno que associam a intensidade (distância vale-pico) do sinal fotoacústico à localidade onde o mesmo foi detectado.

Figura 11 – Diagrama do Sistema de Imagem Fotoacústica.



Fonte: [81]

A fonte de radiação pulsada consiste em um laser Q-switched Nd:YAG (Continuum Surelite II-10) que pode operar em 532nm ou 1064nm. Após ser emitido pelo laser, o feixe de aproximadamente 7 mm de diâmetro é refletido por um prisma de ângulo reto e levantado por espelhos, então passa por um divisor de feixe que o separa em duas partes: uma é desviada para atingir um fotodetector e a outra segue na mesma direção e passa por outro espelho. Este último elemento redireciona a radiação, a colocando para incidir na amostra, formando um ângulo de 90° com sua superfície. Antes de atingir a amostra, porém, o feixe ainda atravessa um pinhole de 1 mm para ficar com este diâmetro e garantir maior resolução à imagem.

O material a ser analisado deve ser encaixado em um suporte situado dentro de um pequeno reservatório de plástico transparente preenchido com água destilada (célula fotoacústica). O recipiente foi fixado sobre um arranjo de duas estações de translação (Thorlabs Z625(B), MTS50-Z8) capazes de o deslocar independentemente nas direções X-Y, permitindo que o feixe eletromagnético percorra todos os pontos da superfície da

amostra. A água tem o papel de melhorar o acoplamento acústico entre a amostra e o transdutor e diminuir a atenuação acústica. Isto ocorre porque a impedância acústica do ar é $4.10^2 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto que a da água é $1,5.10^6 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, muito mais próxima da impedância do material piezoelétrico contido no transdutor (da ordem de $10^6 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ou $10^7 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), bem das impedâncias associadas a amostras sólidas ou líquidas [82].

Para captar as ondas ultrassônicas e transformá-las em sinais elétricos, que podem ser lidos em um osciloscópio, foi utilizado o transdutor ultrassônico de imersão com frequência central em 5MHz (OLYMPUS V310-N-SU). Este foi posicionado a aproximadamente 1 cm da amostra, formando um ângulo de 45° com o feixe luminoso, de modo que ficou parcialmente submerso na água destilada. O transdutor foi acoplado a um amplificador de sinal de banda larga, produzido manualmente no laboratório, com ganho de 90,4, para garantir maior diferenciação entre o sinal fotoacústico e os ruídos. Após amplificados, os sinais são enviados ao canal 1 de um osciloscópio digital de 200MHz (Tektronix TDS 2024B). Ao canal 2 do mesmo equipamento, foi conectado o fotodetector a fim de sincronizar o sinal fotoacústico.

3.2 SOFTWARE PARA AUTOMAÇÃO DO ESCANEAMENTO E GERAÇÃO DA IMAGEM FOTOACÚSTICA

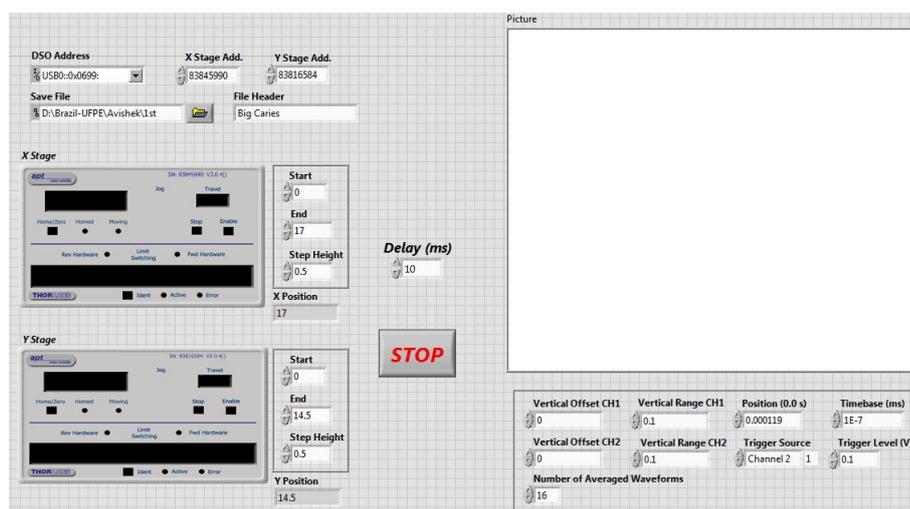
Para realizar o escaneamento das amostras e gerar imagens fotoacústicas de forma completamente automatizada foi desenvolvido um programa utilizando o Labview. O software conecta-se com os motores das estações de translação e com o osciloscópio. As informações obtidas a partir do último são utilizadas para a produção de imagens. As funções do programa são:

- Gerar uma matriz $m \times n$, onde m é o número de passos que a amostra percorrerá na direção X mais uma unidade e n é o equivalente para a direção Y;
- Controlar o movimento da estação de translação da direção X;
- Controlar o movimento da estação de translação da direção Y;
- Coletar o sinal fotoacústico gerado pela amostra em cada uma das localizações, calcular a distância vale-pico deste sinal e armazenar o valor no elemento da matriz correspondente a localização;
- Gerar um mapa de contorno das distâncias entre o pico e o vale do sinal fotoacústico distribuído espacialmente e salvar este gráfico.

Na interface do programa (Figura 12), o usuário deve primeiramente colocar as referências dos equipamentos a serem utilizados e escolher uma pasta para salvar a imagem que será originada assim como o nome do arquivo. Ele também precisará informar o quanto

o recipiente (com a amostra imersa em água) deve se deslocar e o tamanho do passo em cada uma das direções. Além disso, é necessário que ele forneça todas as especificações sobre escala, posição, canal, nível do trigger e forma de obtenção que são empregadas no osciloscópio para tornar o sinal visível de forma clara e completa.

Figura 12 – Interface do programa.



Fonte: [81].

De posse de todos os dados, o software começa a operar. São realizados n passos na direção X até que se percorra toda a extensão desejada pelo usuário, então é realizado um passo na direção Y, e mais n na direção X, o processo se repete até que o alcance máximo especificado para Y também tenha sido contemplado, ou seja, toda a região delimitada do plano X-Y tenha sido varrida. A cada deslocamento a distância vale-pico do sinal fotoacústico é salva como o elemento associado à respectiva posição de uma matriz bidimensional. Após o escaneamento completo da amostra, a matriz é plotada como um gráfico de contorno colorido.

3.3 TESTES PARA AVALIAÇÃO DO SISTEMA

3.3.1 Testes com Rodamina 6G: avaliação da resposta do sistema a coeficientes de absorção óptica distintos

3.3.1.1 Altas concentrações

3.3.1.1.1 Materiais e métodos

Para aferir a capacidade do sistema de diferenciar de valores distintos de energia óptica absorvida, ou seja, distinguir coeficientes de absorção óptica, foram realizados alguns testes com soluções de Rodamina 6G (Rh 6G) em etanol.

A Rh 6G é um corante orgânico de baixo custo comumente utilizado na indústria têxtil. A substância também é bastante empregada em pesquisas nas áreas de Física e

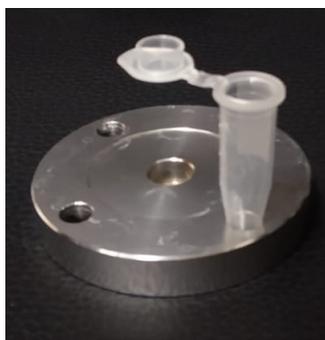
Química, destacando-se seu uso como meio de ganho em lasers de corante. As soluções de Rh 6G foram escolhidas como amostras para a realização dos testes porque o corante absorve fortemente na região de emissão do segundo harmônico do laser Q-switched Nd:YAG ($\lambda = 532nm$). O solvente etanol foi escolhido devido ao baixo custo e a alta solubilidade (80g/L) da Rh 6G no mesmo [83].

Quatro pequenas mudanças foram realizadas no sistema original para a realização deste teste:

- a célula fotoacústica foi modificada para um recipiente de acrílico maior e mais transparente à luz;
- os espelhos cujas funções eram levantar e abaixar o feixe não foram utilizados e o feixe passou a incidir nas paredes acrílicas do recipiente, a fim de atingir a amostra em uma direção paralela ao solo;
- o transdutor foi posicionado dentro da célula fotoacústica, completamente submerso e também paralelo ao solo, formando um ângulo de 90° com o feixe de luz;
- o amplificador utilizado não foi o amplificador descrito anteriormente, pois este ainda não havia sido finalizado. Empregou-se, então, um outro amplificador feito artesanalmente que apresentava ganho igual a 36.

Para acondicionar a amostra, um microtubo de eppendorf graduado e com capacidade 0,5 mL foi encaixado em um suporte de aço inox (figura 13). Este suporte foi acomodado no reservatório de acrílico que foi preenchido parcialmente com água destilada, de forma que a água não atingisse a parte superior do eppendorf.

Figura 13 – Suporte eppendorf.



Fonte: Elaborada pela autora.

O recipiente de acrílico (célula fotoacústica) foi posicionado de modo que o feixe do laser atingisse a região lisa (sem marcas de graduações) do eppendorf após atravessar as paredes de acrílico. Para encontrar o posicionamento ótimo da amostra, movimentou-se o suporte do eppendorf (preenchido com uma solução de Rh em etanol) com relação ao

feixe do laser até que o sinal fotoacústico observado no osciloscópio apresentasse apenas um pico e um vale estreitos em destaque. O eppendorf permaneceu imóvel, parcialmente submerso e aberto durante a realização de todos os testes.

A preferência do eppendorf, frasco de polipropileno, em detrimento das cubetas de vidro se deu pelo fato de que o plástico apresenta um melhor acoplamento acústico com a água. O sinal fotoacústico observado quando o analito era colocado em uma cubeta de vidro apresentou vários picos, associados às diversas reflexões das ondas acústicas nas paredes da cubeta. As ondas acústicas refletidas geraram interferências e criaram padrões complicados de se analisar. Por outro lado, o sinal fotoacústico verificado quando o analito era colocado no frasco plástico bem posicionado apresentava apenas um pico e um vale em destaque (figura 14), como mencionado. O tamanho do eppendorf foi selecionado levando em conta a economia da amostra, assim, utilizou-se o menor frasco disponível que permitisse que o laser atingisse a amostra sem sofrer desvios.

O laser Q-switched Nd:YAG foi posto a operar no segundo harmônico ($\lambda=532$ nm), recebendo uma diferença de potencial de 1,25 kV e emitindo pulsos de 5 ns a uma taxa de repetição de 10 Hz. A energia óptica média dos pulsos foi medida na região onde a amostra foi acomodada (com a célula fotoacústica vazia), resultando em um valor de aproximadamente 0,7 mJ.

O sinal fotoacústico de 6 soluções de Rh 6G em etanol com concentrações de $1,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$; $5,71 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$; $1,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; $2,06 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; $1,20 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ e $2,13 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ foi gravado pelo sistema. Para alterar a concentração da amostra sem mover o eppendorf, iniciou-se medindo a amostra mais diluída, e posteriormente foram adicionadas, com o auxílio de uma pipeta, gotas de uma outra solução concentrada de Rh em etanol, até que se alcançassem as concentrações desejadas.

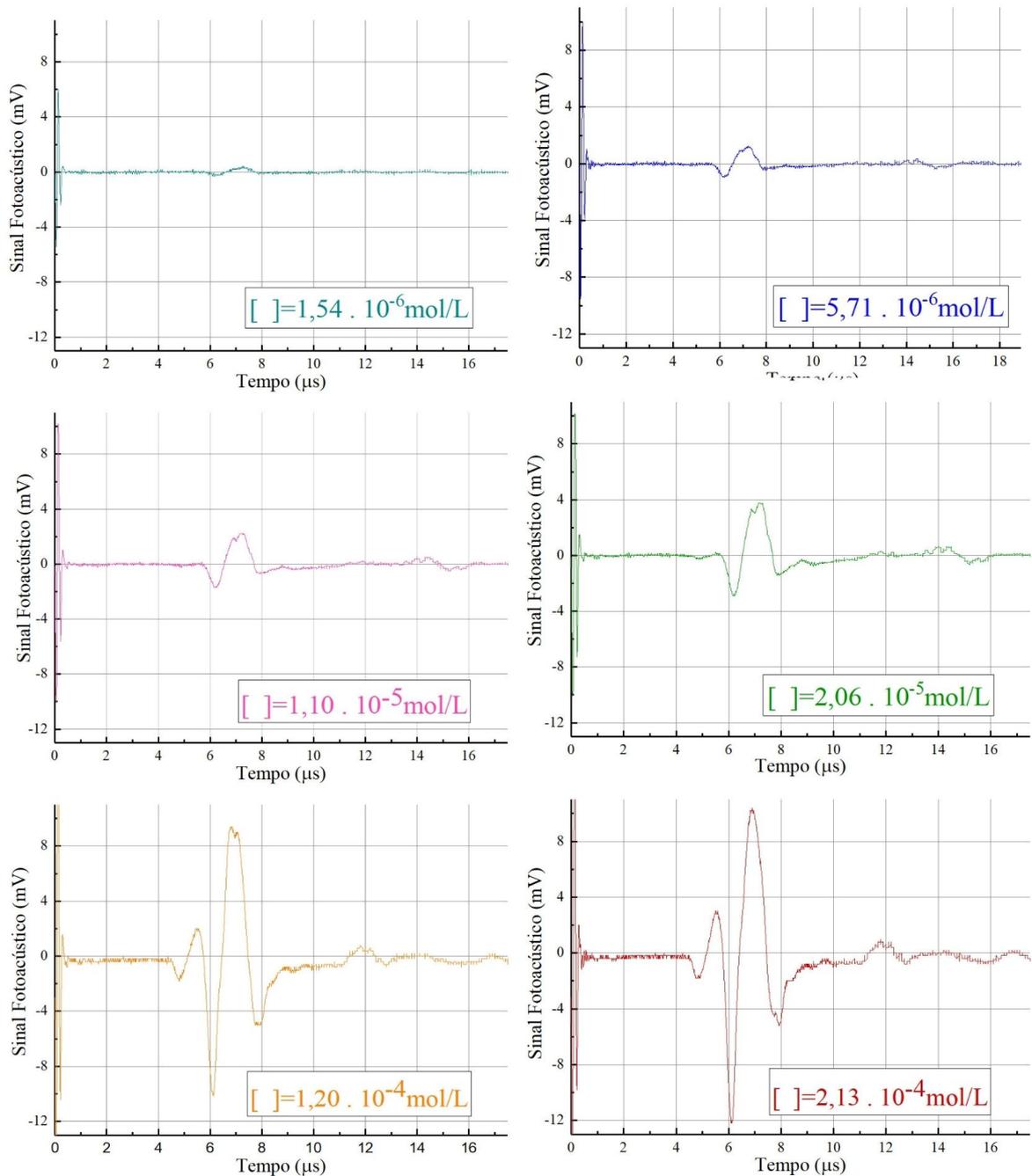
Para fins de comparação foi realizada a espectrometria de absorção óptica das amostras com um espectrofluorímetro do modelo Fluoromax da Horiba. Os espectros obtidos são apresentados na figura 15. O equipamento calcula a absorbância a partir da diferença entre a energia fornecida por uma lâmpada e a energia que atravessou a amostra (extinção). Como a Rh 6G praticamente não é espalhadora, o cálculo da absorbância a partir da extinção pode ser realizado sem problemas.

Para uma melhor análise, as distâncias entre o pico e o vale de cada um dos sinais fotoacústicos foram plotadas em função das concentrações das amostras. As alturas dos picos de absorção dos espectros de absorção também foram plotadas em função das concentrações.

3.3.1.1.2 Resultados

Os sinais fotoacústicos gerados pelas 6 soluções de diferentes concentrações de Rh em etanol são mostrados na figura 14.

Figura 14 – Sinais fotoacústicos gerados por soluções de Rh 6G a diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar que os vales e picos ocorreram no mesmo tempo para todas as concentrações. Sabe-se que atraso temporal de um pulso fotoacústico com relação ao pulso laser é exatamente o tempo que a onda acústica leva para viajar do local onde foi gerada

até o detector. Assim, a coincidência nas localizações dos picos e vales indica que a mesma região espacial (irradiada pelo laser) das amostras gerou o pulso acústico detectado em todos os casos. Também fica evidente nos gráficos o crescimento da amplitude do pulso acústico com o aumento da concentração. Isto ocorre porque uma solução mais concentrada de Rh 6G absorve mais energia óptica que aquece a região irradiada a um valor mais alto de temperatura, e gera uma variação de pressão (pulsos fotoacústicos) mais intensa.

Os espectros de absorção das soluções são apresentados na figura 15.

Como esperado, são observados picos de absorção em torno de 530 nm que crescem à medida que a concentração da solução aumenta. Comparando o gráfico fotoacústico da solução concentração $1,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ com o espectro de absorção da mesma, observa-se uma pequena ondulação na região do sinal no primeiro, enquanto que não se pode distinguir o pico de absorção dos ruídos no segundo. Então, pode-se dizer que a técnica fotoacústica foi mais sensível a baixas concentrações.

O gráfico das distâncias entre o pico e o vale dos sinais fotoacústicos em função da concentrações é apresentado na figura 16. Pode-se observar uma relação linear para as 4 amostras mais diluídas. As soluções com concentrações da ordem 10^{-4} mol/L revelam um comportamento diferente, evidenciando uma possível saturação do sistema fotoacústico para tais valores de concentração. A fim de melhor explorar a região de comportamento linear deste sistema, serão discutidas, na próxima, seção mais algumas medidas de sinais fotoacústico gerados por soluções com concentrações da ordem de 10^{-7} mol/L .

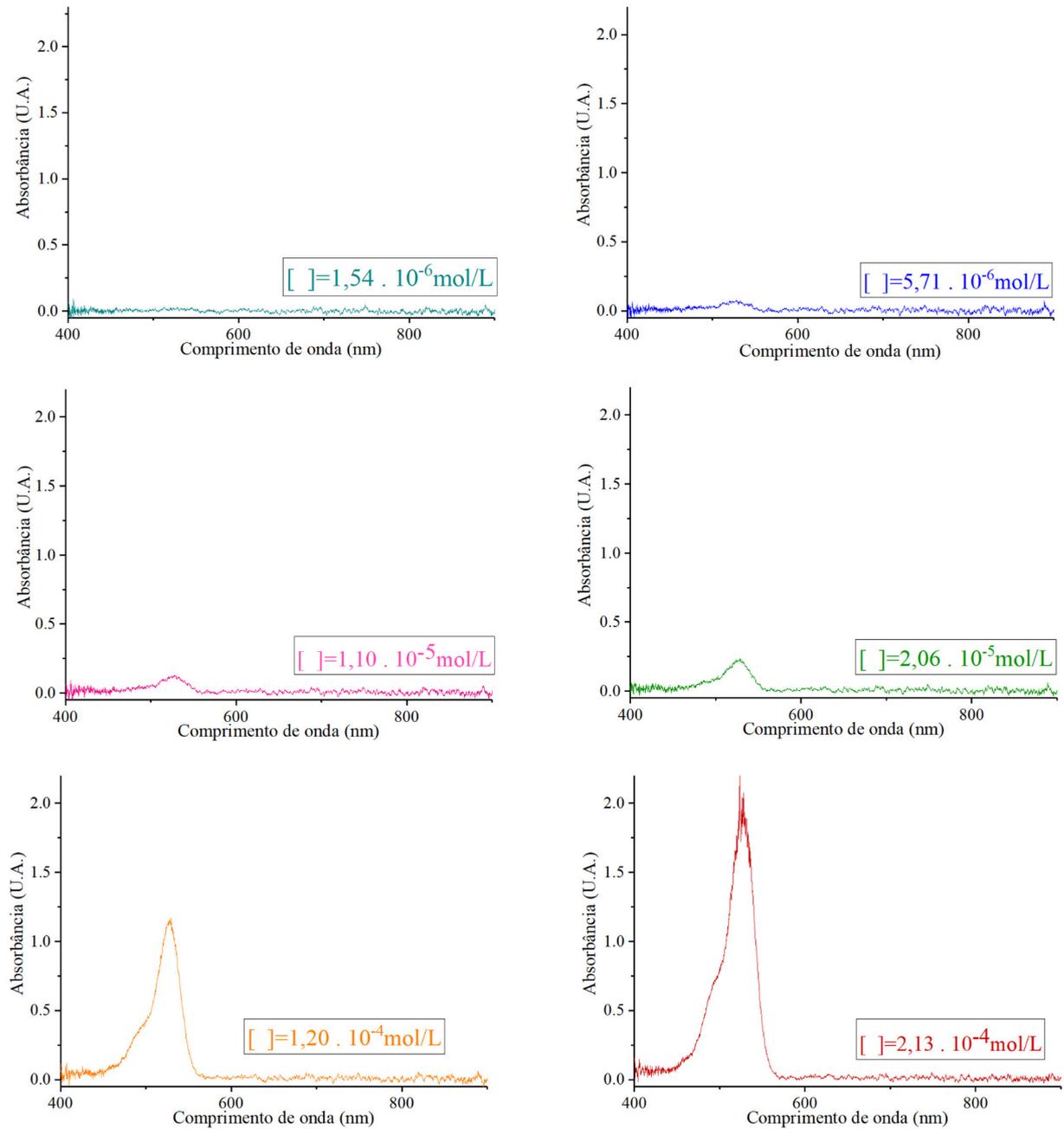
A figura 17 mostra o gráfico da absorbância máxima em função da concentração das soluções. A partir do mesmo, constata-se a relação linear entre as concentrações e o pico de absorbância, indicando não haver saturação no sistema espectrométrico até a concentração de $2,13 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.

3.3.1.2 Baixas concentrações

3.3.1.2.1 Materiais e métodos

Para melhor analisar a região de comportamento linear do sistema fotoacústico bem como sua alta sensibilidade foram realizados os mesmos testes com 8 soluções de Rh 6G em etanol com concentrações da ordem de 10^{-7} mol/L . A potência do laser também foi diminuída pela modificação da voltagem na qual a lâmpada de flash do equipamento era submetida. Desta vez a voltagem utilizada foi 1.15 kV que gerou uma energia óptica média

Figura 15 – Espectros de absorção óptica de soluções Rh 6G a diferentes concentrações.

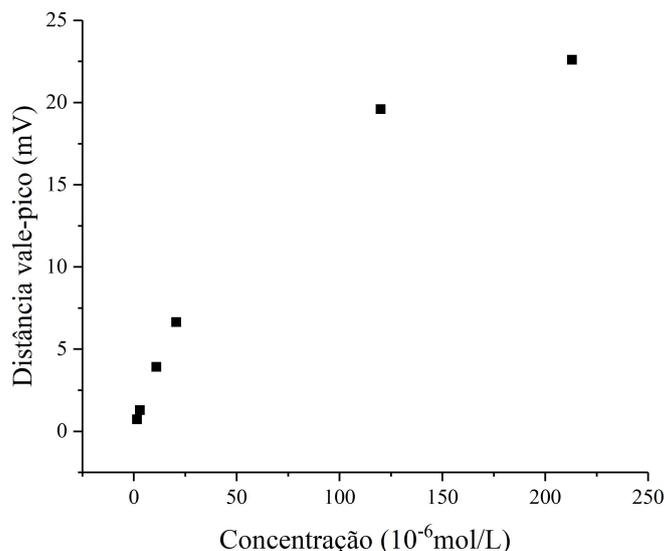


Fonte: Elaborada pela autora.

de aproximadamente 0,3 mJ nas regiões irradiadas das amostras. O laser permaneceu emitindo pulsos de 5 ns a uma taxa de repetição de 10Hz.

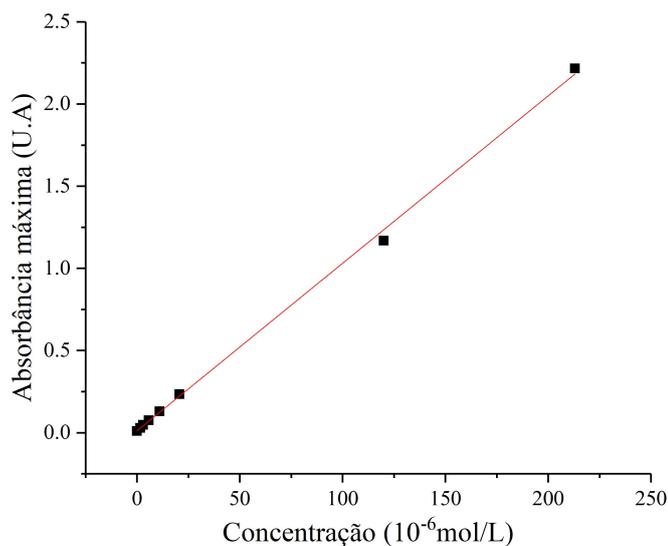
Nestes experimentos eram esperadas menores amplitudes dos sinais fotoacústicos, pois os sinais foram gerados por soluções de concentrações muito mais baixas irradiadas por um feixe de menor energia. Assim, para que fosse possível diferenciar os sinais dos ruídos, foi utilizado o amplificador com ganho igual a 90,4. Todos os outros parâmetros

Figura 16 – Concentração x Distância vale-pico do sinal fotoacústico.



Distância vale-pico dos sinais fotoacústicos gerados por 6 soluções de Rh 6G em etanol em função de suas concentrações. Observa-se saturação. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 – Concentração x Absorbância máxima.



Pico de absorbância de 6 soluções de Rh 6G em etanol em função de suas concentrações. Fonte: Elaborada pela autora.

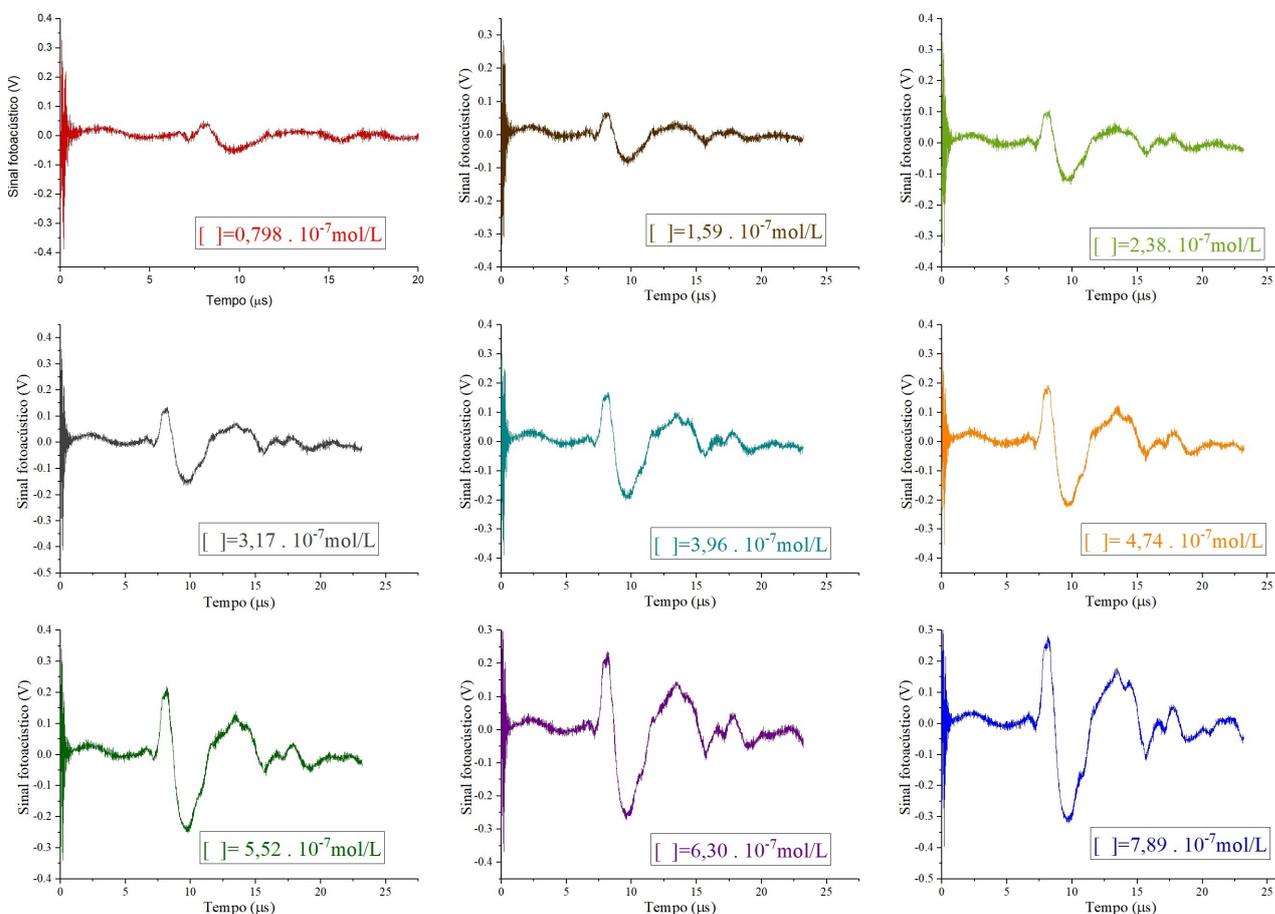
do sistema foram mantidos idênticos aos do conjunto de testes com altas concentrações, descritos na seção anterior.

Sob tais condições foram gravados os sinais fotoacústicos de cada uma das soluções. A distância vale-pico dos sinais fotoacústicos foi plotada em função das concentrações..

3.3.1.2.2 Resultados

Os sinais fotoacústicos gerados pelas 9 soluções de Rh 6G em etanol com diferentes concentrações são apresentados na figura 18.

Figura 18 – Sinais fotoacústicos gerados por soluções de Rh 6G a diferentes concentrações - baixíssimas concentrações.

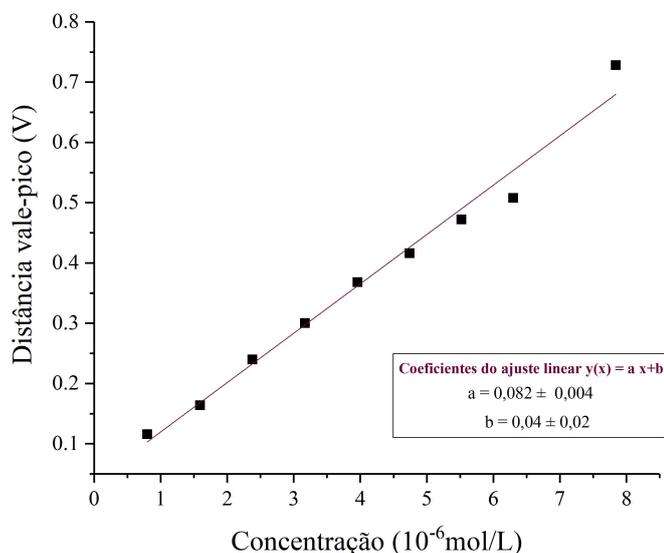


Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados revelam a sensibilidade do sistema PA para detectar Rh a baixíssimas concentrações, ou seja, de identificar absorções ópticas muito fracas. Na referência [83], o valor medido para o coeficiente de absorção óptica molar de soluções de Rh em etanol, no comprimento de onda 532 nm, foi $6,4 \cdot 10^{-4} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Tomando este valor como base, conclui-se que o sistema detectou uma amostra com coeficiente de absorção óptica da ordem de 10^{-3} cm^{-1} , uma vez que foi possível captar o sinal fotoacústico gerado pela solução com concentração igual a $0,798 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. É importante salientar que espectrofluorímetro não constatou absorbância nem mesmo na solução mais concentrada deste grupo de amostras. Também deve ser ressaltado que o sistema pode se tornar ainda mais sensível pelo aumento da potência do laser.

A figura 19 mostra o gráfico das distâncias entre o pico e o vale dos sinais fotoacústicos em função das concentrações das amostras geradoras. Como esperado, há uma proporcionalidade direta entre as duas grandezas. Fica evidente que de posse do conhecimento das constantes que regem a proporcionalidade, é possível estimar de forma simples e direta a concentração de uma solução a partir de seu sinal fotoacústico.

Figura 19 – Concentração x Distância vale-pico do sinal fotoacústico - baixíssimas concentrações.



Distância vale-pico dos sinais fotoacústicos gerados por 9 soluções de Rh 6G em etanol em função de suas concentrações. Observa-se um comportamento linear. O resultado evidencia a capacidade do sistema de detectar absorções ópticas muito fracas. Fonte: Elaborada pela autora.

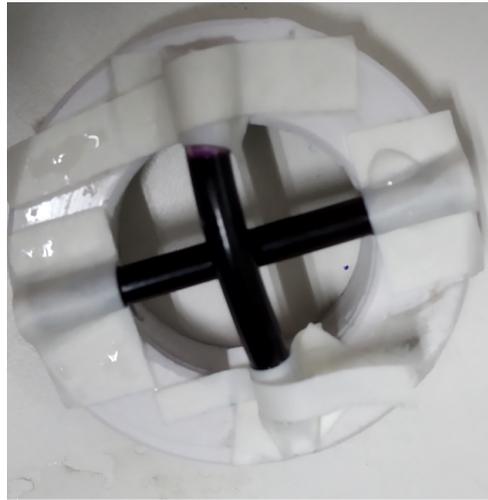
3.3.2 Testes com tubo de caneta: avaliação da capacidade de mapeamento do sistema

3.3.2.1 Materiais e métodos

A capacidade do sistema de mapear pontos de diferentes coeficientes de absorção ópticas distribuídos espacialmente foi avaliada através de um teste simples e rápido. Para a realização deste teste foi construída uma amostra com um suporte de PVC redondo e vazado de raio aproximadamente 4 cm e um tubo de caneta cheio de tinta. Dois pedaços de aproximadamente 4 cm foram cortados do tubo de caneta e suas pontas foram seladas com resina acrílica para que a tinta não escapasse. Os dois pedaços do tubo foram colados ao suporte com fita dupla face de modo que formasse uma cruz na região central do mesmo (figura 21).

O suporte foi posicionado dentro da célula fotoacústica preenchida com água destilada formando 90 graus com o feixe luminoso. Realizou-se então o escaneamento da parte interna do suporte a passos de 0,5mm tanto na direção x quanto na direção y. Durante todo o escaneamento, o laser permaneceu emitindo pulsos de 5 ns a uma taxa de repetição de 10Hz no comprimento de onda 532 nm.

Figura 20 – Amostra construída com tubo de caneta para teste de mapeamento.

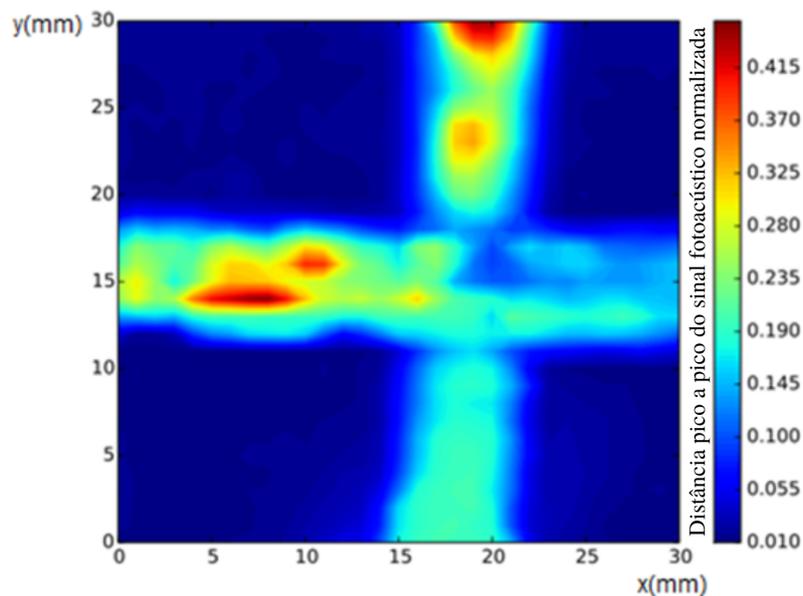


Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.2.2 Resultados

Após o escaneamento imagem mostrada na figura 21 foi então obtida.

Figura 21 – Resultado do teste de mapeamento fotoacústico com tubo de caneta.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na imagem podemos ver claramente a cruz formada pelos tubos de caneta, indicando que o sistema é capaz de mapear regiões de absorções ópticas distintas. São observadas uma distribuição irregular da absorção óptica na região onde havia tinta. A maior absorção na região central com relação às bordas é decorrente do fato de que no centro há maior concentração de tinta do que nas bordas. Há também irregularidades aleatória, supõem-se que estas são devido a distribuição não homogênea da tinta no interior do tubo.

4 APLICAÇÃO EM ODONTOLOGIA: SISTEMA PAI NA DETECÇÃO DE CÁRIE INCIPIENTE

Este capítulo abordará brevemente uma aplicação do sistema de imagens fotoacústicas (PAI) descrito no capítulo 3 na área de odontologia. O sistema foi utilizado para a geração de imagens fotoacústicas de dentes em 3 estados de saúde: hígido, com cárie incipiente e com cárie avançada. Os experimentos visavam avaliar a viabilidade do uso da fotoacústica para diagnóstico odontológico, com destaque para o diagnóstico da cárie incipiente. Os ensaios aqui expostos foram realizados principalmente por Evair Josino da Silva, Graduado e Mestre em Odontologia, e são discutidos em maiores detalhes na sua dissertação de mestrado, defendida e aprovada em 20 de fevereiro de 2020 [81]. Os resultados apresentados neste capítulo também deram origem a um artigo que foi submetido e está, na íntegra, no anexo 1 desta dissertação.

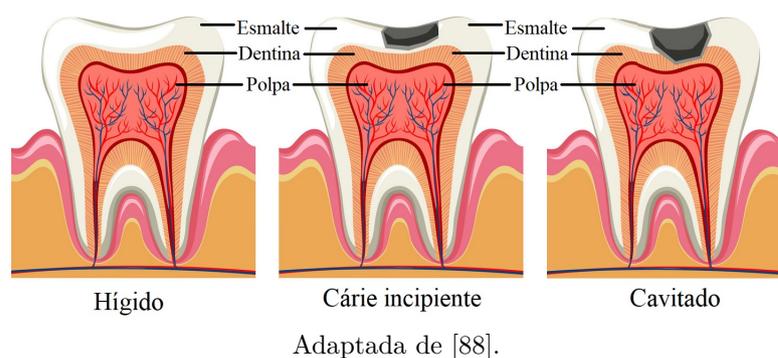
4.1 CÁRIE INCIPIENTE

Segundo estimativas realizadas por pesquisadores da King's College London [84], em 2015 34% da população mundial apresentava cárie não tratada em ao menos um de seus dentes permanentes. Tal dado confirma que a cárie é a doença odontológica mais prevalente globalmente, e ressalta a importância da sua prevenção, seu diagnóstico e seu tratamento. A patologia consiste fundamentalmente em lesões nos tecidos dentários duros (esmalte, dentina e cemento), decorrentes de um desequilíbrio químico local. Ocorre que bactérias (predominantemente a espécie *Lactobacillus casei*), presentes na cavidade oral, realizam o processo de fermentação, utilizando carboidratos remanescentes da alimentação do indivíduo, e produzindo ácidos orgânicos. Os ácidos intensificam o processo de desmineralização que corriqueiramente acontece no esmalte, de forma que a remineralização natural não seja mais suficiente para manter o equilíbrio. Então, o tecido perde miligramas de minerais de sua estrutura. Quando a perda ocorre de forma progressiva em uma certa região do esmalte, desencadeia-se o processo deterioração dos materiais orgânicos e inorgânicos presentes na dentina, o que leva ao surgimento de cavidades no dente [22]. Caso não haja a intervenção de um profissional de odontologia neste estágio, o quadro evolui para a completa destruição do dente e a infecção da polpa e dos tecidos de suporte [85, 86, 87].

Se a lesão ocorre apenas no tecido mais externo do dente, o esmalte, diz-se que o paciente tem uma cárie incipiente, também denominada de mancha branca, devido ao seu aspecto visual. Por outro lado, se a lesão atinge a dentina, o dente é dito cavitado, com cárie avançada ou simplesmente cariado (Figura 22). O tratamento empregado neste último caso é a restauração, visto que o processo cariogênico não poderá ser estacionado de outra forma. A restauração é um procedimento invasivo, com desgaste dentário e muitas

vezes bastante doloroso. Em contrapartida, a cárie incipiente pode ser estacionada, ou até mesmo revertida, por fluoroterapia e aplicações de selantes, que são procedimentos simples, não invasivos, não dolorosos e que não acarretam perdas de tecido dentário. Assim, a principal preocupação dos dentistas com relação à cárie deve ser identificá-la precocemente [86].

Figura 22 – Estágios da cárie.



Os métodos de diagnóstico de cárie mais empregados atualmente são a radiografia convencional, a inspeção visual e a inspeção tátil. Em geral, a radiografia convencional e a inspeção tátil não são capazes de detectar lesões no esmalte, além disso, ambas apresentam ônus relevantes: a primeira é um processo que utiliza radiação ionizante, já a segunda é um processo invasivo que pode desgastar o tecido dentário. A inspeção visual, se realizada por profissionais experientes, pode diagnosticar alguns tipos de cáries incipientes, um vez que o único sintoma da doença é a aparição de manchas brancas na superfície dentária. Por outro lado, tal técnica deixa muito a desejar em termos de precisão e acurácia [86].

Como consequência do exposto acima, houve nas últimas décadas um grande interesse dos profissionais de ciências, tecnologia e saúde no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de cáries incipientes. Foram, então, elaborados métodos avançados para a detecção da doença, tais como: as radiografias digitais, a transiluminação por fibra óptica, a tomografia por coerência óptica, a medida de condutividade elétrica e a detecção ultrassônica de cáries [86].

Apesar de nos últimos anos as técnicas PAI, discutidas no capítulo 2, terem sido amplamente exploradas, revelando excelentes resultados no diagnóstico de tecidos moles, são encontrados poucos estudos acerca de aplicações dessa modalidade para a avaliação de tecidos duros. O número de publicações diminui ainda mais se a área de interesse for restrita à odontologia. Dentre estas, encontram-se os artigos de Cheng at al. [17], Kim at al. [18], Koyama at al. [19], Hughes at al. [20] e Li at al. [21] que discutiram a aplicação da fotoacústica no diagnóstico da cárie, desenvolveram sistemas fotoacústicos capazes de detectar diferenças entre tecidos dentários saudáveis e cariosos, e apresentaram resultados promissores.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Diante do exposto acima, realizou-se, com o aparato PAI descrito no capítulo 3, escaneamentos de dentes humanos *ex vivo* a fim de detectar cáries. Os ensaios foram realizados sob a autorização do Comitê de Ética em Pesquisas Humanas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil em acordo com a declaração de Helsinque.

4.2.1 Obtenção, classificação e manipulação das amostras

Foram obtidos do banco de dentes do Centro Universitário Tabosa de Almeida, (Caruaru, Pernambuco, Brasil) vários dentes molares permanentes extraídos. Um grupo de dentistas experientes classificou-os, segundo os critérios do Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cáries [89], em três grupos: hígidos, cáries incipientes e cáries avançadas. Cinco exemplares de cada grupo foram selecionados como amostras para este estudo.

Para garantir um encaixe adequado no suporte do aparato fotoacústico, os dentes foram incluídos em resina autopolimerizável incolor, com o auxílio de uma matriz. Apenas as coroas dentárias se mantiveram expostas, e as superfícies oclusais dos dentes foram posicionadas paralelas ao solo. Até o último teste ser realizado, todas as amostras foram imersas em água deionizada e acondicionadas em um refrigerador, enquanto não estavam sendo escaneadas, com o intuito de protegê-las de fraturas e rachaduras.

4.2.2 Realização dos experimentos

O aparato utilizado para a realização dos experimentos está descrito na seção 3.1. A potência do laser foi controlada de forma que, ao atingir a superfície do dente, a fluência óptica dos pulsos não ultrapassasse $17mJ/cm^2$. Este valor está em conformidade com a American National Standards Institute (ANSI) que, na publicação “ANSI Z136.1 – 2004 Safe Use of Lasers standard” [90], recomenda a taxa de fluência óptica máxima de $20mJ/cm^2$. O laser operou emitindo pulsos de 5 ns a uma taxa de repetição de 10Hz.

Realizou-se varreduras, movendo as estações de translação manualmente, da superfície oclusal dos 15 dentes, a fim de constatar variação de sinal fotoacústico nas regiões cariosas. Constatou-se que, quando o laser incidia exatamente na lesão, o sinal fotoacústico (visualizado no osciloscópio) era muito mais intenso se comparado com o sinal das regiões saudáveis. Selecionou-se, então, um dente de cada grupo para a geração das imagens fotoacústicas. Foram produzidas duas imagens fotoacústicas de cada um dos dentes: uma com o laser emitindo em 532 nm e outra em 1064 nm. Empregou-se, tanto para a direção X quanto para a Y, o tamanho do passo de 0.5 mm e o deslocamento total de 30 mm. Assim, toda a superfície oclusal do dente foi percorrida pelo conjunto laser-detector. Para

se calcular a distância pico a pico em cada um dos passos, utilizou-se a média temporal de 16 sinais mostrados no osciloscópio. As imagens originadas nestes testes serão apresentadas na seção 4.4.1.

Uma pequena modificação no aparato experimental foi arquitetada para a realização de outro tipo de teste. Estes visavam estimar a propagação das ondas fotoacústicas (com pulsos de excitação de 532 nm e 1064 nm) nos tecidos dentários. Para isto, a posição do transdutor foi alterada de modo que o mesmo formasse 90° com o feixe incidente. Com o auxílio de uma estação de translação, o transdutor foi deslocado verticalmente para baixo em passos de 1 mm a partir do topo do dente. Os dentes com cáries incipientes foram posicionados no plano X-Y de modo que o feixe incidisse na região da lesionada e o detector ficasse bem próximo a mesma. Nesta modalidade, o vasilhame com água destilada contendo a amostra não se deslocava. Para fins de comparação, as mesmas medidas foram realizadas em um dente saudável. O sinal referente a cada uma das posições foi salvo, a distâncias pico a pico destes sinais foram plotadas em gráficos que serão apresentados na seção 4.4.2.

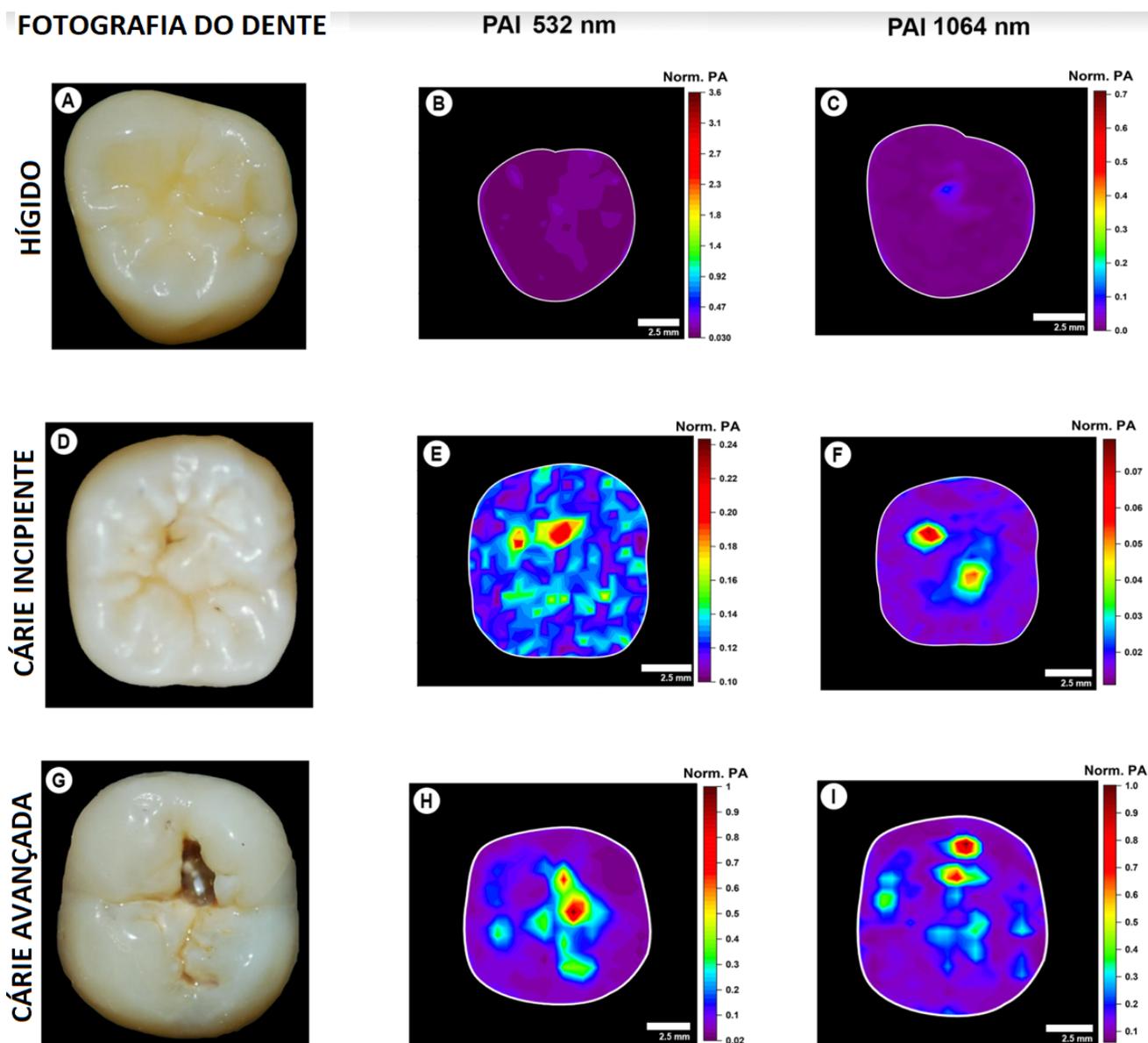
4.3 RESULTADOS

4.3.1 Imagens Fotoacústicas

As imagens geradas com ambos comprimentos de onda de um exemplar de cada grupo (hígido, cárie incipiente e cárie avançada) são apresentadas na figura 23. Para o entendimento do efeito da cárie na imagem fotoacústica, os dados de todas as amostras foram normalizados, tomando como máximo a maior intensidade de sinal do dente cariado. A linha sólida branca foi feita manualmente a fim de simular o contorno do dente.

Observa-se que, para ambos os comprimentos de onda, as imagens dos dentes saudáveis (Figuras 23 B e 23 C) apresentam apenas variações de cores sutis, ou seja, as amplitudes dos sinais fotoacústicos, associados às diferentes partes da face oclusal, se mantêm praticamente constante em toda a superfície dentária. Em oposição, os mapas das amostras portadoras de cáries incipientes e avançadas (Figuras 23 E, F, H, e I) revelaram áreas vermelhas e alaranjadas, referentes a locais onde os sinais fotoacústicos apresentam um notável aumento. As regiões destacadas coincidem com os locais onde havia lesões cariosas, segundo os dentistas. Tais resultados estão em acordo com os obtidos por Kim et al. em 2016 [18]. Para fins de comparação, os 3 dentes foram diagnosticados através de radiografias digitais e tomografias por coerência óptica. Os resultados destes diagnósticos podem ser encontrados no anexo 1 e na referência [81].

Figura 23 – Imagens Fotoacústicas de dentes em diferentes estados de saúde.



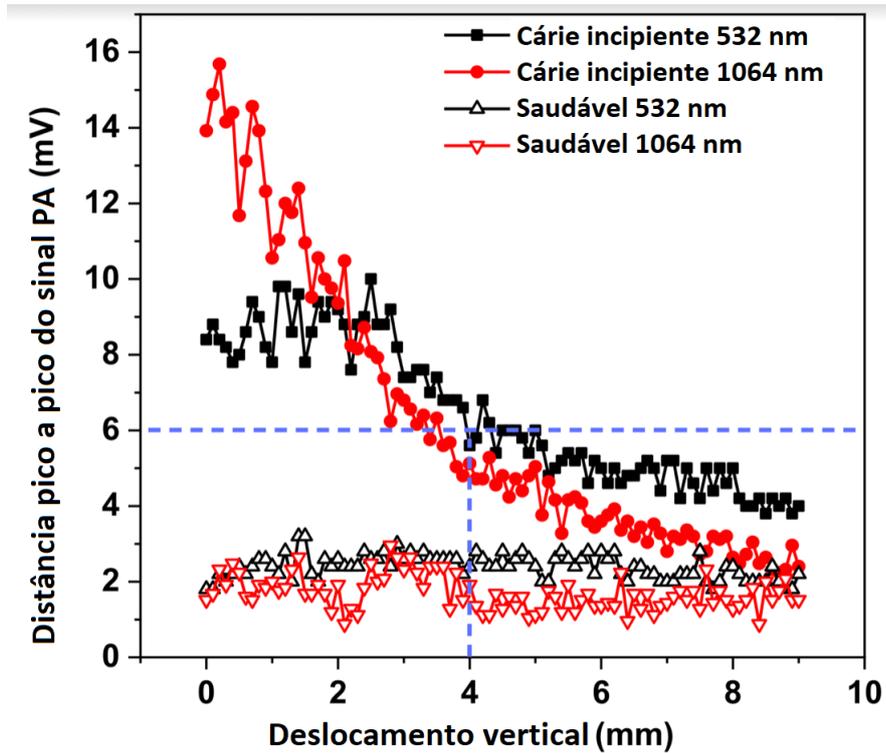
Fonte: [81].

4.3.2 Avaliação da propagação da onda PA no tecido dentário

As distâncias pico a pico dos sinais fotoacústicos gerados por regiões saudáveis e com cáries incipientes, empregando ambos os comprimentos de onda, foram plotadas em função da localização do detector. Os gráficos obtidos são mostrados na figura 24.

O zero refere-se ao detector posicionado na altura da superfície do dente. As demais distâncias indicam o quão abaixo da superfície do dente o detector estava. Como esperado, as regiões saudáveis não geraram sinais fotoacústicos notáveis em nenhum comprimento de onda. As regiões com lesão de cárie incipiente apresentaram sinais fotoacústicos bastante intensos, como pode ser visto pelos pontos próximos ao zero, associados ao detector posicionado na altura da superfície. Ao abaixar o detector ainda pôde-se observar sinal, indicando

Figura 24 – Intensidade do sinal fotoacústico x Posição do detector.



Fonte: [81].

que as ondas fotoacústicas geradas na superfície pela cárie incipiente se propagaram para o interior do dente. Estimou-se, a partir do gráfico, que após 4 mm ainda era possível detectar sinais com valores de intensidades 40 % acima do ruído. Este resultado aponta para a possibilidade de detecção de absorvedores localizados no interior do dente por meio da técnica fotoacústica.

5 CONCLUSÃO

O efeito fotoacústico é a base de poderosas técnicas de análise química. Como as informações a respeito da composição química de amostras permitem o conhecimento de várias das suas características, as modalidades fotoacústicas podem ser aplicadas em diversas áreas. Os avanços tecnológico ocorrido nas últimas décadas nas áreas de fontes de radiações eletromagnética, detectores ultrassônicos e processamento de dados possibilitaram o progresso e a disseminação de técnicas fotoacústicas, tais como as modalidades de imagens fotoacústicas (PAI). Utilizando dispositivos simples, a PAI é capaz de gerar imagens de altíssimo contraste de regiões internas de amostras de diversas naturezas. Uma vasta quantidade de aplicações da técnica, em diversos campos das ciências médicas e biológicas, apresentaram excelentes resultados, e, há fortes indícios do potencial da fotoacústica em campos ainda não explorados.

Neste trabalho, foi abordado o desenvolvimento de um sistema PAI com um aparato experimental relativamente simples, utilizando um laser Nd:YAG pulsado como fonte de radiação, e um transdutor ultrassônico piezoelétrico comercial para detectar as ondas acústicas. O sistema automatizado foi capaz de mapear a absorção óptica na superfície de uma amostra-teste através da geração de uma imagem bidimensional, e também revelou alta sensibilidade. Assim, pode-se concluir que é possível produzir em laboratório um sistema PAI automatizado, que pode ser aplicado para diversos fins.

Das discussões e dos resultados apresentados no capítulo 4, pode-se concluir que as técnicas PAI têm grande potencial no diagnóstico de cárie. Além das regiões cavitadas, a diferenciação do coeficiente de absorção óptica, permite detectar as cáries incipientes de forma direta e objetiva. Isto indica que o desenvolvimento de dispositivos de escaneamento fotoacústicos pode acarretar em grandes avanços no modo como é realizado o diagnóstico e tratamento da doença bucal mais comum do mundo.

As perspectivas de trabalhos são essencialmente o aprimoramento do sistema e a utilização do mesmo para avaliar outros tipos de amostras. A necessidade da realização de melhorias na resolução do sistema fica evidente nos resultados do capítulo 4. Na revisão de literatura, foi verificado que o aumento da resolução pode ser alcançado com a diminuição do diâmetro do feixe do laser, bem como, com a utilização de transdutores de frequências centrais mais altas. Métodos computacionais de reconstrução de imagens também podem contribuir para o aperfeiçoamento das imagens geradas pelo sistema. A diminuição no tempo de escaneamento e a substituição dos dispositivos utilizados por equipamentos mais compactos, robustos e econômicos são outras melhorias desejáveis. Estas serão capazes de expandir as possibilidades de aplicações do sistema, permitindo que se realize medições *in vivo* e *in locu*.

REFERÊNCIAS

- 1 MIKLOS, A.; SCHAFER, S.; HESS, P. Photoacoustic spectroscopy, theory. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier, v. 1, n. 11, p. 1153–1159, 1999. Citado 4 vezes nas páginas 10, 25, 27 e 28.
- 2 JAN, S. et al. Ultrathin mica and graphite cantilevers enhanced photoacoustic spectroscopy—towards modelling of acousto-mechanical properties. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. [S.l.: s.n.], 2020. Citado na página 10.
- 3 DUBYK, K. et al. Thermal properties study of silicon nanostructures by photoacoustic techniques. *Journal of Applied Physics*, AIP Publishing LLC, v. 127, n. 22, p. 225101, 2020. Citado na página 10.
- 4 BELL, A. G. On the production and reproduction of sound by light. In: *Proc. Am. Assoc. Adv. Sci.* [S.l.: s.n.], 1881. v. 29, p. 115–136. Citado na página 10.
- 5 KRUGER, R. A. Photoacoustic ultrasound. *Medical physics*, Wiley Online Library, v. 21, n. 1, p. 127–131, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1118/1.597367>>. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 34.
- 6 ORAEVSKY, A. A. et al. Laser-based optoacoustic imaging in biological tissues. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICS AND PHOTONICS. *Laser-Tissue Interaction V; and Ultraviolet Radiation Hazards*. [S.l.], 1994. v. 2134, p. 122–128. Citado na página 10.
- 7 MANOHAR, S.; RAZANSKY, D. Photoacoustics: a historical review. *Advances in optics and photonics*, Optical Society of America, v. 8, n. 4, p. 586–617, 2016. Citado 7 vezes nas páginas 10, 15, 16, 17, 19, 20 e 34.
- 8 SIGRIST, M. W. Photoacoustic spectroscopy, applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier, v. 1, 1999. Citado 4 vezes nas páginas 11, 28, 32 e 33.
- 9 ELEFANTE, A. et al. Environmental monitoring of methane with quartz-enhanced photoacoustic spectroscopy exploiting an electronic hygrometer to compensate the h2o influence on the sensor signal. *Sensors*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 20, n. 10, p. 2935, 2020. Citado na página 11.
- 10 DUMITRAS, D. et al. Laser photoacoustic spectroscopy: principles, instrumentation, and characterization. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, INOE & INFM, v. 9, n. 12, p. 3655, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 28.
- 11 PAN, Y. et al. Compact and highly sensitive no2 photoacoustic sensor for environmental monitoring. *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 25, n. 5, p. 1201, 2020. Citado na página 11.
- 12 LI, C.; WANG, L. V. Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine. *Physics in Medicine & Biology*, IOP Publishing, v. 54, n. 19, p. R59, 2009. Citado 4 vezes nas páginas 11, 15, 33 e 37.

- 13 HOELEN, C. et al. Three-dimensional photoacoustic imaging of blood vessels in tissue. *Optics letters*, Optical Society of America, v. 23, n. 8, p. 648–650, 1998. Disponível em: <<https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-23-8-648>>. Citado na página 11.
- 14 MONTIGNY, E. D. Photoacoustic tomography: principles and applications. *Department of Physics Engineering, Polytechnic School Montreal*, 2011. Citado 6 vezes nas páginas 11, 14, 19, 20, 35 e 36.
- 15 ZHOU, Y.; YAO, J.; WANG, L. V. Tutorial on photoacoustic tomography. *Journal of biomedical optics*, International Society for Optics and Photonics, v. 21, n. 6, p. 061007, 2016. Citado 11 vezes nas páginas 11, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 37, 38, 39 e 41.
- 16 ATTIA, A. B. E. et al. A review of clinical photoacoustic imaging: Current and future trends. *Photoacoustics*, Elsevier, v. 16, p. 100–144, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pacs.2019.100144>>. Citado 9 vezes nas páginas 12, 15, 25, 34, 36, 38, 39, 41 e 42.
- 17 CHENG, R. et al. Noninvasive assessment of early dental lesion using a dual-contrast photoacoustic tomography. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 6, p. 21798, 2016. Disponível em: <<https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-23-8-648>>. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 57.
- 18 KIM, K. et al. Early detection of dental caries using photoacoustics. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICS AND PHOTONICS. *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2006: The Seventh Conference on Biomedical Thermoacoustics, Optoacoustics, and Acousto-optics*. 2006. v. 6086, p. 60860G. Disponível em: <<https://doi.org/10.1117/12.646455>>. Citado 3 vezes nas páginas 12, 57 e 59.
- 19 KOYAMA, T.; KAKINO, S.; MATSUURA, Y. A feasibility study of photoacoustic detection of hidden dental caries using a fiber-based imaging system. *Applied Sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 8, n. 4, p. 621, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/8/4/621>>. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 57.
- 20 HUGHES, D. et al. Imaging and detection of early stage dental caries with an all-optical photoacoustic microscope. In: IOP PUBLISHING. *Journal of Physics: Conference Series*. 2015. v. 581, n. 1, p. 012002. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/581/1/012002/meta>>. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 57.
- 21 LI, T.; DEWHURST, R. Photoacoustic non-destructive evaluation and imaging of caries in dental samples. In: AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS. *AIP Conference Proceedings*. 2010. v. 1211, n. 1, p. 1574–1581. Disponível em: <<https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.3362256>>. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 57.
- 22 FONSECA, J. R. L. *Projeto e construção de um espectrômetro de fotoacústica: aplicação para determinação da energia de laser pulsado*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2002. Citado na página 14.
- 23 COX, B. T. et al. Quantitative spectroscopic photoacoustic imaging: a review. *Journal of biomedical optics*, International Society for Optics and Photonics, v. 17, n. 6, p. 061202, 2012. Citado na página 14.

- 24 WANG, L. V. Tutorial on photoacoustic microscopy and computed tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, IEEE, v. 14, n. 1, p. 171–179, 2008. Citado 7 vezes nas páginas 14, 15, 19, 22, 24, 35 e 39.
- 25 VENGEROV, M. An optical-acoustic method of gas analysis. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 158, n. 4001, p. 28–29, 1946. Citado na página 14.
- 26 LUFT, K. Über eine neue methode der registrierenden gasanalyse mit hilfe der absorption ultraroter strahlen ohne spektrale zerlegung. *Z. tech. Phys*, v. 24, p. 97–104, 1943. Citado na página 14.
- 27 COTTRELL, T. The absorption of interrupted infra-red radiation. *Transactions of the Faraday Society*, Royal Society of Chemistry, v. 46, p. 1025–1030, 1950. Citado na página 14.
- 28 ROSENCWAIG, A.; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics*, American Institute of Physics, v. 47, n. 1, p. 64–69, 1976. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 16.
- 29 MCDONALD, F. A.; JR, G. C. W. Generalized theory of the photoacoustic effect. *Journal of Applied Physics*, American Institute of Physics, v. 49, n. 4, p. 2313–2322, 1978. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 16.
- 30 ROUSSET, G.; LEPOUTRE, F.; BERTRAND, L. Influence of thermoelastic bending on photoacoustic experiments related to measurements of thermal diffusivity of metals. *Journal of applied physics*, American Institute of Physics, v. 54, n. 5, p. 2383–2391, 1983. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 16.
- 31 HAISCH, C. Photoacoustic spectroscopy for analytical measurements. *Measurement Science and Technology*, IOP Publishing, v. 23, n. 1, p. 012001, 2011. Citado 5 vezes nas páginas 15, 28, 30, 31 e 32.
- 32 SOMER, A. *Efeito de Modificações Estruturais sobre a difusividade Térmica efetiva em sistemas com dupla camada medida pela técnica de célula fotoacústica aberta*. Tese (Doutorado) — Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), 2016. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 17.
- 33 NETO, O. T. *Identificação de carotenoides em vegetais, in-natura, utilizando espectroscopia fotoacústica*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), 2018. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 17.
- 34 BENTO, A. C. *Caracterização de propriedades ópticas e térmicas de materiais por espectroscopia fotoacústica*. Tese (Doutorado) — Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1990. Citado na página 16.
- 35 BOZÓKI, Z.; POGÁNY, A.; SZABÓ, G. Photoacoustic instruments for practical applications: present, potentials, and future challenges. *Applied Spectroscopy Reviews*, Taylor & Francis, v. 46, n. 1, p. 1–37, 2011. Citado 5 vezes nas páginas 18, 28, 29, 30 e 31.
- 36 MORSE, P. M.; INGARD, K. U. *Theoretical acoustics*. [S.l.]: Princeton university press, 1986. Citado na página 22.
- 37 WANG, L. V. *Photoacoustic imaging and spectroscopy*. [S.l.]: CRC press, 2017. Citado na página 22.

- 38 DIEBOLD, G. J.; SUN, T.; KHAN, M. I. Photoacoustic monopole radiation in one, two, and three dimensions. *Physical review letters*, APS, v. 67, n. 24, p. 3384, 1991. Citado na página 22.
- 39 WHEELER, J. T. *Time Dependent Green's Function*. Disponível em: <<http://www.physics.usu.edu/Wheeler/EM/Notes/EMNotes08TimeDepGreenFn.pdf>>. Citado na página 23.
- 40 DIEBOLD, G.; SUN, T.; KHAN, M. Photoacoustic monopole radiation in one, two, and three dimensions. *Physical review letters*, APS, v. 67, n. 24, p. 3384, 1991. Citado na página 24.
- 41 HOELEN, C.; MUL, F. D. A new theoretical approach to photoacoustic signal generation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, Acoustical Society of America, v. 106, n. 2, p. 695–706, 1999. Citado na página 24.
- 42 WANG, L. V.; YAO, J. A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences. *Nature methods*, Nature Publishing Group, v. 13, n. 8, p. 627, 2016. Citado 9 vezes nas páginas 25, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41 e 42.
- 43 CHOI, W. et al. Clinical photoacoustic imaging platforms. *Biomedical engineering letters*, Springer, v. 8, n. 2, p. 139–155, 2018. Citado 3 vezes nas páginas 25, 37 e 39.
- 44 STROHM, E. M.; MOORE, M. J.; KOLIOS, M. C. Single cell photoacoustic microscopy: a review. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, IEEE, v. 22, n. 3, p. 137–151, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 39.
- 45 OH, J.-T. et al. Three-dimensional imaging of skin melanoma in vivo by dual-wavelength photoacoustic microscopy. *Journal of biomedical optics*, International Society for Optics and Photonics, v. 11, n. 3, p. 034032, 2006. Disponível em: <<https://www.spiedigitallibrary.org/journals/Journal-of-Biomedical-Optics/volume-11/issue-3/034032/Three-dimensional-imaging-of-skin-melanoma-in-vivo-by-dual/10.1117/1.2210907.short>>. Citado na página 25.
- 46 ALLEN, T. et al. Photoacoustic imaging of lipid rich plaques in human aorta. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICS AND PHOTONICS. *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2010*. 2010. v. 7564, p. 75640C. Disponível em: <<https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/7564/75640C/Photoacoustic-imaging-of-lipid-rich-plaques-in-human-aorta/10.1117/12.842205.short>>. Citado na página 25.
- 47 FU, Q. et al. Photoacoustic imaging: contrast agents and their biomedical applications. *Advanced Materials*, Wiley Online Library, v. 31, n. 6, p. 1805875, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.201805875>>. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 26.
- 48 DEMTRÖDER, W. *Laser spectroscopy: basic concepts and instrumentation*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.
- 49 NETO, J. G. V. *Um Espectrômetro Microcontrolado Baseado em LED Branco como Fonte de Radiação e Mídia de CD como Grade de Difração*. Tese (Doutorado) — UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, 2008. Citado na página 27.

- 50 KERR, E. L.; ATWOOD, J. G. The laser illuminated absorptivity spectrophone: a method for measurement of weak absorptivity in gases at laser wavelengths. *Applied optics*, Optical Society of America, v. 7, n. 5, p. 915–921, 1968. Citado na página 29.
- 51 POPA, C. et al. Testing fruit quality by photoacoustic spectroscopy assay. *Laser Physics*, IOP Publishing, v. 24, n. 10, p. 105702, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 32.
- 52 PUSHKARSKY, M.; WEBBER, M.; PATEL, C. Ultra-sensitive ambient ammonia detection using co 2-laser-based photoacoustic spectroscopy. *Applied Physics B*, Springer, v. 77, n. 4, p. 381–385, 2003. Citado na página 29.
- 53 ZENINARI, V. et al. Methane detection on the sub-ppm level with a near-infrared diode laser photoacoustic sensor. *Infrared physics & technology*, Elsevier, v. 44, n. 4, p. 253–261, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 32.
- 54 HUANG, Q. et al. Wavelength modulation photoacoustic spectroscopy using a near-infrared dfb diode laser. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICS AND PHOTONICS. *Sixth Symposium on Novel Optoelectronic Detection Technology and Applications*. [S.l.], 2020. v. 11455, p. 114553S. Citado na página 29.
- 55 PALDUS, B. et al. Photoacoustic spectroscopy using quantum-cascade lasers. *Optics letters*, Optical Society of America, v. 24, n. 3, p. 178–180, 1999. Citado na página 29.
- 56 LIMA, J. et al. Photoacoustic detection of no 2 and n 2 o using quantum cascade lasers. *Applied Physics B*, Springer, v. 85, n. 2-3, p. 279–284, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 32.
- 57 ELBASUNEY, S.; EL-SHARKAWY, Y. H. Instant identification of explosive material: Laser induced photoacoustic spectroscopy versus fourier transform infrared. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Elsevier, v. 108, p. 269–277, 2018. Citado na página 29.
- 58 VIAPPIANI, C.; RIVERA, G. Use of leds as light sources in photoacoustic cw spectroscopy. *Measurement Science and Technology*, IOP Publishing, v. 1, n. 11, p. 1257, 1990. Citado na página 30.
- 59 BÖTTGER, S. et al. Off-beam quartz-enhanced photoacoustic spectroscopy with leds. *Applied Physics B*, Springer, v. 113, n. 2, p. 227–232, 2013. Citado na página 30.
- 60 KÖHRING, M. et al. Led-absorption-qepas sensor for biogas plants. *Sensors*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 15, n. 5, p. 12092–12102, 2015. Citado na página 30.
- 61 WEIGL, S. et al. Photoacoustic detection of acetone in n2 and synthetic air using a high power uv led. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier, p. 128109, 2020. Citado na página 30.
- 62 SIGRIST, M. W. Photoacoustic spectroscopy, methods and instrumentation. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier, v. 1, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 31.
- 63 LU, X. M.; PROULX, T. Single crystals vs. pzt ceramics for medical ultrasound applications. In: IEEE. *IEEE Ultrasonics Symposium, 2005*. [S.l.], 2005. v. 1, p. 227–230. Citado na página 31.

- 64 FARROW, M. M. et al. Piezoelectric detection of photoacoustic signals. *Applied optics*, Optical Society of America, v. 17, n. 7, p. 1093–1098, 1978. Citado na página 31.
- 65 HAISCH, C. Photoacoustic spectroscopy for analytical measurements. *Measurement Science and Technology*, IOP Publishing, v. 23, n. 1, p. 012001, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 32.
- 66 PAWLACZYK, M.; PASIECZNA-PATKOWSKA, S.; SCHROEDER, G. Photoacoustic spectroscopy of surface-functionalized fe₃o₄–sio₂ nanoparticles. *Applied Spectroscopy*, SAGE Publications Sage UK: London, England, p. 0003702820913647, 2020. Citado na página 31.
- 67 THIRUPATHY, J. et al. An investigation on photoacoustic spectroscopy and dielectric properties of sulfanilic acid nonlinear optical single crystal for different applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, Springer, v. 31, n. 17, p. 14531–14536, 2020. Citado na página 31.
- 68 DU, C.; ZHOU, J. Application of infrared photoacoustic spectroscopy in soil analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, Taylor & Francis, v. 46, n. 5, p. 405–422, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 33.
- 69 MELO, W. d. B.; LÓIO, D.; VAZ, C. Aplicação da espectroscopia fotoacústica nos estudos de solos intactos. *Embrapa Instrumentação-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008., 2008. Citado na página 32.
- 70 ROSENCWAIG, A. Photoacoustic spectroscopy of biological materials. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 181, n. 4100, p. 657–658, 1973. Citado na página 32.
- 71 NAVAS, M.; JIMÉNEZ, A.; ASUERO, A. Human biomarkers in breath by photoacoustic spectroscopy. *Clinica Chimica Acta*, Elsevier, v. 413, n. 15-16, p. 1171–1178, 2012. Citado na página 32.
- 72 HARREN, F. J.; CRISTESCU, S. M. Photoacoustic spectroscopy in trace gas monitoring. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, Wiley Online Library, p. 1–29, 2006. Citado na página 32.
- 73 CRISTESCU, S. M. et al. Real-time monitoring of endogenous lipid peroxidation by exhaled ethylene in patients undergoing cardiac surgery. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, American Physiological Society Bethesda, MD, v. 307, n. 7, p. L509–L515, 2014. Citado 3 vezes nas páginas 32, 33 e 34.
- 74 NAVAS, M.; JIMÉNEZ, A.; ASUERO, A. Human biomarkers in breath by photoacoustic spectroscopy. *Clinica Chimica Acta*, Elsevier, v. 413, n. 15-16, p. 1171–1178, 2012. Citado na página 33.
- 75 BEARD, P. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface focus*, The Royal Society, v. 1, n. 4, p. 602–631, 2011. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsfs.2011.0028>>. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 36.
- 76 ZHANG, H. F. et al. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nature biotechnology*, Nature Publishing Group, v. 24, n. 7, p. 848–851, 2006. Citado 4 vezes nas páginas 35, 37, 40 e 41.

- 77 WANG, L. V. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography. *Nature photonics*, Nature Publishing Group, v. 3, n. 9, p. 503–509, 2011. Disponível em: <<https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=opn-29-4-32>>. Citado na página 36.
- 78 ZHANG, C. et al. Label-free photoacoustic microscopy of cytochromes. *Journal of biomedical optics*, International Society for Optics and Photonics, v. 18, n. 2, p. 020504, 2013. Citado na página 40.
- 79 FEHM, T. F. et al. In vivo whole-body optoacoustic scanner with real-time volumetric imaging capacity. *Optica*, Optical Society of America, v. 3, n. 11, p. 1153–1159, 2016. Citado na página 42.
- 80 MATSUMOTO, Y. et al. Label-free photoacoustic imaging of human palmar vessels: a structural morphological analysis. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.
- 81 SILVA, E. J. da. *Desenvolvimento e aplicação de um sistema de imagem fotoacústica para diagnóstico de cárie*. Dissertação (Mestrado) — UFPE, 2020. Citado 6 vezes nas páginas 44, 46, 56, 59, 60 e 61.
- 82 REGTIEN, P. P.; DERTIEN, E. *Sensors for mechatronics*. [S.l.]: Elsevier, 2018. Citado na página 45.
- 83 BEAUMONT, P. C.; JOHNSON, D. G.; PARSONS, B. J. Photophysical properties of laser dyes: picosecond laser flash photolysis studies of rhodamine 6g, rhodamine b and rhodamine 101. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, Royal Society of Chemistry, v. 89, n. 23, p. 4185–4191, 1993. Citado 2 vezes nas páginas 47 e 53.
- 84 KASSEBAUM, N. J. et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *Journal of dental research*, Sage Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 96, n. 4, p. 380–387, 2017. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0022034517693566>>. Citado na página 56.
- 85 LIMA, J. E. d. O. Cárie dentária: um novo conceito. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, SciELO Brasil, v. 12, n. 6, p. 119–130, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-54192007000600012&script=sci_arttext>. Citado na página 56.
- 86 MOHANRAJ, M. et al. Diagnostic methods for early detection of dental caries-a review. *International Journal of Pedodontic Rehabilitation*, Medknow Publications, v. 1, n. 1, p. 29, 2016. Disponível em: <<http://www.ijpedor.org/article.asp?issn=2468-8932;year=2016;volume=1;issue=1;spage=29;epage=36;aulast=Mohanraj>>. Citado 2 vezes nas páginas 56 e 57.
- 87 PITTS, N. B. et al. Dental caries. *Nature reviews Disease primers*, Nature Publishing Group, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrdp201730>>. Citado na página 56.
- 88 VECTORSTOCK. *Tooth decay diagram in details vector image*. Disponível em: <<https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/>>

tooth-decay-diagram-in-details-vector-6657320>. Acesso em: 01 abr. 2020. Citado na página 57.

89 ISMAIL, A. I. et al. The international caries detection and assessment system (icdas): an integrated system for measuring dental caries. *Community dentistry and oral epidemiology*, Wiley Online Library, v. 35, n. 3, p. 170–178, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518963>>. Citado na página 58.

90 LASER INSTITUTE OF AMERICA. *ANSI Z136.1-2014 Safe Use Of Lasers In Health Care*. [S.l.], 2014. Disponível em: <<https://webstore.ansi.org/Standards/LIA/ANSIZ1362014?source=blog>>. Citado na página 58.

ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

Photoacoustic imaging of occlusal incipient caries in the visible and near-infrared regime

Evair J Silva¹; Erica M Miranda²; Cláudia C B O Mota³; Avishek Das^{2*}; Anderson S L Gomes^{1,2}

¹Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50670-901, Pernambuco, Brazil.

²Department of Physics, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50670-901, Pernambuco, Brazil.

³Faculty of Dentistry, Centro Universitário Tabosa de Almeida, Caruaru, 55016-901, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding Author: Dr. Avishek Das, avishek55das@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: This study aimed to demonstrate the presence of dental caries through the photoacoustic imaging system with visible and near-infrared wavelengths, highlighting the differences between the two spectral regions. It was also verified the depth at which carious tissue could be detected.

Materials and Methods: 15 permanent molars were selected and classified as sound, incipient and advanced caries, by visual inspection, radiography, and optical coherence tomography analysis, prior to photoacoustic scanning. A photoacoustic imaging system operating with nanosecond pulsed laser as the light excitation source at either 532 nm or 1064 nm, and acoustic transducer at 5 MHz was developed, characterized and used. En-face and lateral (depth) photoacoustic signals were detected.

Results: The results confirmed the potential of the photoacoustic method to detect caries. At both wavelengths, photoacoustics is effective to detect incipient and advanced caries. The reconstructed photoacoustic images confirmed that a higher intensity of the photoacoustic signal could be observed in lesioned regions, whilst sound surfaces showed much less photoacoustic signal. Photoacoustic signal at depth up to 4 mm at both 532 nm and 1064 nm was measured.

Conclusion: The results presented here are promising and corroborate that photoacoustic can be applied as a diagnostic tool in caries research. New studies should be concentrated on developing a clinical model of photoacoustic imaging applications to dentistry, including soft tissues. The use of inexpensive light-emitting diodes together with miniaturized detector will make the photoacoustic imaging system more flexible, user-friendly, and technologically viable.

Keywords: Diagnostic imaging, dental caries, photoacoustic techniques.

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

INTRODUCTION

Dental caries causes irreversible progressive demineralization in teeth, both in enamel and dentin. It grows silently until changes in enamel are clinically visible. If left unchecked, the tissue destruction will not be avoided¹. Therefore, the early caries detection is important, since it allows the adoption of preventive strategies and conservative procedures for the control of the disease using preventive and/or more conservative procedures^{2,3}. Traditionally, caries is diagnosed through visual inspection and dental radiographs are complementarily employed. However, visual inspection is a subjective method in which the professional's experience directly influences the diagnosis; on the other hand, it is necessary a certain level of demineralization for tissue to be visible on the radiograph^{4,5}. Due to these limitations, the last few years have seen an increased interest in the development of new methods of caries diagnosis with highly accurate and non-invasive, as transillumination, fluorescence-based image, optical coherence tomography (OCT), and photoacoustics (PA)⁶⁻¹³.

In the early 1880's, Alexander Graham Bell^{14,15}, Tyndall¹⁶, and Röntgen¹⁷, independently discovered the effect which is nowadays known as PA. Bell found out that materials can emit sound waves when illuminated by modulated light and identified that the intensity of the emitted sound was wavelength-dependent, and therefore attributed to an optical absorption process. Later in 1977, Hordvik and Schlossberg¹⁸ used the PA technique to measure the absorption coefficient in solid samples with high sensitivity. Since then, PA has been exploited in a myriad of applications, leading to PA sensing, PA spectroscopy, PA tomography (PAT) or PA imaging (PAI), as methods to imaging materials and biomaterials in a noninvasive way¹⁹⁻²³. As pointed out by Li et al.²², photoacoustic tomography can cover from micro to the macroworld, with spatial resolution ranging from 100's of nm to 1 mm, and penetration depths from 10 μm to 10 cm. Furthermore, the same authors reported imaging results in bio tissues from cells to human organs²².

In Dentistry, PA methods have been demonstrated in studies of caries diagnostics^{13, 24-27}, periodontology^{28,29}, dental implants³⁰, and blood detection in dental pulp³¹. Given the potential of the method as a noninvasive imaging technique, its exploitation in dentistry is still in its initial stages, with pioneer work dating from 2006²⁴. This fact led us to develop the work reported here, aiming at further studies of dental caries detection using PAI.

The purpose of this study is to examine the presence of incipient and advanced caries through the PAI system with visible and near-infrared wavelengths. After developing the PAI system, two different wavelengths were employed, 532 nm and 1064 nm, as the linear absorption differs as the wavelength changes.

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

MATERIALS AND METHODS

This experimental laboratory study was carried out after approval by the Ethics Committee on Humans Research (Process number 2.989.712) of Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil, in accordance with the Helsinki Declaration.

Sample preparation

Fifteen permanent molars teeth were obtained from a teeth bank (Centro Universitário Tabosa de Almeida, Caruaru, Pernambuco, Brazil), analyzed by visual inspection, and divided into three groups: five sound teeth; five incipient caries, which represents the beginning of the pathological process, still without cavitation; and advanced caries, representing the stage in which dentin involvement is evident. The sample characterization criteria employed were following the International Caries Detection and Assessment System categorization³².

The teeth had their root portion included with colorless self-curing acrylic resin (Jet Clássico, Brazil) in a matrix with the occlusal surface parallel to the ground, aiming to standardize the sample positioning during PAI and OCT scanning. Then the samples were kept in deionized water under refrigeration to avoid cracks and fractures until the end of the experiment.

Radiography and Optical Coherence Tomography

Teeth were evaluated by digital radiography, taken using Focus Intraoral x-ray (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finland), with 70 kV/7mA and a phosphor-plate (PSP) and the focus-film distance of 30 cm. The exposure time was 0.3 seconds, defined by a previous pilot study. The sensor was reading by digital system Digora Optime scanner (Soredex, Helsinki, Finland), and the image was generated for each tooth in PSP using the CLINIVIEW software.

Teeth were also scanned by optical coherence tomography, an imaging technique based on the backscattering and reflecting properties of incident light on the samples, which provides depth information of the structures under analysis^{10,12,33,34}.

For this experiment, two commercial OCT systems were employed, both operating in the Spectral Domain (SD-OCT). Cross-sectional two-dimensional (2D) images were acquired by OQ LabScope (Lummedica, Duhram, USA), using a light source with 840 nm of central wavelength, depth resolution 7 μm in air and 5 μm in tissue, generated image with size 512 x 512 pixels. For volumetric three-dimensional (3D) images Ganymede OCT (Thorlabs Inc., New Jersey, USA) was employed, by using a super luminescent diode as light source, with 930 nm of central wavelength, 100 nm of spectral bandwidth, maximum output power of 5 mW, and axial resolution 5 μm . The axial resolution determines the spatial resolution of the measured biostructure.

Cross-sectional 2D and volumetric 3D images were obtained from the occlusal surface of teeth, aiming to verify the presence of incipient caries, as seen in the PAI images. For both 2D and 3D scanning, the samples were positioned perpendicular to the

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

beam light, in both systems. The analysis was performed along the region of interest (ROI) of the occlusal surface, to identify the presence (or not) of demineralization process.

Photoacoustic imaging system and processing

The schematic diagram of the developed photoacoustic imaging system, based on previous studies^{13,24}, is shown in Fig. 1A. For the incident pulsed light beam source, a Q-switched Nd:YAG laser Continuum Surelite II-10 (Continuum, Santa Clara, USA) with selective wavelength of 532 nm and 1064 nm, pulse width of 6 ns, and a repetition rate of 10 Hz was employed for this work. The laser beam diameter was measured to be approximately 7 mm.

This pulsed beam was elevated to a certain height with right-angle prism and multiple mirror assemblies. A part of this beam was divided with a beam splitter and fed to a photodetector which was employed for triggering the 200 MHz digital storage oscilloscope (DSO) TDS 2024B (Tektronix, Beaverton, USA). The remaining beam was reflected downwards with a controlled mirror as shown in the Fig. 1A. In order to increase the resolution of the PAI measurement, the beam diameter was decreased to 1 mm with a pinhole arrangement. At this stage, the effective maximum working beam density was maintained at 17 mJ/cm², which is lower than the safety limit of 20 mJ/cm² set by American National Standards Institute (ANSI)³⁵.

The tooth sample was mounted on a holder and was placed inside a distilled water tank. This entire assembly was placed over a computer controlled motorized X-Y translation stage MTS50-Z8 (Thorlabs Inc., New Jersey, USA). The photoacoustic signals were acquired by employing an immersion type ultrasonic transducer V310-N-SU (Olympus, Waltham, USA) with center frequency of 5 MHz. The transducer was partially immersed into the water pointing at the laser beam-tooth interface at 45° for optimum acoustic coupling to the sample. Alternatively, for depth measurements, the photoacoustic detector was placed on the tooth side and moved vertically from top to bottom with computer-controlled Y-axis translation stage. To achieve significant PA signal for imaging, a broadband signal amplifier was constructed and used to enhance the transducer output signal, which was finally fed to the DSO channel 1 (CH1).

For the image reconstruction, the translation stages and DSO were interfaced with custom-build LabVIEW programming, as shown in Fig. 1B. The X and Y stages were translated with 0.5 mm steps and PA data from the top surface of tooth sample were recorded with CH1. The PA voltage signal in CH1 was averaged 16 times in order to remove the noise and the recorded peak-to-peak signal amplitude for every translation was fed to a 2D array of dataset in the program. Finally, such 2D dataset was employed by the program to generate the color map contour plot of the respective sample automatically.

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

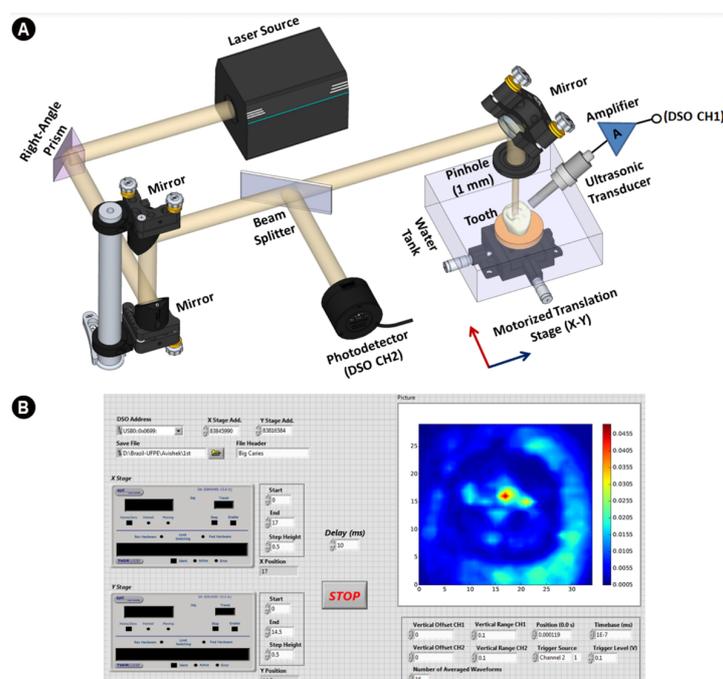


Fig. 1: (A) Schematic diagram of lab-made PAI system. (B) Data acquisition and image reconstruction program in LabVIEW.

RESULTS

With the automated PAI system, en-face images and depth measurements were obtained at both 532 nm and 1064 nm pulse excitation wavelengths. Fig. 2 shows an example of the PAI results for excitation at 532 nm and 1064 nm, for sound tooth, and tooth with incipient and advanced caries. Also, shown in the Fig. 3 are the radiographic and OCT results.

The PAI of all teeth were acquired and background noise was filtered out. The solid white outline in all the PAI was manually constructed in order to mimic the respective tooth shape.

The color map contour PAI for all tooth with 532 nm excitation are plotted in Fig. 2B, 2E and 2H. To understand the effect of caries density on the PA signal, the PAI data for all the sample was normalized with the maximum PA voltage signal of the carious sample. The PAI contour of sound tooth shows no change of photoacoustic signal throughout the entire tooth surface which indicates the absence of dental caries. However, the incipient caries PAI in Fig. 2E showed significant amount of scattered photoacoustic signals, shown as the red color in the false color scale. Likewise, the PAI contour in Fig. 2H shows highly dense photoacoustic signal which confirms the presence of huge amount of dental caries in the tooth sample. The maximum amount of normalized PA signal is

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

obtained to be 1 since the maximum value of the PA voltage was 48 mV for this advanced caries sample.

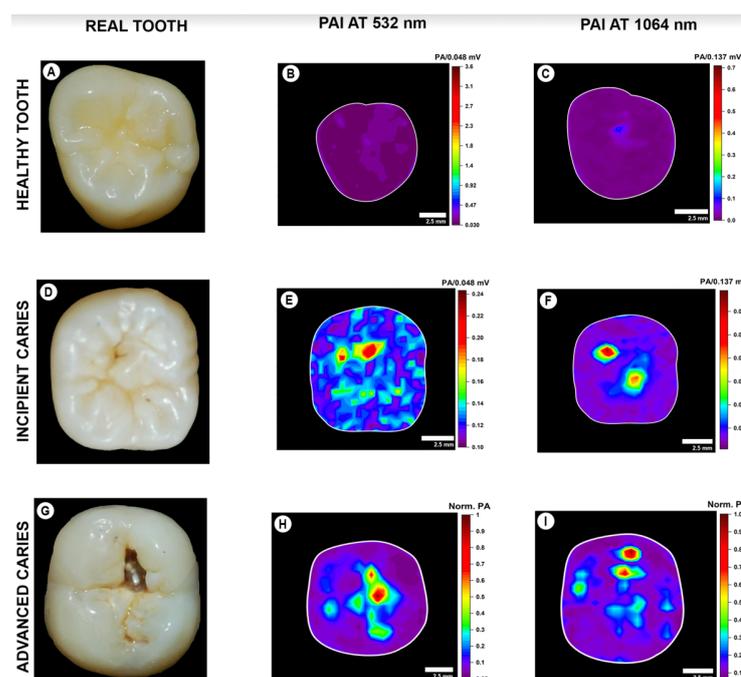


Fig. 2: PAI of sound and carious teeth at 532 nm and 1064 nm with 5 MHz photoacoustic detector. The rows represent the sound tooth (A-C); incipient caries (D-F); and advanced caries (G-I) groups. From left to right, the first column shows the photographic image of the representative samples, and the second and third columns show the corresponding PAI at 532 nm and 1064 nm, respectively.

Similarly, the PAI contour plot of all the samples under an excitation wavelength of 1064 nm is shown in Fig. 2C, 2F and 2I. The sound tooth in Fig. 2C shows negligible photoacoustic effects and hence the PAI contour is observed to be smooth throughout the surface. However, the PAI contour in Fig. 2F shows two significant photoacoustic signals regime which resembles two incipient caries in the tooth surface. The tooth with advanced caries in Fig. 2I showed high amount of PAI intense regime which closely follows the actual photograph of the tooth in Fig. 2G. The highest normalized PA intensity for such caries is calculated to be 1 since the maximum photoacoustic signal voltage was measured to be 137 mV.

For completeness and comparison with the PAI, radiographic and OCT images from the same teeth were obtained, as they are well-established clinical (radiographic) and laboratory (OCT) methods for caries diagnostics, as indicated in previous studies^{11,12,36}. The results are shown in Fig. 3, which repeats the photograph of the sound,

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

incipient and advanced caries (Fig. 3A, 3E and 3I, respectively) samples of Fig. 2 (for easy of comparison by the reader) and their corresponding radiography (Fig. 3B, 3F, 3J), as well as volumetric (Fig. 3C, 3G and 3K) and two-dimensional OCT images (Fig. 3D, 3H and 3L). As it can be seen, the radiograph does not show any information on incipient caries (Fig. 3F). On the other hand, by comparing the OCT images, it is possible to observe the difference in the sulcus area of the demineralized sample (hatched area of Fig. 3G), also confirmed by 2D OCT image (Fig. 3H).

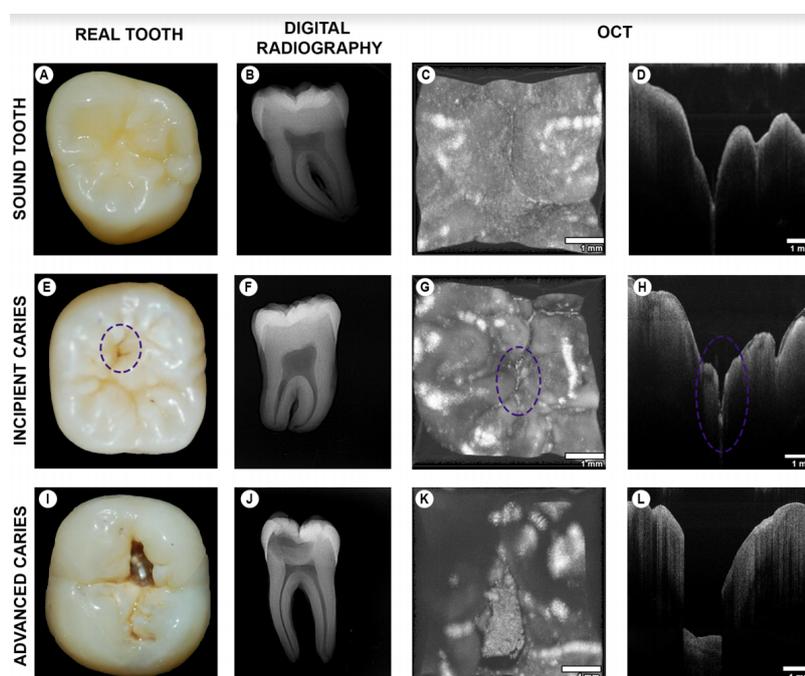


Fig. 3: Clinical, radiographic, 2D cross-section scan and 3d volumetric OCT images of samples. Clinical appearance of sound tooth (A), incipient (E) and advanced caries (I). Digital radiography can be showed in (B), (F) and (J). The third column shows the volumetric OCT of surfaces of sound tooth (C), incipient (G) and (K) advanced caries. On the right side, it is presented the cross-sectional view of sound (D), incipient (H) and advanced caries (L), respectively. The region of interest of incipient caries are indicated by a dashed circle.

The OCT volumetric reconstruction of OCT images reproduced faithfully the photographed images, clearly identifying the ROI also verified by the PAI system. The unhealthy tissues are indicated in both OCT images, 3D volumetric reconstruction (Fig. 3G and 3K) and 2D image (Fig. 3H and 3L). OCT has been used here just to confirm the PAI imaging and can be considered the gold standard in this experiment.

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

The effectiveness of the photoacoustic technique to measure the dental caries was confirmed and the experiment was repeated for five different tooth samples of each type, and the data shown is typical for all other samples.

An important result is shown in Fig. 4, for the depth in which the PA signal can be detected. By exciting the samples on the occlusal surface, exactly on the previously detected carious lesion region, the PA detector was placed laterally to the tooth long axis while the detector was displaced, and data were simultaneously acquired. In this way, it was possible to capture the PA intensity signal inside the sample. As it can be seen, for sound tooth a very small signal was detected for both wavelengths (above the noise floor), whereas when the light was incident on the carious region, PA signal from either 532 nm or 1064 nm were clearly detected, with differ. PA signal intensities 40% above the noise floor were detected for both 532 nm and 1064 nm for 4 mm depth.

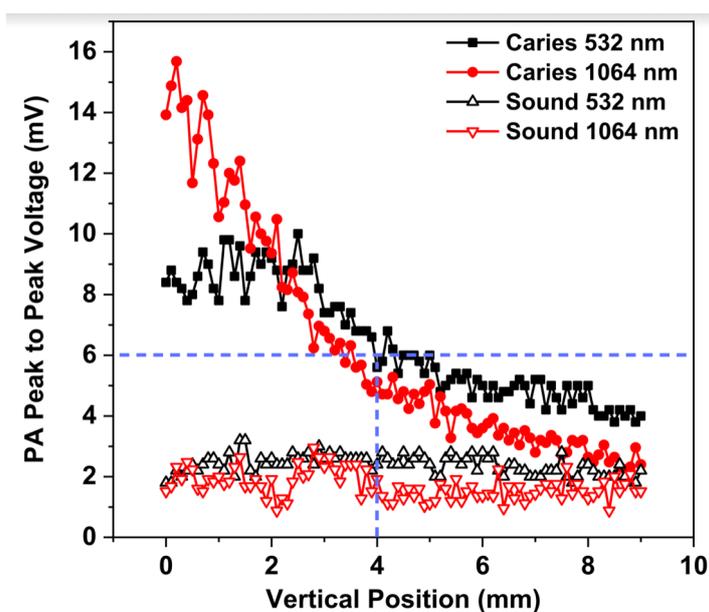


Fig. 4: Peak to Peak voltage for the depth in which the PA signal in a tooth with incipient caries with the laser beam directed at the lesion areas (closed black and red symbol) and in a sound area (open black and red symbol) under the laser wavelength of 532 nm and 1064 nm.

DISCUSSION

In this study, a new automated PAI system has been developed which can capture PAI contour of teeth samples with non-ionizing laser excitation under dual-wavelength source and ultrasonic detector for acoustic detection of the generated PA signal. The

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

developed PAI system consists of automated XY scanning of teeth surface and real-time data acquisition of the PA signals.

The amount of photoacoustic signal is directly proportional to the light absorption by the tissue³⁷, in this way the enhancement of PA signal voltage with the amount of dental caries is evident. Such a result also confirms the efficiency of the PAI system where every tooth showed a consistent rise of PA signal for the different conditions of tooth. One advantage of PA detection is that it only relies on absorption, and light scattering does not affect the result. It is to be noted that the reported PAI system is efficient to detect incipient caries which is difficult to identify with visual inspection or even radiography.

By looking at the tooth face, our results clearly identify the presence of carious tissue at both wavelengths employed, and the images shown in Fig. 2 were automatically obtained. The acquisition rate is limited by the 10 Hz repetition rate of our system, leading to several minutes acquisition time which is not recommended for clinical applications. This technical limitation can be overcome using kHz repetition rate sources, including light-emitting diode (LED) based sources³⁸.

An important result is the detection of PA signal due to caries down to 4 mm depth. It implies that hidden caries in the entire enamel (typically 1-2 mm before reaching the dentin) can be easily detected. The spatial resolution can be improved by using acoustic detectors with higher frequencies. By transforming our PAI system into a PAT (tomographic) system, a 3D image can be provided. The system can also be used to identify occlusal caries.

These results demonstrate the feasibility of PAI detection in caries lesions in the early stages of dental diseases. Such results are consistent with the results obtained by previous studies that used PAI system to investigate early dental caries^{13,24,26,39}. The PAI system presented in this research is fully automated, and real-life clinical applications with the handheld integrated photoacoustic system, which can go into the oral cavity, can be pursued by following the technological developments reported in other studies^{40,41}.

The results presented here are promising and corroborate that photoacoustic can be applied as a diagnostic tool in caries research. New studies should be concentrated on developing a clinical model of PAI applications to dentistry, including soft tissues. The use of LEDs instead of LASERS will make the PAI system more flexible and user-friendly, together with detector miniaturization, already technologically available.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by FACEPE/CNPQ and INCT-INFO (465.763/2014-6).

REFERENCES

1. Cury JA, Tenuta LMA. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 2009;23:23–30.

Submitted to Imaging Science in Dentistry, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

2. Amaechi BT. Emerging technologies for diagnosis of dental caries: The road so far. *J Appl Phys*. 2009;105:102047.
3. Melo M, Pascual A, Camps I, del Campo Á, Ata-Ali J. Caries diagnosis using light fluorescence devices in comparison with traditional visual and tactile evaluation: a prospective study in 152 patients. *Odontology*. 2017;105:283–90.
4. Silva Neto JM da, Santos RL dos, Sampaio MCC, Sampaio FC, Passos IA. Radiographic diagnosis of incipient proximal caries: an ex-vivo study. *Braz Dent J*. 2008;19:97–102.
5. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:17030.
6. Abogazalah N, Eckert GJ, Ando M. In vitro visual and visible light transillumination methods for detection of natural non-cavitated approximal caries. *Clin Oral Investig*. 2019;23:1287–94.
7. Melo M, Pascual A, Camps I, Ata-Ali F, Ata-Ali J. Combined Near-Infrared Light Transillumination and Direct Digital Radiography Increases Diagnostic In Approximal Caries. *Sci Rep*. 2019;9:14224.
8. Jung E-H, Lee E-S, Jung H-I, Kang S-M, de Josselin de Jong E, Kim B-I. Development of a fluorescence-image scoring system for assessing noncavitated occlusal caries. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;21:36–42.
9. Felix Gomez G, Eckert GJ, Ferreira Zandona A. Orange/Red Fluorescence of Active Caries by Retrospective Quantitative Light-Induced Fluorescence Image Analysis. *Caries Res*. 2016;50:295–302.
10. Fried D, Staninec M, Darling CL, Chan KH, Pelzner RB. Clinical monitoring of early caries lesions using cross polarization optical coherence tomography. In: Rechmann P, Fried D, editors. *Lasers in Dentistry XIX*. 2013. p. 856604.
11. Freitas AZ, Zzell DM, Vieira ND, Ribeiro AC, Gomes ASL. Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. *J Appl Phys*. 2006;99:024906.
12. Maia AMA, de Freitas AZ, de L. Campello S, Gomes ASL, Karlsson L. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *J Biophotonics*. 2016;9:596–602.
13. Cheng R, Shao J, Gao X, Tao C, Ge J, Liu X. Noninvasive Assessment of Early Dental Lesion Using a Dual-Contrast Photoacoustic Tomography. *Sci Rep*. 2016;6:2–10.
14. Bell AG. Selenium and the Photophone 1. *Nature*. 1880;22:500–3.
15. Bell AG. The production of sound by radiant energy. *Science*. 1881;2:242–53.
16. Tyndall J. Action of an Intermittent Beam of Radiant Heat Upon Gaseous Matter 1. *Nature*. 1881;23:374–7.
17. Röntgen WC. On tones produced by the intermittent irradiation of a gas. London, Edinburgh, Dublin *Philos Mag J Sci*. 1881;11:308–11.
18. Hordvik A, Schlossberg H. Photoacoustic technique for determining optical

Submitted to *Imaging Science in Dentistry*, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

- absorption coefficients in solids. *Appl Opt.* 1977;16:101.
19. Tam AC. Applications of photoacoustic sensing techniques. *Rev Mod Phys.* 1986;58:381–431.
 20. De Montigny E. Photoacoustic Tomography : Principles and applications. 2011;77 IF-45:41101.
 21. Li T, Dewhurst RJ. Photoacoustic imaging in both soft and hard biological tissue. *J Phys Conf Ser.* 2010;214:012028.
 22. Li L, Lin L, V. Wang L. Multiscale Photoacoustic Tomography. *Opt Photonics News.* 2018;29:32.
 23. Fu Q, Zhu R, Song J, Yang H, Chen X. Photoacoustic Imaging: Contrast Agents and Their Biomedical Applications. *Adv Mater.* 2019;31:e1805875.
 24. Kim K, Witte R, Koh I, Ashkenazi S, O'Donnell M. Early detection of dental caries using photoacoustics. *Photons Plus Ultrasound Imaging Sens 2006 Seventh Conf Biomed Thermoacoustics, Optoacoustics, Acousto-optics.* 2006;6086:60860G.
 25. Rao B, Cai X, Favazza C, Yao J, Li L, Duong S, et al. Photoacoustic microscopy of human teeth. In: Rechmann P, Fried D, editors. *Lasers in Dentistry XVII.* 2011. p. 78840U.
 26. Koyama T, Kakino S, Matsuura Y. A Feasibility Study of Photoacoustic Detection of Hidden Dental Caries Using a Fiber-Based Imaging System. *Appl Sci.* 2018;8:621.
 27. Hughes DA, Sampathkumar A, Longbottom C, Kirk KJ. Imaging and detection of early stage dental caries with an all-optical photoacoustic microscope. *J Phys Conf Ser.* 2015;581.
 28. Lin CY, Chen F, Hariri A, Chen CJ, Wilder-Smith P, Takesh T, et al. Photoacoustic Imaging for Noninvasive Periodontal Probing Depth Measurements. *J Dent Res.* 2018;97:23–30.
 29. Moore C, Bai Y, Hariri A, Sanchez JB, Lin C-Y, Koka S, et al. Photoacoustic imaging for monitoring periodontal health: A first human study. *Photoacoustics.* 2018;12:67–74.
 30. Lee D, Kim C, Park S. Dual-modal photoacoustic and ultrasound imaging of dental implants. In: Oraevsky AA, Wang L V., editors. *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2018.* SPIE; 2018. p. 10.
 31. Yamada A, Kakino S, Matsuura Y. Detection of Photoacoustic Signals from Blood in Dental Pulp. *Opt Photonics J.* 2016;06:229–36.
 32. Ekstrand KR, Gimenez T, Ferreira FR, Mendes FM, Braga MM. The International Caries Detection and Assessment System – ICDAS: A Systematic Review. *Caries Res.* 2018;52:406–19.
 33. Huang D, Swanson E, Lin C, Schuman J, Stinson W, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science (80-).* 1991;254:1178–81.
 34. Fujimoto JG. Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging. *Nat Biotechnol.* 2003;21:1361–7.

Submitted to *Imaging Science in Dentistry*, Manuscript #ISD-2020-259, Sept 2020.

35. Laser Institute of America LIA. ANSI Z136.1: American National Standard for Safe Use of Lasers. SPIE Med Imaging. 2007;90400Q.
36. Hsieh Y-S, Ho Y-C, Lee S-Y, Chuang C-C, Tsai J, Lin K-F, et al. Dental Optical Coherence Tomography. *Sensors*. 2013;13:8928–49.
37. Beard P. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus*. 2011;1:602–31.
38. Zhu Y, Xu G, Yuan J, Jo J, Gandikota G, Demirci H, et al. Light Emitting Diodes based Photoacoustic Imaging and Potential Clinical Applications. *Sci Rep*. 2018;8:9885.
39. Hughes DA, Sampathkumar A, Longbottom C, Kirk KJ. Imaging and detection of early stage dental caries with an all-optical photoacoustic microscope. *J Phys Conf Ser*. 2015;581:012002.
40. Colchester RJ, Zhang EZ, Mosse CA, Beard PC, Papakonstantinou I, Desjardins AE. Broadband miniature optical ultrasound probe for high resolution vascular tissue imaging. *Biomed Opt Express*. 2015;6:1502.
41. Cao Y, Jin W, Ho HL, Ma J. Miniature fiber-tip photoacoustic spectrometer for trace gas detection. *Opt Lett*. 2013;38:434.

ANEXO B – E-MAILS DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

02/10/2020

Gmail - Fwd: ISD: Original Submission



Erica Muniz <ericamunizm@gmail.com>

Fwd: ISD: Original Submission

1 mensagem

Avishek Das <avishek55das@gmail.com>

21 de setembro de 2020 10:08

Para: "Dr. Anderson Gomes" <andersonslgomes@gmail.com>, Cbrainer <claudiabmota@gmail.com>, Evair Josino <evairjs@gmail.com>, "ericamunizm@gmail.com" <ericamunizm@gmail.com>

----- Forwarded message -----

From: **Avishek Das** <acomms-noreply@kisti.re.kr>

Date: Mon, Sep 21, 2020 at 10:05 AM

Subject: ISD: Original Submission

To: Avishek Das <avishek55das@gmail.com>

Dear Editor-in-chief,

I submitted the original manuscript entitled,

'Photoacoustic imaging of occlusal incipient caries in the visible and near-infrared regime' by Evair Josino da Silva; Erica Muniz Miranda; Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota; Avishek Das; Anderson Stevens Leal das Gomes

 submitted to Imaging Science in Dentistry for a form of
 (choose one: Regular Paper, Review Paper, or Letters to the Editor).

[Write down your own Rationale. An example follows:]

'Purpose: This study aimed to demonstrate the presence of dental caries through the photoacoustic imaging system with visible and near-infrared wavelengths, highlighting the differences between the two spectral regions. It was also verified the depth at which carious tissue could be detected.

Materials and Methods: 15 permanent molars were selected and classified as sound, incipient and advanced caries, by visual inspection, radiography, and optical coherence tomography analysis, prior to photoacoustic scanning. A photoacoustic imaging system operating with nanosecond pulsed laser as the light excitation source at either 532 nm or 1064 nm, and acoustic transducer at 5 MHz was developed, characterized and used. En-face and lateral (depth) photoacoustic signals were detected.

Results: The results confirmed the potential of the photoacoustic method to detect caries. At both wavelengths, photoacoustics is effective to detect incipient and advanced caries. The reconstructed photoacoustic images confirmed that a higher intensity of the photoacoustic signal could be observed in lesioned regions, whilst sound surfaces showed much less photoacoustic signal. Photoacoustic signal at depth up to 4 mm at both 532 nm and 1064 nm was measured. Conclusion: The results presented here are promising and corroborate that photoacoustic can be applied as a diagnostic tool in caries research. New studies should be concentrated on developing a clinical model of photoacoustic imaging applications to dentistry, including soft tissues. The use of inexpensive light-emitting diodes together with miniaturized detector will make the photoacoustic imaging system more flexible, user-friendly, and technologically viable.

I hope your favorable consideration in the publication procedure and deeply appreciate for

your kindness. Please make any further correspondence directly to me, preferably through this Email:

avishek55das@gmail.com

Sincerely yours,

Avishek Das

02/10/2020

Gmail - Fwd: MS #ISD-2020-259 Receipt of New Manuscript.



Erica Muniz <ericamunizm@gmail.com>

Fwd: MS #ISD-2020-259 Receipt of New Manuscript.

1 mensagem

Avishek Das <avishek55das@gmail.com>

23 de setembro de 2020 04:41

Para: "Dr. Anderson Gomes" <andersonslgomes@gmail.com>, Evair Josino <evairjs@gmail.com>, ericamunizm@gmail.com, Cbrainer <claudiabmota@gmail.com>

----- Forwarded message -----

From: **Min-Suk Heo Heo** <acoms-noreply@kisti.re.kr>

Date: Tue, 22 Sep, 2020, 10:06 PM

Subject: MS #ISD-2020-259 Receipt of New Manuscript.

To: Avishek Das <avishek55das@gmail.com>

Dear Dr. Avishek Das:

On 2020-09-23, we received your manuscript, referenced below:

Title: Photoacoustic imaging of occlusal incipient caries in the visible and near-infrared regime

Author: Evair Josino da Silva; Erica Muniz Miranda; Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota; Avishek Das; Anderson Stevens Leal; Anderson Gomes

Your manuscript has been assigned the Manuscript #ISD-2020-259. It is now being entered into the peer-review process.

You may check on the status of your manuscript by accessing the 'Submissions under Review' folder. and selecting the following URL:

<http://www.isdent.org>

(You may need to copy/paste the complete URL into your browser's address/location bar, if clicking on it within your email reader doesn't work.)

You will receive another email when we have secured the review reports that the Editors need to arrive at their evaluation and decision about publication.

Thank you for submitting your interesting work to Imaging Science in Dentistry.

Sincerely,

Min-Suk Heo Editor, Imaging Science in Dentistry Dept. of Oral and Maxillofacial Radiology Seoul National University Dental Hospital 275-1 Yeongeon-dong, Jongno-gu Seoul 110-768, Korea Tel) +82-2-2072-3812 Fax) +82-2-744-3919 Email) hmslsh@snu.ac.kr