

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
MESTRADO PROFISSIONAL**

**MARCELO KLOS DA SILVA**

**APRIMORAMENTO NA CAPTURA DE IMAGENS DE VASOS  
SANGUÍNEOS DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM) DE EMBRIÕES DE  
GALINHA PARA PROCESSAMENTO E CÁLCULO DE SUA DENSIDADE**

**CURITIBA**

**2021**

**MARCELO KLOS DA SILVA**

**APRIMORAMENTO NA CAPTURA DE IMAGENS DE VASOS  
SANGUÍNEOS DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM) DE EMBRIÕES DE  
GALINHA PARA PROCESSAMENTO E CÁLCULO DE SUA DENSIDADE**

**Improvement in the Image Capture of Blood Vessels from the Chorioallantoic  
Membrane (CAM) of Chicken Embryos for Processing and Calculation of their  
Density**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof. Dr. Gustavo Benvenuti Borba  
Coorientador(a): Prof. Dr. Luiz Fernando Pereira

**CURITIBA**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



MARCELO KLOS DA SILVA

**APRIMORAMENTO NA CAPTURA DE IMAGENS DE VASOS SANGUÍNEOS DA MEMBRANA  
CORIOALANTÓICA (CAM) DE EMBRIÕES DE GALINHA PARA PROCESSAMENTO E CÁLCULO  
DE SUA DENSIDADE**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Data de aprovação: 02 de Agosto de 2021

Prof Gustavo Benvenuto Borba, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Carlos Eduardo Palanch Repeke, Doutorado - Universidade Federal de Sergipe (Ufs)

Prof Sergio Leandro Stebel, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

## RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo do desenvolvimento de um método para melhorar as condições de observação e aprimorar resultados em experimentos de laboratório, a partir de um microscópio estereoscópico (lupa), da membrana corioalantoica de embrião (CAM) em ovos de galinha. Nesses experimentos foram implantados diferentes tipos de compostos que alteram os fatores de crescimento de vasos sanguíneos tanto para mais quanto para menos, ou seja, provocam uma alteração na densidade de vasos sanguíneos na região afetada. Essas pesquisas requerem a quantificação da vascularização para comparação dos efeitos estimuladores ou inibidores provocados por diversos agentes. Essa quantificação deve ser acurada, objetiva e consistente, por isso as imagens devem ter uma maior clareza nos aspectos observáveis e fatores que degradam a qualidade de uma imagem como: áreas de sombra, a falta de brilho e profundidade na visualização entre outros fatores devem ser minimizados. Para isso, primeiramente, foram observadas as principais limitações do sistema de iluminação da lupa na aquisição de imagens de CAMs e a partir do estudo das características das fontes de iluminação originais do microscópio e de fontes de iluminação alternativas e somando a utilização de recursos disponíveis, foi desenvolvido um aparato para melhorar a qualidade e o controle da iluminação. Para comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos, foram utilizados nas imagens obtidas um método de contagem por grade e também um método de processamento digital, o B-COSFIRE para segmentar e possibilitar a medição das variações de densidade de vasos captados através do uso de fractais. Devido às características do método de iluminação proposto e desenvolvido para o estudo das membranas corioalantoicas, analisou-se um ganho nos resultados à medida que mais detalhes das imagens foram observados, isso tudo em comparação às imagens obtidas com a iluminação original do microscópio utilizado. Tornou-se nítido que, com uma melhor iluminação, destacam-se os vasos mais sutis, garantindo assim resultados melhores para uma posterior análise das imagens e medição da densidade dos vasos dentro do campo de visão.

**Palavras chave:** Angiogênese. Membrana Corioalantoica. Controle de luminosidade.

## ABSTRACT

This work presents the study of the development of a method to improve the observation conditions and improve results in laboratory experiments, from a stereoscopic microscope (magnifying glass), of the embryo chorioallantoic membrane (CAM) in hen eggs. In these experiments, different types of compounds were implanted that alter blood vessel growth factors for both more and less, that is, they cause a change in the density of blood vessels in the affected region. These studies require the quantification of vascularization to compare the stimulatory or inhibitory effects caused by different agents. This quantification must be accurate, objective and consistent, so the images must have greater clarity in the observable aspects and factors that degrade the quality of an image such as: shadow areas, lack of brightness and depth in the visualization, among other factors, must be minimized. For this, first, the main limitations of the magnifying glass lighting system in the acquisition of images from CAMs and from the study of the characteristics of the original light sources of the microscope and alternative light sources, and adding the use of available resources, were observed, an apparatus was developed to improve the quality and control of lighting. To compare the results obtained by the two methods, a grid counting method and a digital processing method, the B-COSFIRE were used in the images obtained to segment and enable the measurement of density variations of captured vessels through the use of fractals. Due to the characteristics of the illumination method proposed and developed for the study of chorioallantoic membranes, a gain in the results was analyzed as more details of the images were observed, all this compared to the images obtained with the original illumination of the microscope used. It became clear that, with better lighting, more subtle vessels stand out, thus ensuring better results for further image analysis and measurement of vessel density within the field of view.

**Keywords:** Angiogenesis. Chorioallantoic Membrane. Luminosity Control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - VEGF induzindo o crescimento de novos capilares .....	19
Figura 2 - Anexos embrionários de um ovo em desenvolvimento .....	25
Figura 3 - Etapas do desenvolvimento de um ovo de frango .....	26
Figura 4 - Diagrama de cromaticidade CIE 1931 .....	31
Figura 5 - Composição espectral de seis diferentes fontes de luz .....	32
Figura 6 - Espectros de emissão de LEDs (Ultravioleta/Visível) .....	33
Figura 7 - Diagrama e funcionamento de um LED comum .....	34
Figura 8 - Pontos de maior temperatura (em vermelho) no Leica 2000 .....	36
Figura 9 - Posicionamento das lâmpadas no Leica. Refletida e transmitida. ....	40
Figura 10 - Posicionamento da iluminação em relação aos anexos embrionários ....	44
Figura 11 - Modelo de largura de pulso em 50%.....	45
Figura 12 - Exemplos de forma de onda variando a largura de pulso .....	47
Figura 13 - Características de uma onda modulada por largura de pulso .....	48
Figura 14 - Arduino Uno e as principais portas utilizadas no projeto.....	50
Figura 15 - Conversão analógica .....	51
Figura 16 - Resposta de acordo com o valor dado na programação (de 0 a 255) ....	52
Figura 17 - Representação da transformação do sinal em nível de intensidade.....	52
Figura 18 - Diagrama dos amplificadores de corrente.....	54
Figura 19 - Medidas do corpo de iluminação.....	56
Figura 20 - Fixação do ovo e encaixe da iluminação .....	57
Figura 21 - Detalhe da iluminação sobre o ovo .....	57
Figura 22 - Posicionamento do corpo de iluminação no Leica 2000 .....	58
Figura 23 - Esboço do filtro B-COSFIRE proposto .....	62
Figura 24 - Entrada (a) e resposta (b) do filtro DoG centralizado.....	63
Figura 25 - Exemplo de configuração de um filtro B-COSFIRE.....	64
Figura 26 - Etapas das técnicas de pré-processamento .....	67
Figura 27 – Diagrama da aplicação do método B-COSFIRE .....	69
Figura 28 - Passos da construção da curva de Koch .....	71
Figura 29 - Variações de densidade calculadas com box counting .....	72
Figura 30 - Box Counting em 2D com um exemplo de objeto .....	74
Figura 31 - Diferença na dimensão fractal usando “Contagem de Caixas” .....	75
Figura 32 – Exemplos de pontos de referência em cada par de imagens.....	78

Figura 33 – Contagem de vasos por quadrante nos pontos de referência.....	79
Figura 34 - Resultado obtido em relação à iluminação .....	81
Figura 35 - Resultados negativos com LED .....	82
Figura 36 - Resultado da segmentação sobreposta à imagem original.....	83
Figura 37 - Configurações padrões do B-COSFIRE.....	84
Figura 38 - Níveis de variação de sigma .....	85
Figura 39 - Utilização de sigma mais elevado .....	86
Figura 40 - Gráfico comparativo luz de LED x Luz Normal .....	88

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens de alguns ensaios de angiogênese <i>in vivo</i> ..	20
Quadro 2 - Vantagens e desvantagens do uso da CAM na Biologia Geral e na Metodologia.....	21
Quadro 3 - Formas de quantificação ou verificação de resultados.....	23
Quadro 4 - Índices de IRC e Eficiência Luminosa em alguns tipos de lâmpadas.....	28
Quadro 5 - Aumento da temperatura das lâmpadas com o tempo de utilização .....	36
Quadro 6 - Comparativo de eficiência energética entre lâmpadas (por unidade).....	43
Quadro 7 - Características dos LEDs comerciais usados no projeto .....	55
Quadro 8 – Tipos diferentes de fractais .....	73
Quadro 9 – Compostos em sequência de concentração.....	87



## LISTA DE ACRÔNIMOS

AVR	Automatic Voltage Regulator
CAM	ChorioAllantoic Membrane
CLAHE	Contrast-Limited Adaptive Histogram Equalization
CORF	Combination of Receptive Fields
COSFIRE	Combination of Shifted Filter Responses
DoG	Difference of Gaussians
FOV	Field-of-view
IDE	Integrated Development Environment
IoT	Internet of Things
LED	Light emitter diode
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PWM	Pulse Width Modulation
ROC	Receiving operator characteristics
SVM	Support Vector Machines
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1	O problema .....	13
1.2	Objetivo Geral.....	13
1.3	Objetivos Específicos.....	13
1.4	Estrutura do Texto .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
2.1	Angiogênese tumoral e regenerativa .....	15
2.1.1	Fatores para formação de novos vasos sanguíneos .....	16
2.1.2	Análise laboratorial da Angiogênese.....	19
2.1.3	Anexos embrionários e a formação da CAM .....	24
2.1.4	Etapas do desenvolvimento embrionário de um frango. ....	26
2.2	Observação - Iluminação com microscópio estereoscópico (Lupa).....	27
2.2.1	Índice de Reprodução de Cor (IRC) e Eficiência Luminosa.....	28
2.2.2	Comparativo entre lâmpadas Incandescente, halógenas e LEDs.....	29
2.2.3	Influência térmica.....	35
2.2.4	Benefícios do LED em relação às lâmpadas incandescentes e halógenas .....	37
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1	Equipamento disponível.....	40
3.1.1	A altura do objeto analisado .....	41
3.1.2	Problemas de iluminação observados durante os procedimentos .....	41
3.1.3	Fatores que dificultam a captura da imagem .....	42
3.2	Iluminação do objeto a ser estudado .....	43
3.2.1	Controle de luminosidade .....	44
3.2.2	<i>Duty Cycle</i> .....	46
3.2.3	Circuito de controle com a utilização do Arduino .....	48
3.2.4	IDE do Arduino.....	48
3.2.5	Implementação do PWM com Arduino.....	49
3.2.6	Circuito de Potência.....	53
3.2.7	Medidas e posicionamento dos LEDs.....	55

3.3	Quantificação dos resultados.....	58
3.3.1	Descrição do método B-COSFIRE.....	60
3.3.2	Etapas de Pré-Processamento .....	66
3.3.3	Aplicação do filtro B-COSFIRE .....	68
3.3.4	Avaliando a densidade com Fractais .....	69
<b>4</b>	<b>RESULTADOS e DISCUSSÕES.....</b>	<b>77</b>
4.1	Avaliação inicial .....	77
4.2	Segmentação por processamento de imagem .....	80
4.3	Análise estatística das amostras.....	87
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
5.1	Trabalhos Futuros.....	90
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>
	<b>ANEXO 1 – LEDs Características Técnicas.....</b>	<b>102</b>
	<b>ANEXO 2 – Código do Arduino .....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Angiogênese é um processo fisiológico no qual ocorre a formação de novos vasos sanguíneos a partir de um pré-existente sistema de vascularização. Após o crescimento, a vascularização adulta é mantida estática, situação que pode ser quebrada a qualquer momento para a formação de novos vasos sanguíneos por processos como um corte ou através de tumores. O processo pode também ser desacelerado, parado ou revertido por outros agentes antiangiogênicos como os antineoplásicos (KERBEL e FOLKMAN, 2002; DERYUGINA, 2016).

Os fenômenos angiogênicos pertencem a uma grande área da pesquisa científica, a dos vasos sanguíneos. Numerosos ensaios *in vivo* são desenvolvidos (JAIN et al., 1997), tanto em tecidos humanos quanto não humanos. Em geral, esses ensaios consomem tempo e recursos, tanto nas etapas de preparação e execução, quanto na análise e interpretação de resultados.

Ensaio angiogênicos *in vivo* são geralmente menos custosos e mais rápidos de serem interpretados por isso têm ganhado popularidade (DONOVAN et al., 2001) e têm permitido importantes progressos na elucidação do mecanismo de ação de muitos fenômenos angiogênicos e antiangiogênicos, sendo razoável reservar o termo “fator angiogênico” para substâncias que produzem crescimento de novos vasos em ensaios *in vivo* (RIBATTI et al., 2006). Os principais fatores que determinam a escolha de um método são o custo, facilidade de uso, reprodutibilidade e a confiabilidade. Um desses métodos é o uso da Membrana Corioalantoica (CAM) do embrião da galinha que será a fonte desse estudo (GHAFFARI-TABRIZI-WIZSY et al., 2019).

As variadas características que os ovos de galinha apresentam como: coloração e espessura da casca, coloração e estágio de desenvolvimento do embrião, nível de saturação, densidade e hidratação dos líquidos envolvidos, tornam o processo dependente de um ajuste fino de luminosidade para cada situação durante a fase de observação.

O objetivo deste trabalho foi o de utilizar um método de iluminação mais favorável à coleta de imagens por meio de microscópio estereoscópico (lupa), para posterior análise visual de vasos sanguíneos e tumores gerados na membrana corioalantoica de embriões de galinha. O método proposto é baseado em iluminação LED em pontos estratégicos da amostra, permitindo o isolamento de interferências

externas e o ajuste da iluminação de forma individual para cada membrana observada. As imagens da CAM obtidas utilizando-se o método de iluminação proposto, em comparação às aquelas obtidas com a iluminação original do microscópio estereoscópico, permitem melhor visualização, tanto dos vasos mais proeminentes, quanto daqueles mais sutis e profundos.

### **1.1 O problema**

O problema ao qual este trabalho se dedicou foi o de melhorar a observação e a captura de imagens, de forma mais detalhada e profunda de vasos sanguíneos na membrana corioalantoica de embriões de galinha.

### **1.2 Objetivo Geral**

Desenvolver um aparato para melhorar a qualidade e o controle da iluminação dos vasos sanguíneos da CAM em ovos de galinha, e um método computacional para a quantificação automática da densidade dos vasos.

### **1.3 Objetivos Específicos**

Para atingir o objetivo geral, são considerados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar os procedimentos de rotina do laboratório para a documentação de experimentos com a CAM e levantar os principais problemas encontrados durante as capturas de imagens.
- Analisar as dificuldades técnicas e ambientais que interferem na captura de imagens com melhor qualidade e desenvolver um corpo de iluminação que elimine ou diminua essas dificuldades.
- Desenvolver uma forma de melhoria na captura de imagens de vasos sanguíneos na CAM, com embasamento científico e aproveitando recursos já disponíveis.
- Quantificar a densidade de vasos usando metodologias já validadas em outros trabalhos científicos, de forma a possibilitar a automatização do processo.

## 1.4 Estrutura do Texto

Este trabalho está dividido em 4 capítulos:

No Capítulo 1 está a introdução no qual são apresentados o problema, o objetivo geral e os objetivos específicos da pesquisa.

O Capítulo 2 contém a revisão bibliográfica dos tópicos necessários para realização da pesquisa. Nele são descritos os principais fatos referentes à angiogênese, como ela procede em seu aparecimento, características que são influentes à sua manutenção e desenvolvimento e sua relação com a membrana corioalantoica. Também nesse capítulo são descritas características de iluminação, fazendo um comparativo entre lâmpadas tradicionais que são utilizadas nos equipamentos disponíveis e as mais modernas, o que dará um melhor entendimento em relação à escolha de tais materiais para desenvolvimento de um corpo de iluminação para aperfeiçoamento na observação da membrana corioalantoica em ovos de galinha, mais especificamente de seus vasos sanguíneos.

O Capítulo 3 apresenta uma descrição dos equipamentos utilizados em laboratório atualmente, suas capacidades e limitações, características que foram trabalhadas e aperfeiçoadas nesse trabalho. Em seguida é descrita a construção do controle de ajustes de iluminação e um corpo de iluminação que foi projetado em função das melhorias implementadas. Por fim são descritos sistemas de processamento de imagem onde os vasos são segmentados usando softwares descritos na literatura para esses fins. Com as imagens segmentadas, suas densidades são comparadas para avaliação do resultado.

No Capítulo 4 são apresentadas as características observadas, os resultados e análises estatísticas para avaliação e conclusão dos dados obtidos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Para entendimento da questão analisada, das funções e propostas, existe a necessidade de um conhecimento prévio do objeto de estudos, suas principais características, assim como o ambiente de trabalho com suas limitações.

### 2.1 Angiogênese tumoral e regenerativa

O sistema vascular é composto por vasos sanguíneos que são revestidos por células endoteliais (FOLKMAN, 2002), essa rede permite o transporte de moléculas e células no organismo. As células endoteliais agem como uma barreira semipermeável e controlam as trocas metabólicas entre as células da circulação e o tecido subjacente. Adicionalmente, o endotélio contribui para diversos processos fisiológicos, incluindo a coagulação, inflamação e angiogênese.

A angiogênese é caracterizada pelo crescimento de novos vasos sanguíneos para fora dos capilares preexistentes, as células endoteliais são as mais importantes. Para iniciar o crescimento dos vasos sanguíneos, as células endoteliais (compõem o interior dos vasos) precisam estar ativas. A estimulação dessas células desencadeia uma cascata de sinalização rigidamente regulada, incluindo a degradação da matriz extracelular, brotamento, proliferação, migração e formação do tubo. Diante disso, novos vasos são formados e o processo de angiogênese termina com a deposição de nova matriz extracelular, atração de pericitos para a estabilização do vaso e retorno do fenótipo das células endoteliais ao repouso. Os pericitos são células que revestem externamente os vasos sanguíneos, desempenhando um importante papel na estabilização e no suporte desses vasos, além disso, eles exercem funções de interação com outras células que estão em seu microambiente (HOLZMANN et al., 2010; POTENTE et al., 2011; GRIFFIOEN e THIJSSSEN, 2014).

A vascularização dos tumores é heterogênea, apresentando regiões que mostram necrose ou hemorragia, bem como regiões que são densamente vascularizadas a fim de manter um fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio para o crescimento rápido do tumor (RIBATTI, 2014; DERYUGINA, 2016).

Os vasos sanguíneos do tumor apresentam várias anomalias em comparação com vasos fisiológicos normais, incluindo frequentemente uma

proporção relativamente alta de proliferação de células endoteliais, aumento da tortuosidade, deficiência em pericitos e formação da membrana basal anormal. Isso resulta em reforçada permeabilidade da vasculatura do tumor podendo ser regulada por vários mediadores, tais como o fator de crescimento vaso endotelial (VEGF), bradicinina, óxido nítrico, prostaglandinas e metaloproteinases da matriz (BRIGGER et al., 2012). O crescimento e potencial metastático da maioria dos tumores, tanto sólidos quanto hematológicos, são dependentes de angiogênese. Os tumores podem persistir no local por um período considerável de tempo que pode variar de meses a anos sem a formação de nova vascularização (MICHAEL e JAKOB, 2014). Folkman (1971) foi o primeiro a descrever que os tumores sólidos requerem o crescimento de novos vasos sanguíneos para suprimento de oxigênio e nutrientes.

### **2.1.1 Fatores para formação de novos vasos sanguíneos**

Alguns fatores são mais importantes na formação de novos vasos sanguíneos na angiogênese, promovendo seu crescimento, ramificação, penetração e metástase. Cada uma dessas etapas proporciona oportunidades de estudo para ações inibitórias com uso de agentes antiangiogênicos, sendo aí uma forma bastante prática para a descoberta e o desenvolvimento de novas terapias para o câncer (VINAYAK et al., 2014).

Tanto em tumores quanto em processos regenerativos, vários mecanismos estão envolvidos no processo de formação de novos vasos sanguíneos, entre eles:

a) Cooptação vascular: mecanismo próprio de tecidos ricamente vascularizados. Devido à farta oferta de microvasos no tecido sadio, as células tumorais migram para a transição entre a membrana basal endotelial e a célula endotelial propriamente dita, permitindo contato íntimo com a corrente sanguínea. Para viabilizar este processo, as células tumorais secretam VEGF em grande quantidade para inibir a apoptose da célula endotelial. Participam o receptor Tie-2, a angiopoetina e o VEGF (STUTTFELD e BALLMER-HOFER, 2009).

b) Angiogênese por brotamento: consiste na degradação proteolítica da matriz extracelular, seguida pela atração quimiotática e proliferação de progenitores endoteliais e células endoteliais circulantes. As células epiteliais se reorganizam e terminam sua maturação funcional (RISAU, 1997).



c) Angiogênese intussusceptiva: Nesse tipo de formação de vasos, a parede capilar se estende para o lúmen para dividir um único vaso em dois. Existem quatro fases da angiogênese intussusceptiva. Primeiro, as duas paredes capilares opostas estabelecem uma zona de contato. Segundo, as junções celulares endoteliais são reorganizadas e a bicamada do vaso é perfurada para permitir que fatores de crescimento e células penetrem no lúmen. Terceiro, um núcleo é formado entre os dois novos vasos na zona de contato que é preenchida com pericitos e miofibroblastos. Essas células começam a depositar fibras de colágeno no núcleo para fornecer uma matriz extracelular para o crescimento do lúmen do vaso. Finalmente, o núcleo é desenvolvido sem alterações na estrutura básica (CADUFF et al., 1986).

d) Vasculogênese: Desenvolvimento de novos vasos durante a fase embrionária. O movimento de precursores de células endoteliais a partir da medula óssea ou do sangue periférico para o revestimento endotelial dos novos vasos. Células progenitoras derivadas da medula óssea contribuem significativamente para a neovascularização em uma variedade de tumores (FOLKMAN, 1995; MICHAEL e JAKOB, 2014).

O processo de angiogênese é controlado por um equilíbrio de fatores promotores e inibidores angiogênicos. A transição entre um fenótipo não angiogênico para angiogênico pode ocorrer quando os tumores se expandem e permitem que algumas células que estão fora do limite de difusão de oxigênio entrem em hipóxia (LIU et al., 2014). As células tumorais respondem à hipóxia pela ativação do fator de hipóxia-indutível, um fator de transcrição que ativa os genes envolvidos no processo de angiogênese, tal como o fator de crescimento vaso endotelial (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e a sintase de óxido nítrico. Proteínas pró-angiogênicas excedem, eventualmente, a concentração local de inibidores angiogênicos, permitindo que ocorra angiogênese, com o objetivo de suprir as necessidades tumorais para permitir o seu crescimento (LIU et al., 2014). De todas as vias de sinalização envolvidas na angiogênese tumoral, a mais proeminente e melhor caracterizada é a via VEGF, uma vez que executa uma função-chave em todas as etapas. A vasculatura tumoral induzida pelo VEGF tem uma série de anormalidades estruturais e funcionais que suportam o crescimento do tumor, incluindo o aumento da permeabilidade (LIU et al., 2014).

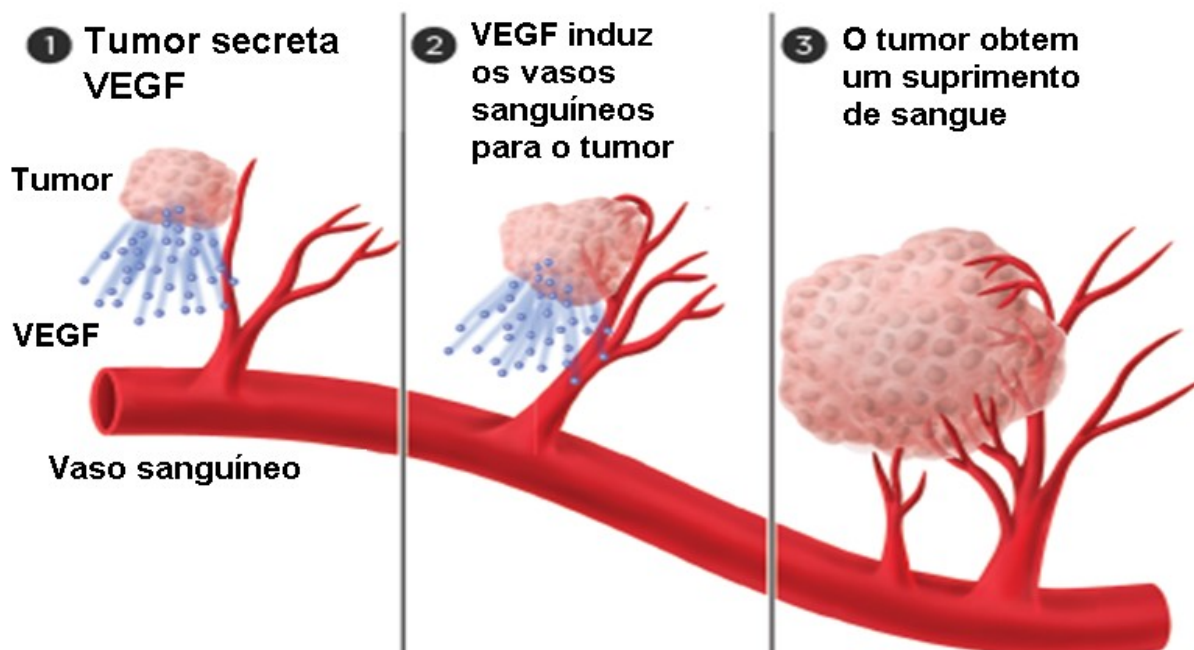
VEGF é o regulador central da angiogênese. É o principal representante de uma família de citocinas intimamente relacionadas às funções críticas na angiogênese patológica e fisiológica. Ele aumenta a permeabilidade vascular ao plasma e às proteínas plasmáticas, um traço característico da microvasculatura do tumor e um passo crítico no início da geração do estroma tumoral. É um mitógeno seletivo para o endotélio vascular, porque os seus principais receptores tirosina-quinase são seletivamente (embora não exclusivamente) expressos sobre o endotélio vascular, e, além disso, é sobre expresso em uma variedade de células tumorais humanas incluindo o cérebro, cólon, trato gastrointestinal, ovário e mama (CRISTINA et al., 2014). Uma vez que o endotélio pode ser um alvo ou um fator causal de doença, a sua avaliação é uma ferramenta valiosa na investigação clínica. A avaliação integrada da função e disfunção endotelial incorporando, por exemplo, coagulação, propriedades inflamatórias, e tônus vascular são estritamente importantes (MUNARON, 2015).

Uma excessiva e desregulada angiogênese contribui para o desenvolvimento do câncer e de outras doenças (FERRARA e KERBEL, 2005). Mais precisamente, a angiogênica formação de vasos sanguíneos em tumores é um processo interativo entre tumor, endotélio (interior dos vasos sanguíneos) e células estromais (ligação entre tecidos e órgãos), para criar uma rede responsável por suprir com oxigênio e nutrientes necessários o crescimento tumoral.

Células cancerígenas perdem o controle e a habilidade de realizar mitose, de um modo controlado. Um tumor maligno consiste de uma população de células que se dividem e crescem rapidamente. Os tumores induzem a angiogênese, pela secreção de vários VEGF.

O VEGF (Figura 1) pode induzir o crescimento de vasos para tumor, suprindo a necessidade de nutrientes e permitindo sua expansão. Portanto, a angiogênese é um passo necessário e requerido para a transição de um minúsculo foco de células neoplásicas para um grande tumor maligno. A angiogênese também está relacionada à metástase, na qual células cancerígenas podem romper as paredes de um tumor, tomando a rede de vasos e sendo carregadas pelo sangue para outras regiões distantes, implantando-se e crescendo como outro tumor (DOUKAS et al., 2008).

Figura 1 - VEGF induzindo o crescimento de novos capilares



Fonte: Adaptado de Doukas et al. (2008)

### 2.1.2 Análise laboratorial da Angiogênese

Os ensaios para estudo da angiogênese *in vivo* (Quadro 1), incluem, a íris ou a córnea vascularizada dos olhos de roedores; embriões de galinhas (RIBATTI e VACCA, 1999); implantes subcutâneos em roedores que permitem testes com substratos tridimensionais incluindo, por exemplo, esponja de poliéster (ANDRADE et al., 1987), pesquisas com embriões de peixe-zebra podem representar novas modalidades para estudo de mecanismos de angiogênese e angiossupressão durante seu desenvolvimento (SERBEDZIJA et al., 1999). Muitas dessas técnicas são complexas, difíceis de reproduzir, requerem muitos animais e podem tornar os procedimentos caros. Muitas dessas limitações diminuem significativamente em ensaios com embriões de galinhas, mais objetivamente com a membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM) (RIBATTI et al., 2006; RIBATTI, 2016).

**Quadro 1 - Vantagens e desvantagens de alguns ensaios de angiogênese *in vivo*.**

<b>Ensaio</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Olhos de roedores	Novos vasos são facilmente identificados	Angiogênese atípica, como a córnea normal é avascular
	Local imunologicamente privilegiado	Tecnicamente exigente
	Permite monitoramento não invasivo e de longo prazo	Técnica traumática Resposta inflamatória não específica com alguns compostos
Implante de esponja / matriz	Tecnicamente simples	Encapsulado por tecido de granulação
	Baixo custo	Demorado
	Bem tolerado	Resposta inflamatória inespecífica
	Adequado para o estudo da angiogênese tumoral	
Matrigel plug	Tecnicamente simples	Matrigel não é quimicamente definido
	Adequado para triagem em larga escala	Análise em plugues consome muito tempo
	Análise quantitativa rápida	Caro
Câmara de orelha de coelho	Preparação óptica mais clara para microscopia intravital	Procedimento tecnicamente exigente, resposta inflamatória inespecífica.
	Permite monitoramento de longo prazo	Caro
Peixe-zebra	Animal inteiro intacto	Não mamífero
	Permite análise genética do desenvolvimento de vasos	
	Grande número de animais disponíveis para análise estatística	
Ratos (LOKMAN et al., 2012)	Longo Período de observação (Semanas a Meses)	Experimentos longos (Meses a anos)

	Biologia e fisiologia bem conhecidas, mas também complexas	Dispendioso
	Disponibilidade de imagens <i>in vivo</i>	Sistema imunológico maduro
	Fundo genético definido	Requer grande número de animais
		Os animais precisam ser contidos

Fonte: Ribatti (2017)

Uma das mais populares técnicas de ensaio em tecidos para estudo do fenômeno da angiogênese é a avaliação dos tecidos que se desenvolvem em um embrião de galinha chamada membrana corioalantoica ou alantocócion (CAM) (DOUKAS et al., 2008; RIBATTI, 2016; HUANG, 2017). CAM é uma estrutura altamente vascular que reveste a superfície interna da casca do ovo. O estudo da formação dessas membranas, seus diferentes estágios de desenvolvimento é um eficiente indicativo para esse fenômeno (Quadro 2).

**Quadro 2 - Vantagens e desvantagens do uso da CAM na Biologia Geral e na Metodologia**

Aspecto	Vantagens	Desvantagens
Biologia geral	Fáceis de usar	A origem do ensaio em frango limita a disponibilidade de reagentes
	Viabilidade de realizar vários testes em indivíduos CAMs	A própria CAM está passando por rápidas mudanças tanto morfológica quanto em termos da mudança gradual na taxa de células endoteliais
	Rápido crescimento vascular	Proliferação durante o curso do desenvolvimento embrionário
	Visualização de ensaios em tempo real	Imunodeficiência
	Completa acessibilidade ao sistema circulatório (para entrega de moléculas intravasculares)	Contém uma rede vascular bem desenvolvida, o que dificulta a discriminação entre os novos capilares e os já existentes.

	Ambiente <i>in vivo</i>	Sensível a fatores ambientais
	Excelente modelagem de sistemas mais complexos	Diferenças no metabolismo de medicamentos em mamíferos
	Nenhum requisito para aprovação de protocolo animal	A casca (ou outros irritantes) pode induzir angiogênese
Metodologia	Monitorização ao longo do curso do ensaio	As diferenças relacionadas às espécies precisam ser levadas em consideração na interpretação dos resultados obtidos em animais experimentais
	Plataforma de triagem rápida	Escolha complexa de protocolos disponíveis
	Acessibilidade a diferentes calibres e tipos	Metabolismo / farmacocinética de medicamentos alternativos quando comparados a outros modelos <i>in vivo</i> (mamíferos)
	Reprodutibilidade e confiabilidade	A administração de drogas orais não pode ser testada
	Relação custo-benefício	
		Tempo de observação do tratamento pós-tratamento

Fonte: Nowak-Sliwinska et al. (2014); Ribatti (2016)

Pesquisas envolvendo o uso da CAM requerem a quantificação da vascularização para comparação dos efeitos estimuladores ou inibidores provocados por diversos agentes. Essa quantificação pode ser obtida através da análise de imagens, onde são medidos os diâmetros e comprimentos dos vasos, junções, pontos por seção, coloração dos vasos ou outras características que demonstrem a evolução da área estudada (Quadro 3).

**Quadro 3 - Formas de quantificação ou verificação de resultados.**

<b>Atributo</b>	<b>Sigla</b>	<b>Descrição</b>	<b>Artigos</b>
Comprimento do vaso	Vessel length	Acompanhamento de crescimento	(DOUKAS et al., 2008)
Diâmetro do vaso	VDI (vessel diameter index)	Acompanhamento das mais calibrosas	(DOUKAS et al., 2008)
Vascularização	VLD (Vessel length density) VDI(%) - vessel density index.	Ramificações em quantidade e comprimento, densidade	(BLATT et al., 2004) (YANG et al., 2005) (DOUKAS et al., 2008) (ANTTI et al., 2005)
Textura	Textural Information	Exame de superfície	(DOUKAS et al., 2008)
Junções (Comprimento e espessura)	Vessel Branching Points	Contagem de junções	(BO et al., 2009) (DOUKAS et al., 2008)
Pontos por sessão	Point Counting	Média de pontos por sessão	(RIBATTI et al., 1996)
Coloração dos vasos (Pode ser por química, iluminação ou imagem)		Variações de cores ao longo do tempo	(DOMENICO e ROBERTO, 2018)
Histograma (Contagem Pixels)		Diferença entre superfícies	(DOMENICO e ROBERTO, 2018)
Gases		Trocas gasosas	(RIBATTI et al., 2006)
pH variações		Comparado por emissões fluorescentes	(FERREIRA et al., 2017)
Temperatura			(FERREIRA et al., 2017)
Hemoglobina		Alguns laboratórios de pesquisa usam o conteúdo de hemoglobina como um marcador para a angiogênese	(CHEN et al., 2008)

**Fonte: Autoria própria.**

### 2.1.3 Anexos embrionários e a formação da CAM

Os anexos embrionários são estruturas membranosas extraembrionárias que surgem durante o desenvolvimento embrionário de alguns animais vertebrados a partir dos folhetos germinativos (HAMBURGER e HAMILTON, 1951). Existem quatro tipos principais de anexos embrionários: o saco vitelínico, o âmnio, córion e o alantoide (Figura 2). Toda essa estrutura dará suporte no desenvolvimento do embrião.

O saco vitelínico serve como uma bolsa de armazenamento de nutrientes para o desenvolvimento do embrião, boa parte da gema está contida no saco vitelínico. Sua estrutura é formada a partir do mesoderma e endoderma, que envolve o vitelo, participando assim do processo de nutrição do animal em desenvolvimento. Essa membrana é a primeira a ser formada e está ligada diretamente ao intestino do embrião.

O âmnio ou bolsa amniótica é uma bolsa d'água que possibilita às aves e répteis que seus ovos se desenvolvam fora da água. Ela é formada a partir do ectoderma e mesoderma que envolve o embrião de répteis, aves e mamíferos. Ele delimita a chamada cavidade amniótica, a qual apresenta em seu interior o líquido amniótico. Possui função protetiva contra a desidratação, contra a adesão de tecidos e contra choques mecânicos.

O córion, também chamado de serosa, é uma membrana formada a partir do mesoderma e ectoderma que recobre todo o embrião e os outros anexos embrionários. Em répteis e aves, ela está localizada logo abaixo da casca do ovo e atua junto ao alantoide nas trocas gasosas trocando o oxigênio e o gás carbônico com o ambiente externo, além de proteger o embrião.

O alantoide ou alantoico é uma estrutura que possui algumas funções próprias e outras aliadas ao córion (GABRIELLI e ACCILI, 2010):

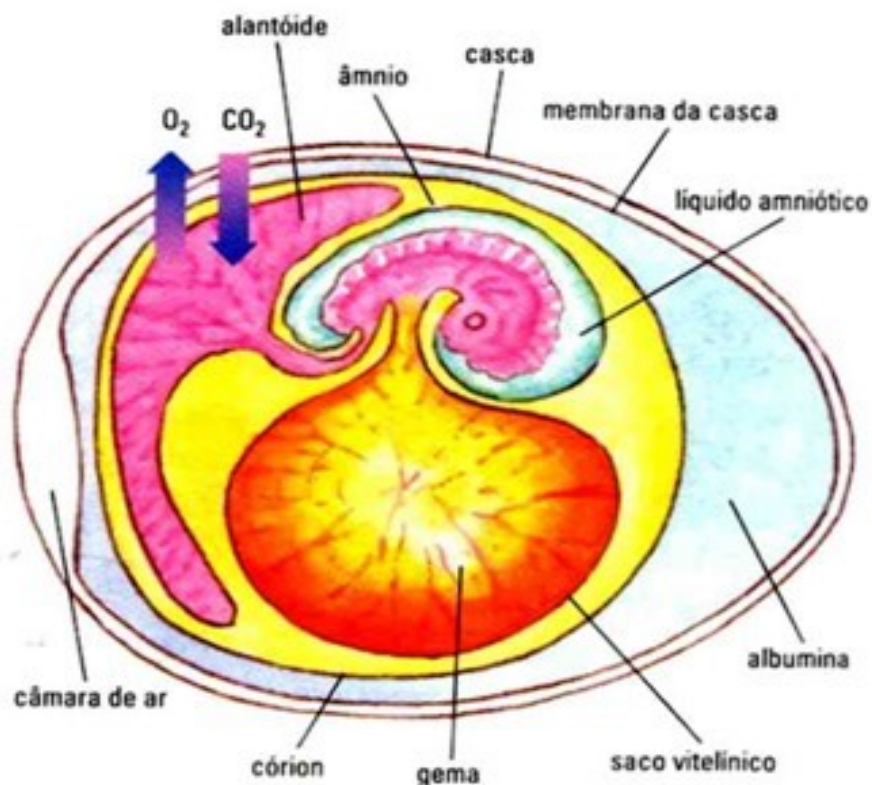
- Armazenar e descartar as excretas metabólicas, produtos residuais dos rins, que o embrião produz durante o seu desenvolvimento.
- Transferência de cálcio da casca do ovo para o embrião para a formação de seus ossos.
- Ajuda o córion nas trocas gasosas com o ambiente.
- Responsável pelo equilíbrio ácido-base.



- Reabsorção de água e eletrólitos a partir do alantóide

O alantóide é uma membrana extraembrionária derivada da mesoderme com células primitivas de sangue que começam a ganhar corpo a partir do 3º dia de desenvolvimento como uma projeção do intestino grosso. No 4º dia o alantóide se funde com o córion e forma o alantocóron (Figura 2). Até o 8º dia de incubação, primitivas continuam a se proliferar para diferentes lados em um sistema de artérias e então originando uma rede de capilares que migram para ocupar a área abaixo do córion e mediando trocas gasosas com os ambientes. As do CAM crescem mais rapidamente a partir do 11º dia, após isso as células endoteliais decrescem seus índices de crescimento, assim o sistema vascular atinge um final de etapa no 18º dia de incubação, pouco antes de eclodir (RIBATTI et al., 1996).

**Figura 2 - Anexos embrionários de um ovo em desenvolvimento**

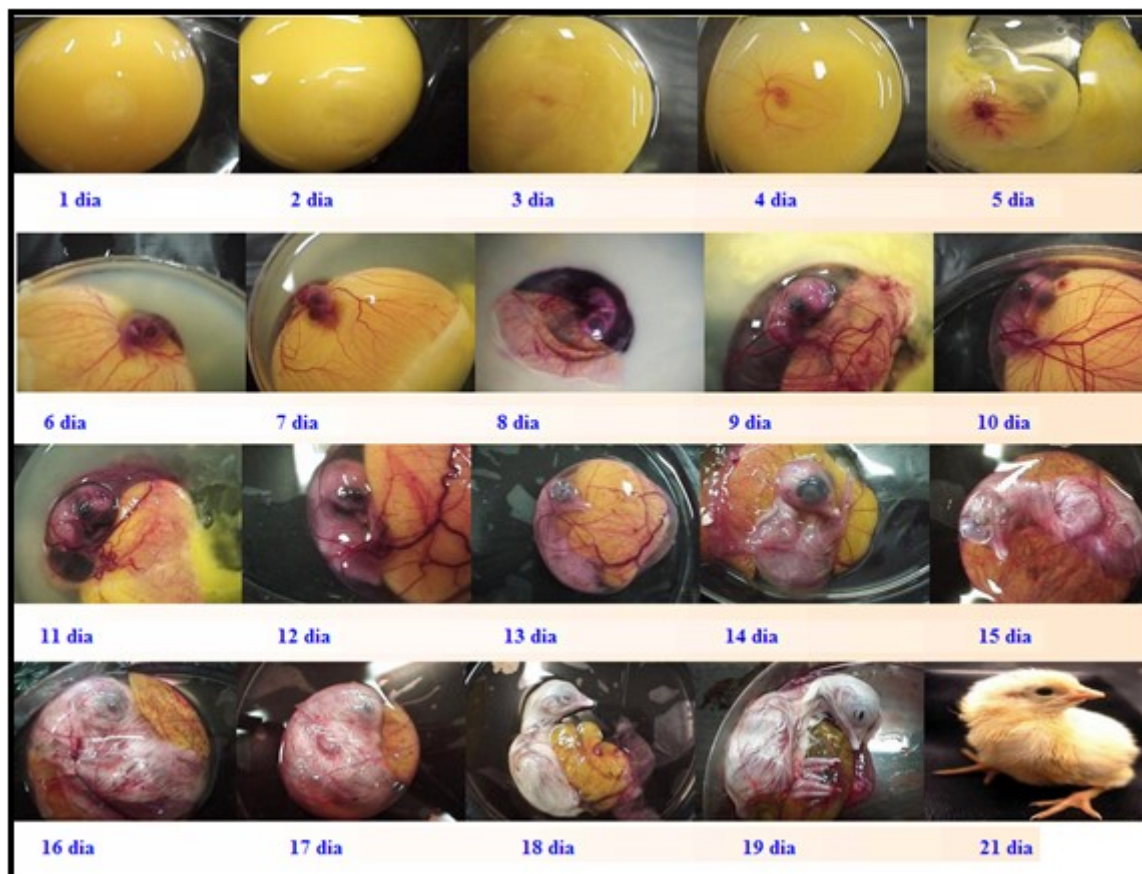


Fonte: Imagem de domínio público

### 2.1.4 Etapas do desenvolvimento embrionário de um frango.

Sequência de alguns fatos importantes que podem ser observados durante o desenvolvimento embrionário do ovo de galinha (COBB, 2020), essa sequência pode ser visualizada na (Figura 3).

Figura 3 - Etapas do desenvolvimento de um ovo de frango



Fonte: Cobb (2020)

- Dia 1 – Início da formação do aparelho digestivo, do sistema nervoso e dos olhos; e aparecimento das ilhotas de sangue.
- Dia 2 – Formação do coração e dos vasos sanguíneos. Início dos batimentos cardíacos.
- Dia 3 – Vasos sanguíneos começam a se tornar visíveis. Início da formação das narinas.
- Dia 4 – Início do desenvolvimento dos membros. O alantoide se funde ao córion.

- Dia 5 – Formação do estômago verdadeiro (proventrículo) e do estômago mecânico (moela).
- Dia 6 – Começam os movimentos voluntários.
- Dia 7 – O abdome se torna saliente devido ao desenvolvimento das vísceras.
- Dia 8 – Início da formação das penas.
- Dia 9 – As características da ave começam a ficar evidentes.
- Dia 14 – Embrião vira a cabeça em direção à parte mais larga do ovo.
- Dia 15 – O intestino é absorvido para dentro da cavidade abdominal.
- Dia 16 – Albumina praticamente inexistente.
- Dia 17 – O bico está voltado para a câmara de ar.
- Dia 19 – Saco vitelino absorvido para dentro da cavidade abdominal.
- Dia 20 – O embrião rompe as membranas que o envolve e começa a respirar através da câmara de ar.
- Dia 21 – Começa a bicar a casca para eclodir.

## **2.2 Observação - Iluminação com microscópio estereoscópico (Lupa)**

Como o microscópio estereoscópico (Leica zoom 2000) utiliza uma lâmpada halógena e uma incandescente, torna-se importante fazer uma comparação com métodos de iluminação mais atuais e verificar se os resultados podem ser favoráveis para se obter imagens de melhor qualidade. As imagens obtidas muitas vezes não conseguem capturar as nuances existentes, pois elas ficam obscurecidas por falta de luminosidade ou então distorcidas por emissões de frequência de luz que não condizem com os padrões visuais do olho humano.

Nas últimas décadas as lâmpadas incandescentes foram amplamente utilizadas, tornando-se mais populares. Porém, com a busca por eficiência energética, vários outros tipos de lâmpadas foram criadas e cada uma tem suas características de frequência de luz irradiada, brilho e aproveitamento melhor da energia dissipando menos calor dessa forma.

Em 2014 os cientistas japoneses Isamu Akasaki, Hiroshi Amano e Shuji Nakamura receberam o Prêmio Nobel de Física (NOBEL 2014, 2020) pelo desenvolvimento do LED azul, trabalho realizado nos anos de 1990. Com LEDs azul

eficiente foi possível uma combinação das cores primárias, vermelho, verde e azul para produção da luz branca. Essa inovação trouxe uma nova perspectiva em termos de iluminação, com lâmpadas mais eficientes e com baixo consumo energético.

### 2.2.1 Índice de Reprodução de Cor (IRC) e Eficiência Luminosa

Um mesmo objeto quando exposto a diferentes fontes de luz, reflete as ondas de formas distintas e desta forma gera uma impressão de possuir tonalidades de cor diferentes. A capacidade de uma lâmpada de reproduzir cores é denominada Índice de Reprodução de Cor (IRC). O IRC é dado por uma escala de 0% a 100%. O sol possui IRC de 100%, pois consegue reproduzir perfeitamente as cores sobre certo objeto iluminado, para a capacidade de percepção do olho humano. Para uma lâmpada possuir um bom IRC, sua capacidade de reproduzir cores deve ser acima de 80% (SALES, 2011). No Quadro 4 é mostrado a variação do IRC em um determinado objeto, onde se pode observar que um IRC entre 60% e 70% é considerado ruim, entre 80% e 90% é bom e acima de 90% é excelente (SALES, 2011).

**Quadro 4 - Índices de IRC e Eficiência Luminosa em alguns tipos de lâmpadas**

Fonte Luminosa	IRC %	Eficiência Luminosa (lm/W)	Vida Média (Horas)
Incandescente	100	10-15	750-1.000
Halógena	100	15-35	1.500-2.000
Fluorescente tubular	80-85	40-100	6.000-24.000
Fluorescente compacta	80	40-80	6.000-24.000
Vapor de mercúrio	40-55	45-58	9.000-15.000
Vapor de sódio	22	80-150	18.000-32.000
Vapor metálico	65-85	65-90	8.000-12.000
Indução	80-90	80-110	60.000
LED	70-95	35-130	25.000-100.000
LED tubular	85	33-97	50.000

Fonte: Sales (2011)

Eficiência Luminosa é um parâmetro que indica o quão eficiente uma fonte luminosa converte em luz a energia que recebe, sendo avaliada pela correlação do fluxo luminoso total emitido, dado em lúmens (lm) e o seu consumo de energia dado pela potência em Watts (W), equação (1).

$$EficiênciaLuminosa \left( \frac{lm}{W} \right) = \frac{FluxoLuminoso(lm)}{Potência(W)} \quad (1)$$

A lâmpada LED é mais econômica porque sua eficiência luminosa é maior do que as das outras lâmpadas. Ou seja, gasta menos energia para gerar a mesma iluminação (INMETRO, 2020).

### 2.2.2 Comparativo entre lâmpadas Incandescente, halógenas e LEDs

As lâmpadas incandescentes possuem um filamento de tungstênio, elemento químico de símbolo W (Wolfrâmio), número atômico 74 situado no grupo 6 da classificação periódica dos elementos. O tungstênio é um metal com uma enorme gama de usos, largamente utilizado na forma de carbonetos (W<sub>2</sub>C, WC), como apresenta um ponto de fusão muito elevado ele pode ser transformado em fios muito finos (WAIDE, 2010).

Dentro do invólucro da lâmpada incandescente é adicionado Gás Argônio, que devido à sua ação anticorrosiva, evita a corrosão do filamento de tungstênio. Durante o processo de incandescência, onde o filamento de tungstênio é aquecido pela passagem de corrente elétrica, os átomos de tungstênio irradiados colidem nos átomos desse gás, sem fazer combustão, e podem voltar para o filamento, aumentando a vida útil da lâmpada (WAIDE, 2010).

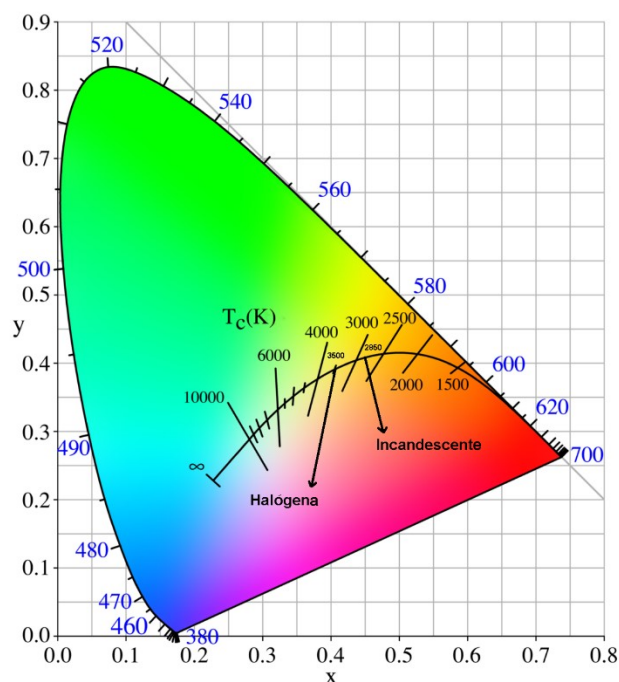
As lâmpadas halógenas também geram iluminação através de filamentos de tungstênio, a diferença é que o gás dentro do bulbo é um composto halogênio (A série química dos halogênios pertence ao grupo 17 ou 7A da tabela periódica). Esse composto reage com os átomos de tungstênio que evaporam com o calor, formando haleto de tungstênio. O haleto circula e chega próximo ao filamento, onde se dissocia e deposita o tungstênio de volta, regenerando o filamento com um aproveitamento maior do que nas regulares. Esse processo permite que o filamento

esquente mais e dessa forma gere uma luz mais branca e bastante brilhante, utilizando menos energia (WAIDE, 2010).

As lâmpadas incandescentes e halógenas são dispositivos resistivos, resultando que grande parte da energia luminosa é dissipada em forma de calor diminuindo sua eficiência luminosa e gerando calor ao seu redor (WAIDE, 2010). Já as lâmpadas de LED são feitas de dispositivos semicondutores com baixa dissipação de energia térmica para gerar energia luminosa melhorando consideravelmente a eficiência e diminuindo o consumo elétrico do mesmo. O Quadro 4 mostra essa variação de eficiência luminosa entre lâmpadas incandescentes, halógenas e LED.

Um fator importante a ser levado em consideração no comparativo entre as lâmpadas halógenas e lâmpadas LED é a questão colorimétrica induzida por essas duas lâmpadas. A halógena tende a ter um comprimento de onda tendencioso ao amarelo e vermelho e conseqüentemente essa tendência influencia a nitidez e a reprodução das demais cores do material observado sendo necessário por vezes o uso de um filtro físico de cor específico para cada tipo de corante ou material. Já a lâmpada de LED possui um comprimento de onda centralizado ao branco que no qual não possui influência direta na quebra cromática de cor no material observado e por isso dispensa o uso de um filtro de cor específico tendo uma influência enorme na resolução final observada (OLIVEIRA et al., 2015). A Figura 4 apresenta os diagramas de cromaticidade CIE de lâmpadas de LED comercializadas, onde variam de espectros quentes (1500K a 5000k) a espectros frios (5500K a 10000K), nessa curva são posicionados os espectros da lâmpada halógena e da incandescente.

**Figura 4 - Diagrama de cromaticidade CIE 1931**



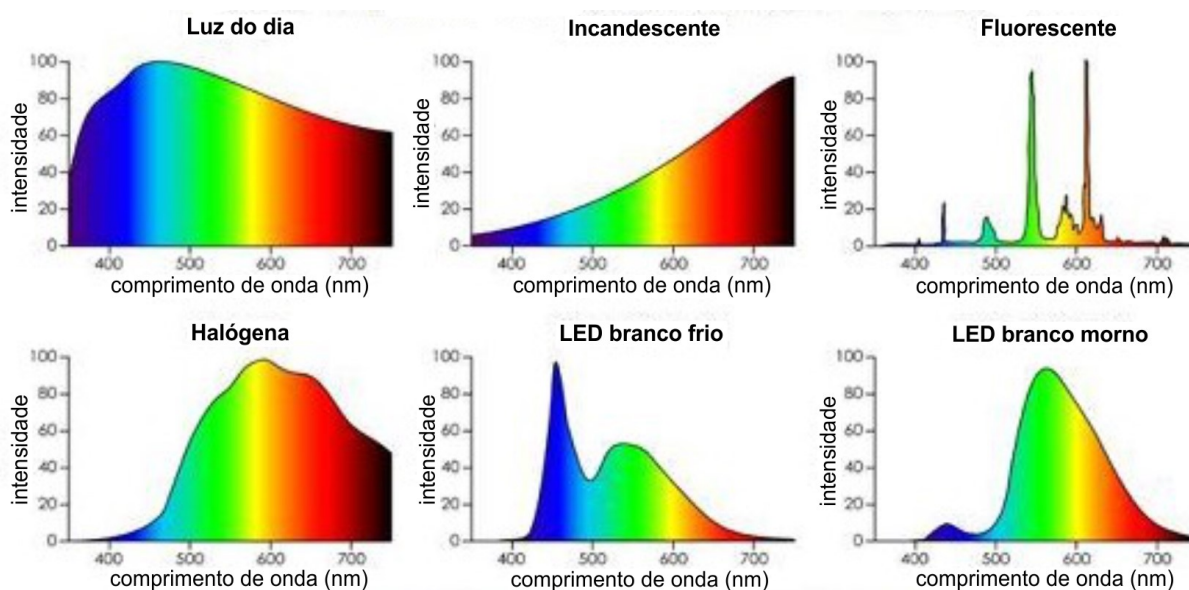
**Fonte: Adaptada de Oliveira et Al. (2015)**

A Figura 5 apresenta a composição espectral de alguns tipos de iluminação. Verifica-se que as lâmpadas incandescentes e as halógenas apresentam um comprimento de onda que atingem o infravermelho ( $> 700\text{nm}$ ), esse comprimento de onda é responsável pela emissão de calor, aumentando assim a temperatura já provocada pelo filamento interno das lâmpadas. As lâmpadas de LEDs possuem comprimento de onda mais elevado na região do verde.

Pela composição espectral, Figura 5, verifica-se porque algumas vezes os microscópios ópticos com iluminação incandescente e/ou halógena geram aberrações cromáticas tendenciosas ao vermelho e amarelo, por possuírem seus picos nos comprimentos de onda próximos às cores mencionadas, o que não ocorre com o LED, fazendo com que as características de contraste e brilho das lâmpadas LED sejam superiores em todos os comprimentos de banda colorimétrica (exceto pelo contraste vermelho). A existência de um filamento aquecido nas lâmpadas halógenas e incandescentes geram radiação infravermelha, tanto no braço quanto na base do equipamento, que por terem essa característica, emitem calor tanto para o objeto a ser estudado quanto ao observador, diferente do que acontece com a lâmpada LED que não gera calor, tornando o trabalho do observador mais confortável (OLIVEIRA et al., 2015).



**Figura 5 - Composição espectral de seis diferentes fontes de luz**



Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2015)

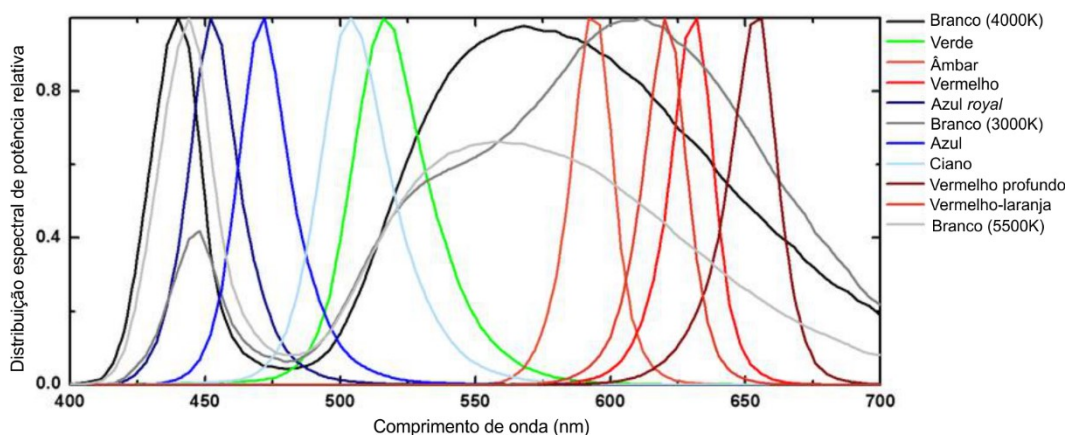
Os LEDs são usados como componentes eletroeletrônicos em vários produtos disponíveis comercialmente, tais como: televisores, painéis, displays, controles, câmeras, monitores, notebooks, telefones celulares etc. São usados também em comunicações, serviços médicos, sinalização e iluminação em geral (KRAMES et al., 2007; AOYAMA e TOSHIKI, 2008). Com a diminuição dos custos de produção e elevação dos níveis de eficiência luminosa, começaram a ser utilizados em instrumentações analíticas.

A Figura 6 mostra o espectro de luz de alguns LEDs coloridos disponíveis no mercado, a luz branca é uma mistura de todos os comprimentos de onda visíveis, conforme mostrado na Figura 6. Junto com o azul proeminente (pico do comprimento de onda na faixa de 455 a 450 nm), existem outros comprimentos de onda, incluindo verde (515 a 570 nm), amarelo (570–600 nm) e vermelho (625–720 nm) que constituem luz branca. Cada cor do LED é representada por coordenadas  $x - y$  únicas, como mostra a Figura 4. As coordenadas de cromaticidade da CIE (Comissão Internacional de Iluminação) são coordenadas de  $x, y$  e  $z$  são uma razão de a estimulação vermelha, verde e azul da luz em comparação com a quantidade total da estimulação vermelha, verde e azul. A soma dos valores RGB ( $x + y + z$ ) é igual a 1. A área branca do diagrama de cromaticidade pode ser expandida e os limites são adicionados para criar cada intervalo de cores.



As temperaturas de cor e o locus de Planckian (Que vai do vermelho-escuro a baixas temperaturas, passando pelo laranja, branco amarelado, branco e, finalmente, branco azulado a temperaturas muito altas) mostram como eles se relacionam com as coordenadas de cromaticidade (HE et al., 2018).

**Figura 6 - Espectros de emissão de LEDs (Ultravioleta/Visível)**



**Fonte: O'Toole e Diamond (2008)**

Os diodos emissores de luz disponíveis comercialmente não se limitam apenas a regiões do visível, mas também cobrem as regiões do ultravioleta e do infravermelho próximo (O'TOOLE e DIAMOND, 2008). Na Figura 6 podem ser vistos espectros típicos de emissão de vários LEDs, comercialmente disponíveis, na faixa espectral do ultravioleta/visível.

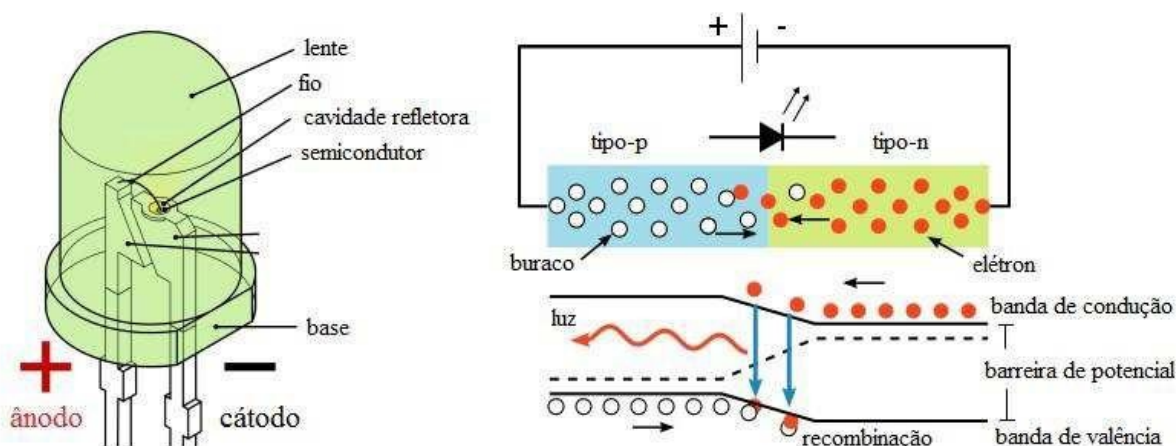
Os diodos são produzidos empregando materiais semicondutores (por exemplo, o silício) aos quais são adicionadas diferentes impurezas dopantes, mediante processo chamado de dopagem (PONTES, 2014). Quando a matriz é baseada no silício ou elemento com configuração eletrônica similar, a dopagem com átomos de elementos do grupo 3 produz o semicondutor do tipo positivo (P). Se a dopagem for realizada com átomos de elementos do grupo 5, o semicondutor obtido é denominado como sendo do tipo negativo (N) (PONTES, 2014). Essas dopagens promovem um aumento da condutividade do semicondutor (Figura 7), devido ao surgimento de lacunas (deficiência de elétrons) no cristal dopado P e ao surgimento de elétrons livres no cristal do tipo N (PONTES, 2014).

Quando se unem cristais dos tipos P e N, forma-se a junção P-N. Os elétrons livres do cristal do tipo N, que estiverem próximos da junção, eventualmente passarão para o lado P, onde serão capturados por lacunas, fazendo recombinação.

Esta recombinação ocorrerá com todos os elétrons e lacunas que estiverem próximos da junção, formando pares de íons próximos da junção (RANGEL et al., 2011). Isto resultará em uma coluna de íons positivos do lado N e uma coluna de íons negativos do lado P. A região em torno da junção onde se encontram esses íons é chamada de camada de depleção. Como a camada de depleção é ionizada, cria-se uma diferença de potencial na junção chamada barreira de potencial (RANGEL et al., 2011).

Os diodos emissores de luz (LEDs) são dispositivos onde a luz é emitida pela passagem de corrente elétrica nos materiais semicondutores fazendo com que ocorra a recombinação de elétrons livres do material do semicondutor N com as lacunas em excesso do tipo P, proporcionando a movimentação em direção à junção P-N do diodo. Este fenômeno ficou conhecido como eletroluminescência (PONTES, 2014), que é a emissão de luz por estímulo elétrico. O componente mais importante de um LED é o chip semicondutor responsável pela geração de luz. Na Figura 7 é ilustrado um diagrama esquemático das partes e do funcionamento de um LED comum.

**Figura 7 - Diagrama e funcionamento de um LED comum**



**Fonte: Adaptado de PONTES (2014)**

A utilização de diferentes materiais semicondutores em diferentes níveis de dopagem proporciona a obtenção de LEDs com diferentes comprimentos de onda, ou seja, uma grande variedade de LEDs que emitem na região Ultravioleta/Visível. Utilizando-se InGaN (Nitreto de Índio Gálio) como material semicondutor, por exemplo, obtêm-se um LED que emite radiação na região verde (CHANG et al., 2012).

Já os LEDs que abrangem a região do azul são constituídos de carbeto de silício e nitreto de gálio (XIE et al., 1993). Desde então, um progresso notável no desempenho do LED em relação ao aumento da eficiência de emissão na região do visível tem melhorado quase uma ordem de magnitude a cada 10 anos (YAM e HASSAN, 2005). Tal desempenho dos LEDs é atribuído principalmente ao grande avanço das novas tecnologias de produção de semicondutores.

Estas tecnologias possibilitaram o desenvolvimento de diodos bicolores, usualmente no verde e vermelho e tricolores emitindo no verde, vermelho e azul. Nestes dispositivos os materiais semicondutores que proporcionam as emissões em diferentes comprimentos de onda são dispostos em um único corpo e podem ser acionados selecionando o par de terminais adequado para produzir a emissão desejada (PONTES, 2014).

A iluminação difusa emitida pelos LEDs ajuda a revelar formas, minimizando sombras acentuadas e realces especulares efeitos que tendem a enfatizar demais elementos texturais específicos ou obscurecê-los completamente. Apesar da maioria dos diodos emissores de luz (LEDs) possuírem estruturas reflexivas embutidas para focar a luz em vários graus, a luz LED é emitida naturalmente em todas as direções com baixa coerência espacial. Isso significa que a luz do LED é adequada para fornecer iluminação difusa e é especialmente eficaz em situações nas quais se deseja menos luz refletida (KERR et al., 2008).

Um detalhe importante para a aplicação no presente estudo é o de se usar LEDs com uma luz neutra ou ligeiramente branca quente e com temperatura de cor não superior a 5500 K. Muitos LEDs comerciais emitem uma quantidade considerável de azul tornando mais difícil de corrigir imagens obtidas mesmo no pós-processamento (KERR et al., 2008).

### **2.2.3 Influência térmica**

Conforme mostrado na composição espectral (Figura 5), as lâmpadas halógenas e incandescentes possuem a radiação na região do infravermelho e apresenta conversão de energia térmica, esse calor gerado é transferido por convecção. A Figura 8 mostra uma imagem com uma câmera térmica tirada do Leica 2000. A temperatura na base do estereomicroscópio (luz transmitida), que é irradiada por uma lâmpada halógena, foi medida após 10 min com o aparelho ligado

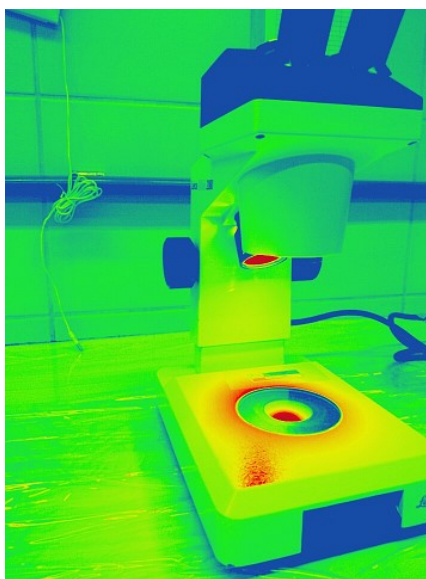
e chegou a 53,1°C. Já na parte de superior (luz refletida), contendo a lâmpada de tungstênio, por ser a mais direta e conseqüentemente a mais influente no processo de iluminação do interior dos ovos, chegou a 76,9°C nos mesmos 10 min de medição. O Quadro 5 mostra a evolução da temperatura medida de acordo com o tempo de utilização.

**Quadro 5 - Aumento da temperatura das lâmpadas com o tempo de utilização**

Lâmpada	0 min	1 min	2 min	5 min	10 min
Superior (refletida)	27,5°C	39,8°C	51,0°C	67,3°C	76,9°C
Inferior (Transmitida)	25,2°C	30,9°C	39,2°C	44,3°C	53,1°C

Fonte: Autoria própria

**Figura 8 - Pontos de maior temperatura (em vermelho) no Leica 2000**



Fonte: Autoria própria

Em laboratório, ao acompanhar a variação de temperatura sobre o objeto analisado, apesar de inicialmente não haver interferência, constatou-se que após um ou dois minutos já começam a aparecer desvios que variam de acordo com a circulação de ar dentro do laboratório, influência de janelas e portas abertas e também movimentação de pessoas principalmente colocando as mãos em volta do

equipamento geram variações térmicas significativas em torno do objeto analisado no microscópio.

Dentro de um ambiente com a temperatura de 25,2°C foi medida a variação de calor ao movimentar as mãos do operador ao lado do ovo, e esta chegou a 30,2°C com uma mão parada ao lado do ovo. Outras variações foram medidas ao se fechar as portas e janelas interrompendo as correntes de ar, nessas condições a temperatura sob o ovo chegou a 28,3°C.

Um dos problemas do aquecimento mediante a radiação da lâmpada halógena, quando ligada ao microscópio por longos períodos, é a possível desnaturação de proteínas, ou seja, o processo que consiste na quebra de estruturas secundária e terciária das mesmas, podendo acarretar alterações por se tornarem menos solúveis (ALBERTS et al., 2008).

Apesar de o ovo sair da chocadeira a uma temperatura de 37°C, cujo ambiente é controlado, vai para um ambiente com variações. Somado a tudo isso o microclima gerado pela iluminação da lupa, ajuda a acelerar o processo de desidratação dos líquidos contidos na superfície da CAM e mesmo dentro do ovo, requerendo a aplicação de soro fisiológico para ajudar a manter a condição fisiológica.

#### **2.2.4 Benefícios do LED em relação às lâmpadas incandescentes e halógenas**

Podem-se perceber muitas vantagens do uso de LEDs como fonte de luz principalmente se comparados com outros modelos de lâmpadas utilizadas atualmente como incandescentes, halógenas e fluorescentes:

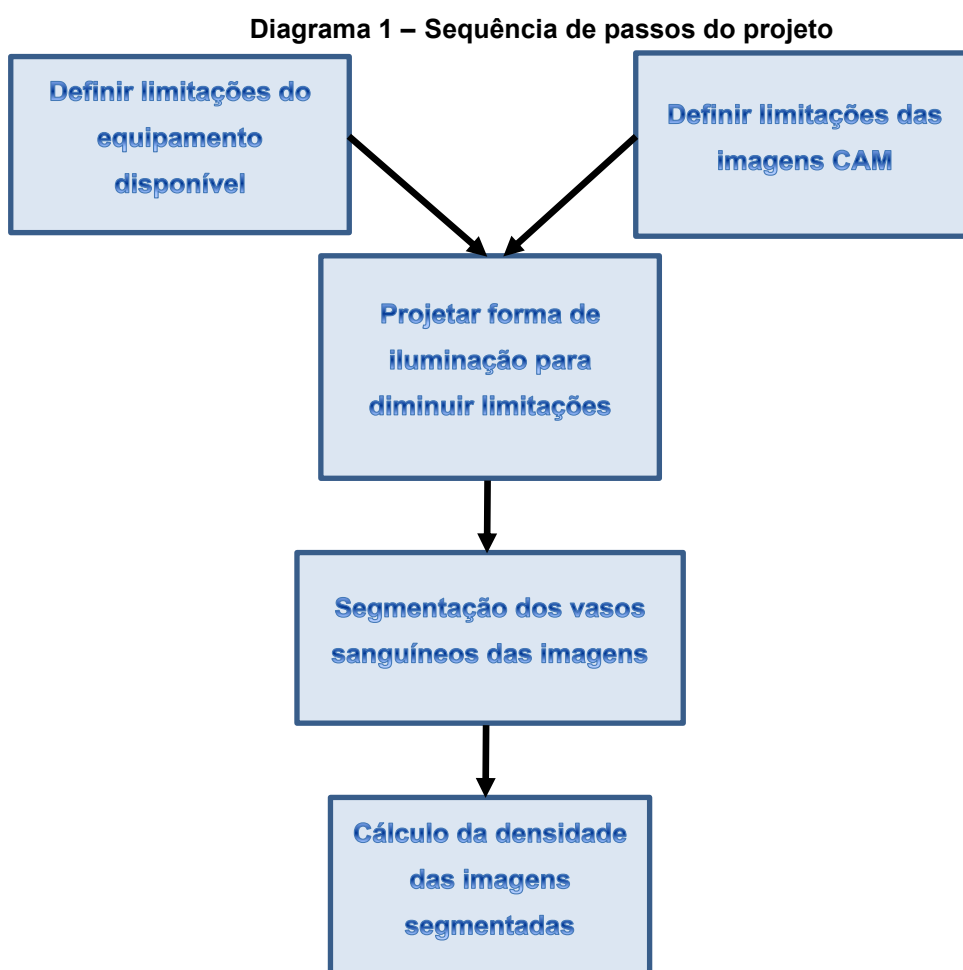
- **Maior vida útil:** os LEDs podem acender e apagar rapidamente, sem perda da vida útil e durabilidade estimada entre 25.000 a 50.000 horas (UNICAMP, 2020);
- **Custos reduzidos:** o custo do LED varia de centavos a poucos reais, de acordo com as características desejadas para o LED.
- **Eficiência luminosa:** apresentam maior eficiência e baixo consumo de potência (UNICAMP, 2020);
- **Baixa voltagem de operação:** devido ao baixo consumo de corrente não apresentam risco para o instalador;

- **Ecologicamente correto:** não utiliza mercúrio ou qualquer outro elemento que cause dano ao meio ambiente (UNICAMP, 2020);
- **Robustez mecânica:** ao contrário de lâmpadas com bulbo de vidro, os LEDs são resistentes a impactos mecânicos, pois são dispositivos de estado sólido (UNICAMP, 2020);
- **Temperatura:** quase toda a energia fornecida ao LED é gasta na emissão de luz, Luz fria, não aquece o objeto estudado e não necessita de refrigeração, temperatura de cor constante, mesmo quando escurecendo (UNICAMP, 2020).
- **Compatibilidade:** podem ser encontrados comercialmente em diversos formatos e com dimensões da ordem de milímetros a poucos centímetros. A iluminação pode ter um design bastante compacto e uniforme e possui opções de alto-brilho ou difusas (UNICAMP, 2020).
- **Facilidade de aquisição:** podem ser encontrados em lojas de comércio eletrônico, são de fácil descarte e reciclagem por não conter chumbo ou mercúrio (UNICAMP, 2020).
- **Potência luminosa elevada:** Na faixa de 10 a 150 mW, que corresponde a cerca de cinco vezes a radiação de uma lâmpada de tungstênio de 40 W.
- **Ausência de ultravioleta e infravermelho:** Dependendo do tipo de LED (WAIDE, 2010);
- **Mais precisos:** São precisamente direcionais em sua emissão, sem a necessidade de acessórios ou refratores (WAIDE, 2010).
- **Variedade de cores:** Uma grande faixa de temperaturas de cores (WAIDE, 2010).
- **Utilização de lentes:** Capacidade de utilização de eficientes lentes feitas de polímeros (WAIDE, 2010).
- **Dimming:** Possibilidade de dimming (escurecimento) sem alteração na temperatura da cor (WAIDE, 2010).
- **Possibilidade de ajustes:** Cor clara ajustável com o uso de LEDs multicoloridos, permitindo controle dinâmico de cores e alta saturação de cores (WAIDE, 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O laboratório de Biologia Experimental (LABEX) da PUCPR possui o parecer consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA) nº 01657 / 1ª Versão para experimentos com ovos de galinha. Para os experimentos aqui efetuados, utilizou-se ovos da raça Leghorn de galinhas da espécie *Gallus gallus* (galinha doméstica).

No Diagrama 1, verifica-se a sequência de etapas analisadas para formulação de um conjunto de limitações, passando a um projeto com características de suprir a maioria dessas limitações. Passando para uma etapa de validação por meio da medição da densidade dos vasos capturados em imagens com os dois tipos de iluminação disponíveis, a original do estereomicroscópio e a iluminação projetada que aqui será chamada de “corpo de iluminação”.



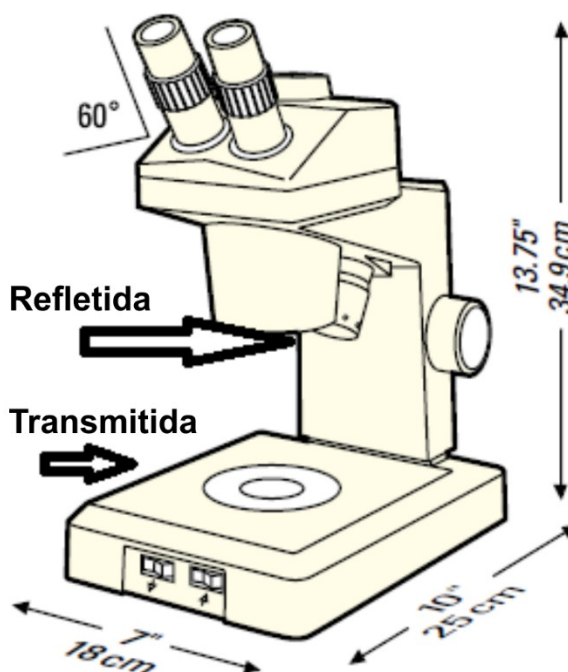
Fonte: Autoria própria

### 3.1 Equipamento disponível

Para aquisição das imagens de CAM, foram utilizados estereomicroscópios LEICA ZOOM™ 2000 da Leica Microsystems. O zoom obtido pelo microscópio, conforme manual do fabricante (MANUAL LEICA, 2020) varia de 10,5 X até 45X. Em uma das oculares dessa lupa é acoplada uma câmera ocular (modelo DM800), com autofocus, sensor CMOS HD de oito megapixels e saída USB. O software utilizado é o AMCAP versão 9.016 (AMCAP, 2020).

A iluminação original deste equipamento, segundo o fabricante, é composta de duas fontes (Figura 9): Uma refletida, posicionada no braço do equipamento, composto por uma lâmpada de halogênio de 15 W focando em um ângulo de 60 graus sobre o objeto a ser observado e alterando sua altura de forma a coincidir com o foco do estereomicroscópio, essa lâmpada usa 6 V de alimentação e uma vida útil prevista em 200 horas. Outra é uma luz transmitida, posicionada na base do equipamento, composta por uma lâmpada de tungstênio de 15 W, focando o fundo do objeto a ser analisado, essa lâmpada usa 120/220V de alimentação possui uma vida útil prevista em 1000 horas. O diâmetro da área dessa luz transmitida é de 40 mm.

Figura 9 - Posicionamento das lâmpadas no Leica. Refletida e transmitida.



Fonte: Manual Leica (2020)



### **3.1.1 A altura do objeto analisado**

Uma característica importante no Leica zoom 2000 é a sua regulação de altura, feita para objetos pequenos, porém de tamanhos variados até 17,5 cm de altura, que é a altura máxima de foco. Isso é um fator importante para o objeto em estudo em questão, que é o ovo de galinha, sendo posicionado com a sua bolsa de ar voltada para cima.

### **3.1.2 Problemas de iluminação observados durante os procedimentos**

Observação interna do ovo – Como a iluminação fixa do microscópio é mais para observação externa dos objetos, torna-se necessário buscar um ângulo melhor para que a luz entre pela abertura de 1cm<sup>2</sup> (feita sobre a câmara de ar para observação). Muitas vezes isso não é satisfatório para uma melhor visualização dos vasos mais profundos, pois eles ficam localizados numa área de sombra.

Espectro de cores – A lâmpada halógena apresenta características que, para a captura de imagens de CAMs, resultam no destaque dos componentes amarelo e vermelho nas imagens das membranas. Conforme mostrado mais adiante, isso tende a reduzir a visibilidade de vasos mais sutis (OLIVEIRA et al., 2015).

Aquecimento das lâmpadas – O aquecimento irradiado pelo conjunto de lâmpadas do microscópio é significativo (OLIVEIRA et al., 2015) e como se trata de um organismo vivo, causa incômodo e conseqüentemente movimentos do embrião que fica envolto pela membrana a ser observada. O aquecimento também ajuda a acelerar a desidratação do ovo, apesar desse processo ocorrer naturalmente devido a absorção de água feita pelo pintinho e da evaporação natural devido à abertura exposta, tornando as membranas e líquidos opacos, sendo necessário aplicação de soro fisiológico para tentar manter a integridade dentro do ambiente do ovo.

Brilho excessivo – O excesso de brilho causa reflexos nas membranas e líquidos expostos do ovo, dificultando a visão tanto das regiões nas quais incide o reflexo, quanto dos vasos e tecidos mais internos. O brilho excessivo também pode ofuscar estruturas mais delicadas e translúcidas, podendo assim diminuir a

visibilidade em algum nível de profundidade de acordo com a incidência da luz refletida.

Falta de ajuste na luminosidade – Cada ovo tem características individuais como cor interna e externa, porosidade, embriões com cores diversas e em fases distintas de desenvolvimento, além de diferentes linhagens de células tumorais, drogas e outros tipos de amostras podem ser inseridas no experimento. A iluminação de intensidade fixa não é ideal em todos os casos, podendo ser excessivas algumas vezes, reforçando os problemas de brilho, aquecimento, desidratação e ofuscamento ou pode ser pouca, gerando sombras e pouca penetração da objetiva do microscópio para observação dos vasos, principalmente os mais profundos.

Influência externa – Necessidade de um ambiente controlado, sem luzes externas. Reflexos de luminárias, janelas e outros equipamentos dentro do laboratório são difíceis de controlar e prever, principalmente quando existe uma equipe ao redor se movimentando e trabalhando em outras fases da pesquisa.

### **3.1.3 Fatores que dificultam a captura da imagem**

- Pedacos de casca ou fragmentos de membranas – Resíduos que ficam na hora da manipulação e devem ser removidos com pinças.
- Espuma na clara do ovo – A movimentação e a respiração da CAM podem gerar pequenas bolhas de ar que ficam flutuando em cima da área de observação.
- Desidratação – Com o crescimento da CAM e sua exposição ao meio externo de forma não natural, ocorre uma perda de água que faz com que o fluido comece a ficar opaco. O uso de soro fisiológico ajuda a manter a homeostase desse ovo, permitindo uma melhor visualização por alguns instantes após a aplicação de algumas gotas sobre a superfície da clara que está exposta.
- Iluminação externa – A superfície da clara se torna reflexiva se aplicada luz de forma direta ou muito forte, por isso a iluminação deve ser bem calibrada no microscópio evitando-se a luz do ambiente.
- Imagens escuras, tendendo para o vermelho – distorcendo as cores como se estivessem num espectro tendendo ao vermelho e amarelo.

### 3.2 Iluminação do objeto a ser estudado

Baseado nos conceitos de iluminação anteriormente analisados, um corpo de iluminação foi projetado e desenvolvido a fim de proporcionar uma iluminação ideal para que os detalhes mais importantes dentro dos ovos que são usados em laboratório como os tumores gerados e os vasos que se desenvolvem em volta desse tumor fiquem mais destacados e suas colorações não sejam prejudicadas por características das lâmpadas utilizadas.

Um único LED não é suficiente para uma iluminação satisfatória por isso foram utilizados vários, formando círculos ou anéis em torno do objeto analisado. As características de eficiência luminosa podem ser analisadas no quadro 6, onde são demonstradas as características das lâmpadas usadas atualmente nos microscópios do LABEX em comparação com LEDs de uso comercial que são utilizados no corpo de iluminação.

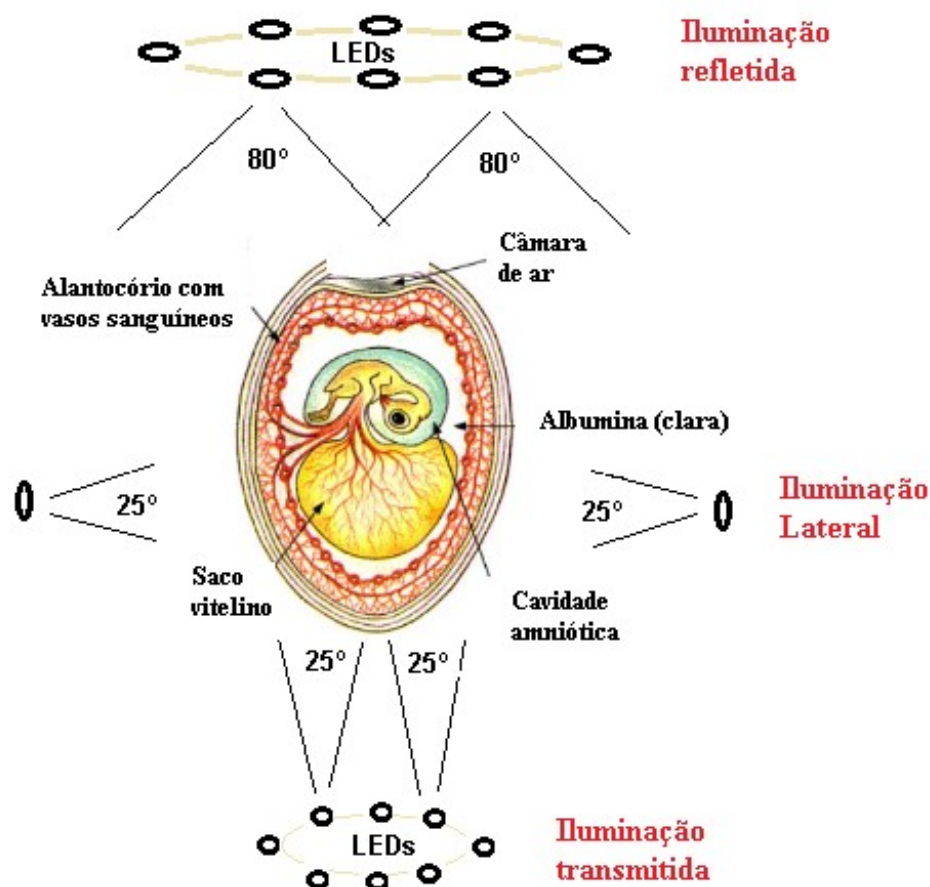
Para uma iluminação apropriada, o corpo de iluminação é composto de três faixas de luzes focando a parte superior, central e inferior do ovo quando devidamente posicionado para ser observado no microscópio (Figura 10). O próximo passo é controlar a intensidade luminosa de acordo com as características de cada ovo observado.

**Quadro 6 - Comparativo de eficiência energética entre lâmpadas (por unidade)**

<b>Modelo de Lâmpadas</b>	<b>Halógena</b>	<b>Tungstênio</b>	<b>LED 3 mm Alto Brilho</b>	<b>LED 5 mm Difuso</b>
Fluxo luminoso (Lúmen)	300	225	2,14	12,56
Potência Elétrica (Watts)	15	15	0,06	0,06
Vida útil (Horas)	200	1000	100000	100000
Eficiência Luminosa (lm/W)	20%	15%	35,6%	209,33%

**Fonte: Dados dos fabricantes (Manual Leica, 2020) (ver anexo 1 para LEDs)**

Figura 10 - Posicionamento da iluminação em relação aos anexos embrionários



Fonte: autoria própria

### 3.2.1 Controle de luminosidade

Para o controle da iluminação através de modulação por largura de pulso (PWM – Pulse Width Modulation) é necessário um circuito eletrônico que pode ser dividido em duas partes, um circuito de controle que gera o sinal de PWM, proporcionando uma onda quadrada com determinada frequência e ciclo ativo, e um circuito de potência que forneça tensão e corrente para os dispositivos utilizados.

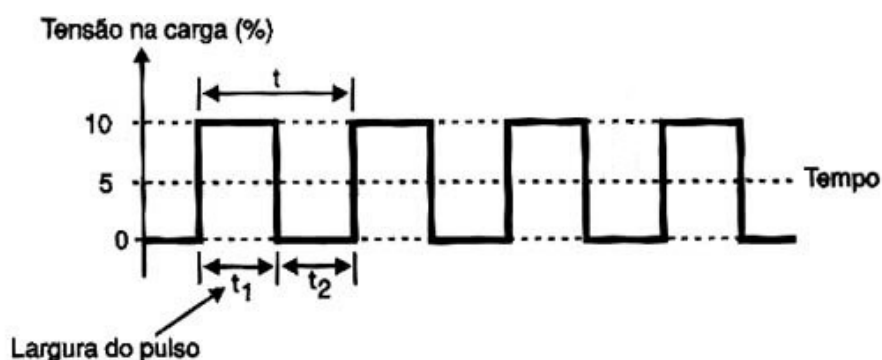
Uma vantagem do uso de circuitos PWM como controladores em lugar dos os circuitos resistivos é em relação à eficiência. Enquanto o PWM trabalha com eficiência quase 1 (menos de 1% de perda), para um circuito resistivo trabalhando a 50% da carga, 50% vai realmente para alimentação da carga e 21% é perdido em aquecimento nos resistores (ZHANG et al., 2013).

Outro fator importante na modulação de largura de pulso, os pulsos estão com o valor nominal de pico, gerando uma corrente suficiente para o acionamento de vários LEDs para o caso do presente trabalho. Um controlador resistivo possui uma tensão reduzida, faz com que LEDs tenham menos linearidade no seu acionamento. Além disso, pode-se usar potenciômetros menores para controlar uma variedade de cargas, ao contrário dos resistivos que usam potenciômetros grandes e caros (ZHANG e YANG, 2014).

A técnica de PWM é empregada em diversas áreas da eletrônica, usadas em fontes chaveadas, controle de velocidade de motores, controle de luminosidade, controle de servomotores e diversas outras aplicações. PWM significa que através da largura do pulso de uma onda quadrada é possível o controle de potência ou velocidade (KESKIN e ALISKAN, 2018).

Quando uma chave on/off está ligada, 100% da tensão e da potência é aplicada a carga, no caso dessa chave estar aberta, a tensão é nula e assim a potência é 0. Quando o tempo que a chave fica ligada ou desligada pode ser controlado, pode-se controlar a potência média entregue a carga (KESKIN e ALISKAN, 2018). Em um exemplo, se a chave ficar ligada 50% do tempo e 50% desse tempo desligada, isso quer dizer que em média temos 50% do tempo com corrente e 50% sem. Portanto, a potência média aplicada na carga é correspondente à própria tensão média, ou seja, 50% (Figura 11). Portanto quanto maior o tempo que o pulso se mantiver em nível lógico alto, ou seja, ligado, maior a potência entregue à carga; quanto menor o tempo em nível lógico alto, menor a entrega de potência.

Figura 11 - Modelo de largura de pulso em 50%



Fonte: Adaptado de Zhang e Yang (2014)

No PWM a frequência permanece fixa, normalmente em um valor alto o suficiente para não afetar o funcionamento do equipamento a ser controlado e que a forma de onda resultante seja a mais suave possível, normalmente para controle de velocidade de motores, por exemplo, é utilizado dezenas de KHz, já para controladores de luminosidade como um dimmer de uma lâmpada podemos utilizar centenas de Hz (REDKIN et al., 2017), ou para aplicações de áudio ou fontes como as de computadores podemos utilizar centenas de KHz.

### 3.2.2 *Duty Cycle*

O *duty cycle* (ciclo ativo) diz respeito à proporção de tempo com fornecimento de energia (*on*) em relação ao período de tempo sem energia (*off*). Um *duty cycle* baixo significa pouca potência fornecida, pois a energia está desligada a maior parte do tempo. O *duty cycle* é expresso em porcentagem (REN et al., 2018), sendo que o valor 100% significa “ligado” e 0%, “desligado”.

Considerando uma onda quadrada, para a implementação da PWM a largura de pulso da onda deve ser controlada. Para efeito de cálculo, dois parâmetros são necessários o período e a largura do pulso propriamente dita O *duty cycle* é definido em porcentagem segundo a fórmula:

$$DutyCycle = 100 \times \frac{Largura do Pulso}{Período} \quad (2)$$

Onde:

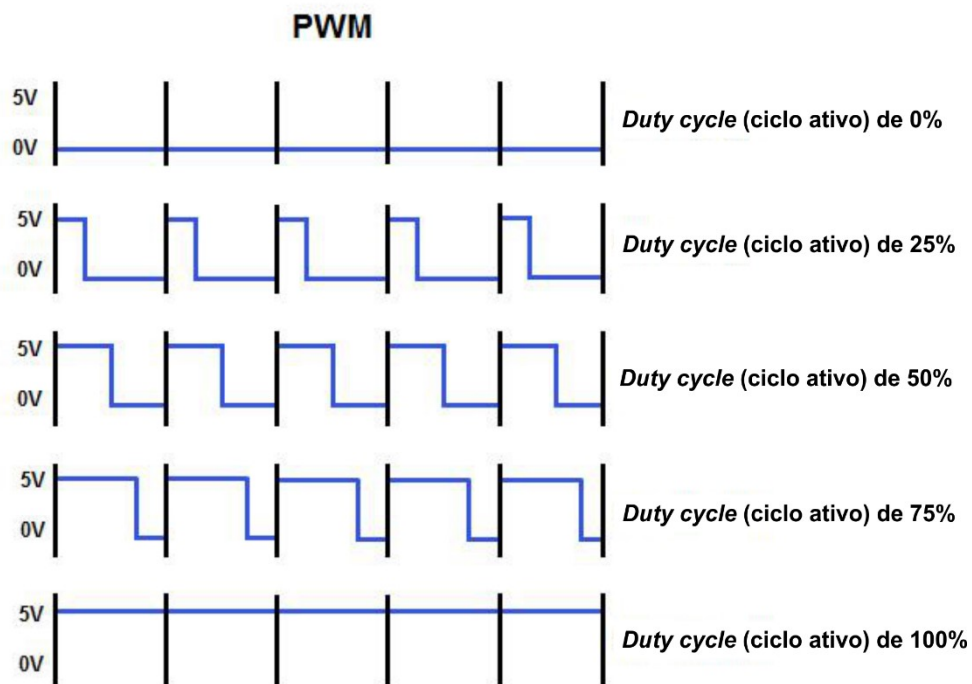
*Duty Cycle*: Valor em (%).

Largura do pulso: Tempo em que o sinal está ligado.

Período: Tempo de um ciclo da onda.

Alguns exemplos de forma de onda, variando a largura do pulso e consequentemente o *duty cycle* podem ser visualizados na Figura 12:

Figura 12 - Exemplos de forma de onda variando a largura de pulso



Fonte: Adaptado de Ren et al. (2018)

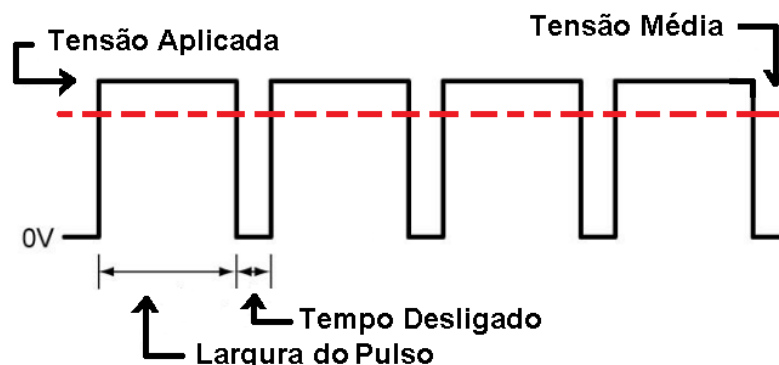
A tensão média obtida será o produto da tensão aplicada pelo *duty cycle*. A duração do tempo ligado é chamada de largura do pulso.

$$TensãoMédia = TensãoAplicada \times DutyCycle \quad (3)$$

Já o tempo decorrido entre duas rampas de subida em dois pulsos adjacentes é chamado de *período* (Figura 13).

$$Período = LarguradoPulso + TempoDesligado \quad (4)$$

Figura 13 - Características de uma onda modulada por largura de pulso



Fonte: *Adaptado de Ren et al. (2018)*

### 3.2.3 Circuito de controle com a utilização do Arduino

Vários circuitos integrados disponíveis no mercado, como o LM555, UC3525, entre outros, podem gerar PWM. Para este projeto optou-se pela utilização do Arduino Uno pelas suas características técnicas conhecidas e programáveis, tornado mais fácil o monitoramento das variáveis e possíveis coletas desses dados para posterior processamento caso necessário.

Ele é baseado no microcontrolador ATmega328, de placa única, projetado para tornar o processo de uso de eletrônicos em vários projetos acadêmicos, tecnológicos, científicos e artísticos mais acessíveis (AL-KADI et al., 2013). Possui uma plataforma eletrônica de código aberto baseada em *hardware* e *software*. Suas placas são capazes de interpretar vários tipos de entradas, processá-las e transformá-las em uma saída, ativando máquinas, ligando desde um LED a dispositivos variados. Para que o Arduino desempenhe a função desejada, um conjunto de instruções (*software*) deve ser passado ao microcontrolador na sua placa através da linguagem de programação e do ambiente de desenvolvimento integrado (IDE – Integrated Development Environment) do próprio Arduino (ARDUINO, 2020).

### 3.2.4 IDE do Arduino

O software utilizado para programação do Arduino Uno é o mesmo fornecido gratuitamente pelo fabricante (ARDUINO, 2020), junto com informativos e



diversos tutoriais que podem ser baixados ou acessados de forma *on-line*. O pacote de instalação instala o IDE junto com os *drives* necessários para comunicação do computador com o Arduino. O ambiente de desenvolvimento é uma aplicação multiplataforma construída em Java é de fácil programação e a linguagem é baseada em C++ e auxiliada pelo uso de bibliotecas com diversas funções já integradas (ARDUINO IDE, 2020).

O IDE é um ambiente de desenvolvimento integrado que traz características e ferramentas que dão apoio ao desenvolvimento de *software*, com o objetivo de agilizar o processo. Na maioria das vezes, o IDE apresenta a técnica RAD (Rapid Application Development), desenvolvendo assim, códigos com maior rapidez e facilidade (SEBESTA, 2003; CHAVES e SILVA, 2008). O IDE é um conjunto de ferramentas que auxiliam o programador no desenvolvimento de aplicações. Entre as ferramentas mais comuns encontradas em um IDE, pode-se destacar: um editor de programas, depurador, compilador, linker e loader. Cada um destes componentes tem uma função bem definida (ARDUINO IDE, 2020).

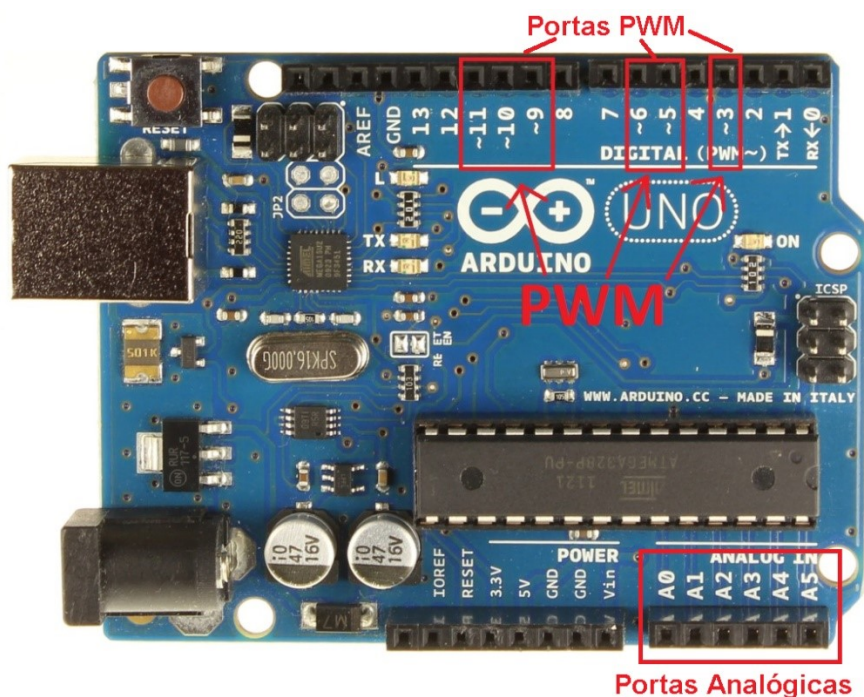
- Editor de Programas: é um editor de texto construído especialmente para facilitar a edição de um programa usando uma determinada linguagem de programação;
- Depurador: auxilia o programador na verificação, localização e correção no código-fonte do programa, na tentativa de aprimorar a qualidade do software.
- Compilador: tem como principal função fazer a tradução do código fonte em um formato que o computador pode entender;
- Linker ou linkeditor: liga os vários pedaços de código-fonte, compilados em linguagem de máquina, em um programa executável que pode ser em um computador, ou outro dispositivo computacional;
- Loader ou carregador: carrega o executável na memória para que a CPU possa executar o programa. Esse recurso é importante no IDE, pois ajuda a agilizar o trabalho;

### **3.2.5 Implementação do PWM com Arduino**

O Arduino possui diversas portas PWM (Figura 14), capazes de variar a largura de pulso de um sinal digital. Com a função PWM, além de efetuar o controle de intensidade de brilho de LEDs é possível o controle de LEDs RGB, gerando diversas variações de espectro de cores.

A Modulação de Largura de Pulso (PWM) é uma técnica para obter resultados analógicos com meios digitais. O controle digital é usado para criar uma onda quadrada, um sinal alternado entre ligado e desligado. Esse padrão liga / desliga pode simular tensões entre cheio (5 volts) e desligado (0 volts), alterando a parte do tempo em que o sinal passa versus o tempo que o sinal passa. A duração do "on time" é chamada de largura do pulso. Para obter valores analógicos variados, é alterada ou modulada essa largura de pulso. Como a frequência PWM do Arduino tem cerca de 500 Hz, o resultado é como se o sinal fosse uma tensão constante entre 0 e 5v (ARDUINO PWM, 2020).

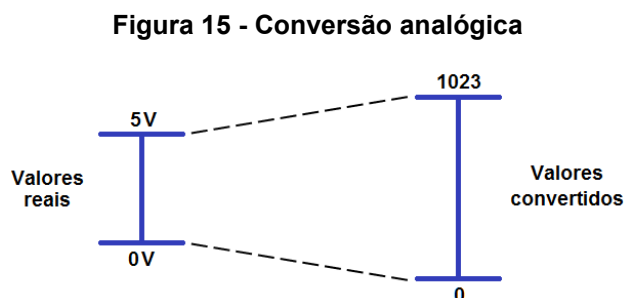
Figura 14 - Arduino Uno e as principais portas utilizadas no projeto



Fonte: ARDUINO PWM (2020)

O Arduino Uno possui diversas portas **PWM** nos pinos 3, 5, 6, 9, 10 e 11 (Figura 14), capazes de variar a largura de pulso de um sinal digital, possui também um conjunto de seis pinos destinados a entradas analógicas, nomeados de A0 até A5 (Figura 14), essas entradas possuem conversores A/D com resolução de

10 bits e que trabalham com intervalos de tensão de referência de 0 a 5 V. Os conversores A/D dividem esse intervalo (0 a 5 V) em 1024 ( $2^{10}$ ) *steps* de 0,0048828 V ( $5/1024$  V) (Figura 15).



Fonte: ARDUINO PWM (2020)

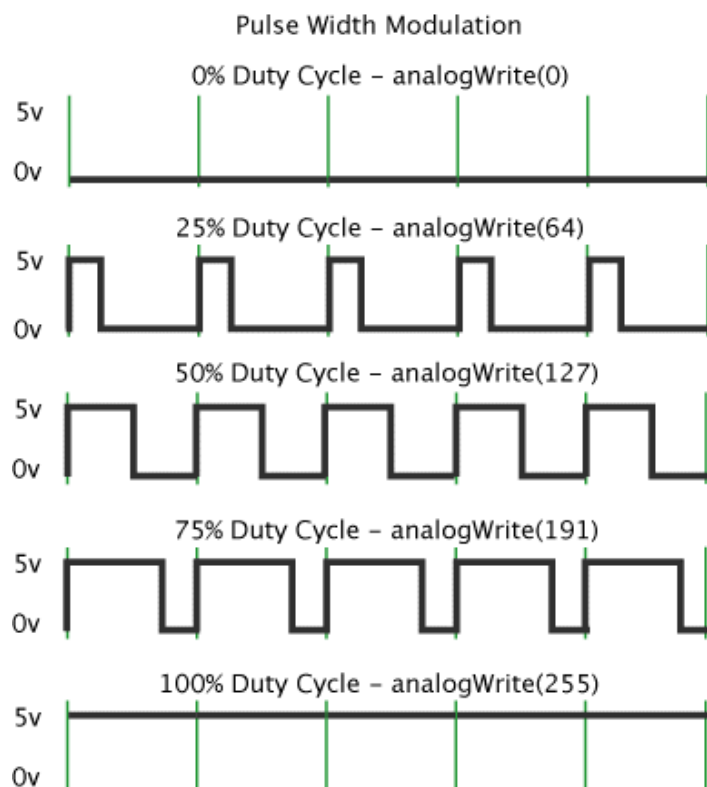
O sinal analógico é obtido com a utilização de um potenciômetro de 10 K $\Omega$  ligado na tensão de 0 a 5 V fornecida e regulada pelo próprio Arduino. Esse sinal é lido pela função *analogRead()* que recebe como parâmetro apenas a porta de entrada analógica que está sendo utilizada na aquisição dos dados. Para a alteração na luminosidade do LED, são convertidos os intervalos de entrada em intervalos de saída pela funcionalidade do PWM, obtida a partir da função *analogWrite()*, descrita abaixo, onde a porcentagem do tempo em que a onda permanece em nível lógico alto (*duty cycle*), promovendo a mudança no valor médio da onda (Figura 16), que por sua vez, está relacionada com a potência entregue ao LED e conseqüentemente com o brilho emitido pelo mesmo (ARDUINO PWM, 2020).

```
analogWrite(PINO, VALOR_ANALOGICO);
```

Onde PINO: número do pino do Arduino no qual se deseja que o sinal PWM seja gerado. Conforme mencionado anteriormente (Figura 14), somente pinos com identificação “~” podem gerar sinais PWM.

VALOR\_ANALOGICO: valor (de 0 a 255), proporcional ao *duty cycle* a ser gerado, ou seja, para *duty cycle* de 100%, deve-se utilizar valor 255, já para *duty cycle* 25% deve-se utilizar o valor 64 e assim por diante (Figura 16).

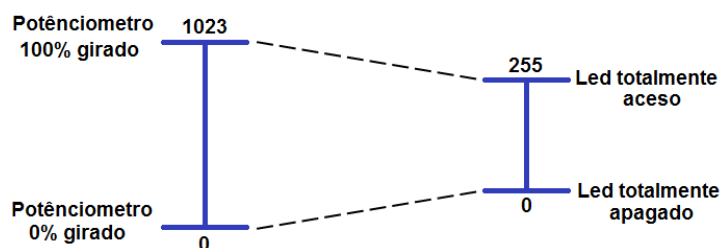
Figura 16 - Resposta de acordo com o valor dado na programação (de 0 a 255)



Fonte: ARDUINO PWM (2020)

O *duty cycle* corresponde a um número inteiro de 8 bits, que varia de 0 (0% de *duty cycle*) a 255 (100% de *duty cycle*), assim é possível estabelecer uma correspondência entre os valores de entrada (0 a 1023) e os valores de saída (0 a 255, conforme a Figura 17.

Figura 17 - Representação da transformação do sinal em nível de intensidade



Fonte: ARDUINO PWM (2020)

Na programação do dispositivo é utilizada a função `map(value, fromLow, fromHigh, toLow, toHigh)`, que converte o valor lido da entrada analógica (entre 0 e 1023), para um valor entre 0 e 255 (8 bits), que será utilizado para ajustar a luminosidade do LED. Neste caso descrito como:

```
luminosidade = map(nrPotenciometro, 0, 1023, 0, 255);
```

Onde *nrPotenciometro* é o valor lido do potenciômetro, entre 0 e 1023, que será convertido para um valor entre 0 e 255, que por sua vez será atribuído à variável luminosidade.

O código para controle do arduino está disponível no Anexo 2.

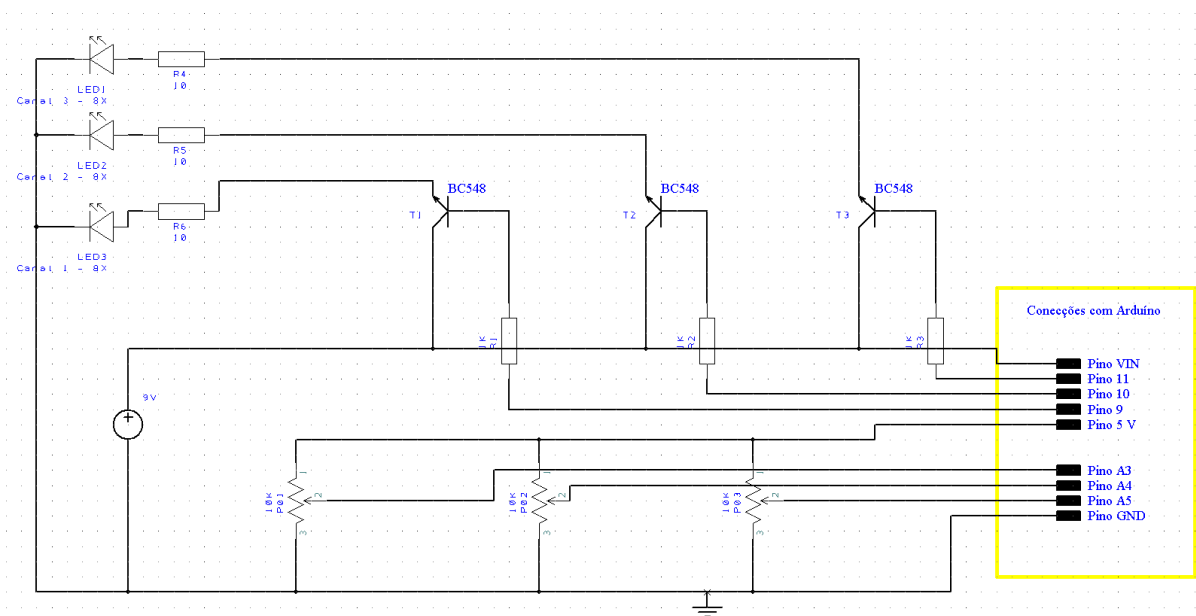
### 3.2.6 Circuito de Potência

A capacidade de corrente de uma porta do Arduino Uno é da ordem de 40 mA. Como o consumo de corrente de um único LED é da ordem de 20 a 30 mA, isso exige a necessidade de um ganho de corrente proporcional à quantidade de LEDs usados no projeto. Para suprir essa necessidade foram utilizados transistores BC548 (Figura 18), um para cada setor de iluminação, com cada transistor podendo fornecer até 800 mA de corrente, suprimindo a necessidade de corrente de 8 a 16 LEDs (240 mA a 480 mA) em cada setor de iluminação.

O BC548 é um transistor simples e de uso geral na eletrônica. São muito utilizados em aplicações de chaveamento e amplificação, algumas das suas principais características são:

- Tipo: NPN
- Máxima tensão de coletor: 30 V
- Máxima corrente de coletor: 100 mA
- Ganho (hfe): 100-800

**Figura 18 - Diagrama dos amplificadores de corrente**



Fonte: Autoria própria

### 3.2.6.1 Ligação dos LEDs em paralelo

Alguns manuais técnicos recomendam a ligação de LEDs em série devido à importância de controle da corrente que circula e não a tensão. A ligação em série faz com que a luminosidade de LEDs se torne homogênea caso suas características de fabricação não sejam tão idênticas, ou se as tensões de funcionamento sejam diferentes como no caso de LEDs de cores diferentes que podem funcionar na faixa de 2 a 3,6 volts, porém, os LEDs utilizados neste projeto possuem características iguais tanto na luminosidade quanto no uso de corrente e tensão, por isso podem ser utilizados em paralelo mantendo a homogeneidade.

Todos os LEDs brancos usados no corpo de iluminação possuem a tensão de funcionamento entre 3,0 a 3,2 volts, independente de ser 3 mm ou 5 mm de diâmetro e características descritas no Quadro 7. Para ligação em paralelo, basta ajustar os cálculos de forma a direcionar os resistores que controlam a tensão e a corrente para cada LED. Na Figura 18 é mostrado o diagrama dos amplificadores de corrente e pinagem de acoplamento com o Arduino Uno.

**Quadro 7 - Características dos LEDs comerciais usados no projeto**

<b>Tipo de LED</b>	<b>3 mm Alto Brilho</b>	<b>5 mm Difuso</b>
Código fabricante	K2164	K1222
Cor	Branco Frio	Branco Frio
Temperatura (Kelvin)	5500~6000	6000-6500
Ângulo de Iluminação (Graus)	20~30	160-180
Tensão de Entrada (Volts)	3,0~3,2	3,0~3,2
Fluxo luminoso (MCD)	8000~10000	1500-2000
Fluxo luminoso (Lúmen)	0,76~2,14	7,78~12,56
Corrente (mA)	20	20
Potência (W)	0,06	0,06
Eficiência luminosa %	12,6~35,6	129,66~209,33
IRC%	70-95	70-95

Fonte: DUALSHOP (2020) (Ver anexo 1)

Para cálculo da eficiência luminosa<sup>1</sup> é necessário a conversão do fluxo luminoso de mcd para lm, para isso foi utilizada a fórmula (5):

$$lm = mcd \times \frac{2\pi \left(1 - \cos\left(\frac{\theta}{2}\right)\right)}{1000} \quad (5)$$

Onde  $\theta$  é o ângulo de visão da lente.

### 3.2.7 Medidas e posicionamento dos LEDs

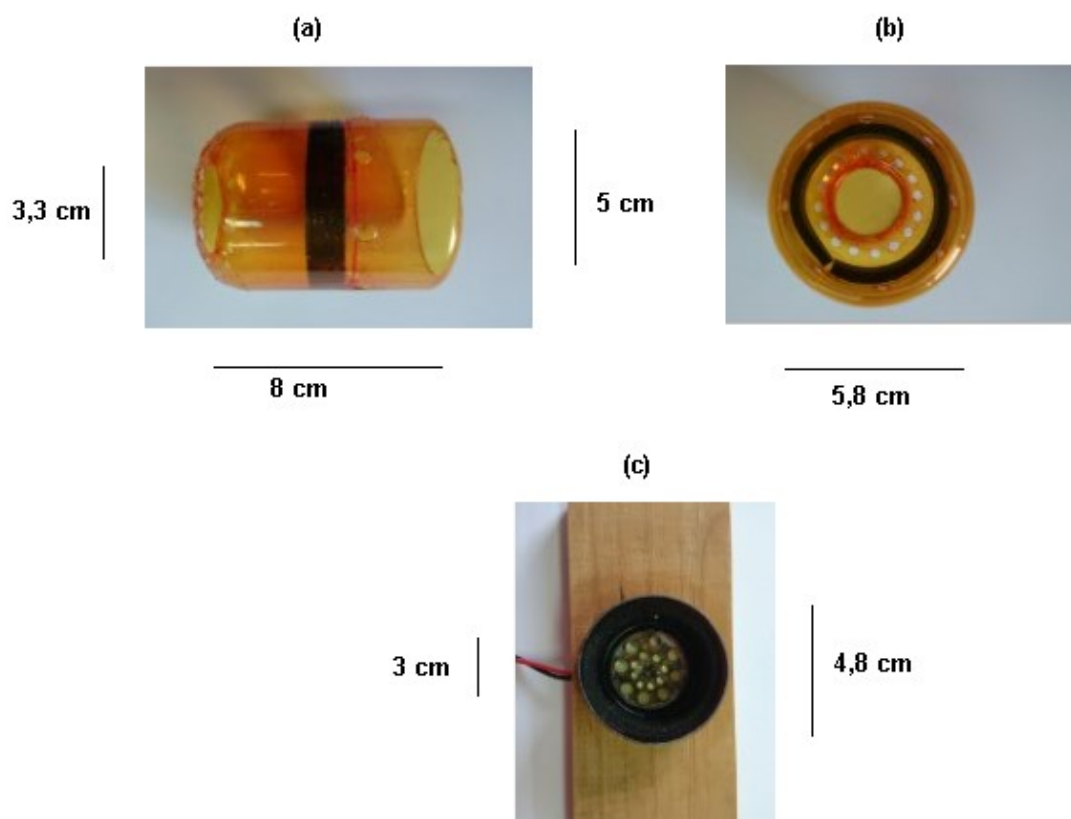
O corpo de iluminação utiliza uma carcaça plástica em forma de cúpula. A sua coloração deve ser escura para que não haja reflexos indesejados ou influência da cor do plástico sobre o objeto analisado.

<sup>1</sup> Fórmulas para conversão: <https://www.rapidtables.com/calc/light/mcd-to-lumen-calculator.html>

Os LEDs são posicionados em furos da mesma espessura ( $\pm 5\text{mm}$ ) de forma a serem encaixados sem a necessidade de uso de cola, formando um anel em cima e na cinta lateral do ovo.

As Figuras 19(a) e 19(b) mostram que a abertura na parte de cima é larga o suficiente para permitir o ângulo de observação do Leica 2000, ângulo esse que coincide com a projeção da iluminação dos LEDs superiores. Já a abertura na parte inferior é feita na medida do suporte para que a cúpula fique firme e bem posicionada para que não haja deslocamentos durante as observações.

**Figura 19 - Medidas do corpo de iluminação**



**Fonte: Autoria própria**

A Figura 19(c) mostra a base da cúpula onde são instalados LEDs para iluminação da parte inferior. São dois anéis sendo um de LEDs pequenos no interior e maiores na borda exterior, fazendo assim uma concavidade onde o ovo é posicionado diretamente sobre esses LEDs e a iluminação tenha um efeito idêntico ao de um ovoscópio. A Figura 20(a) mostra o posicionamento do ovo. Em seguida como mostrado na Figura 20(b), a cúpula é encaixada por cima.



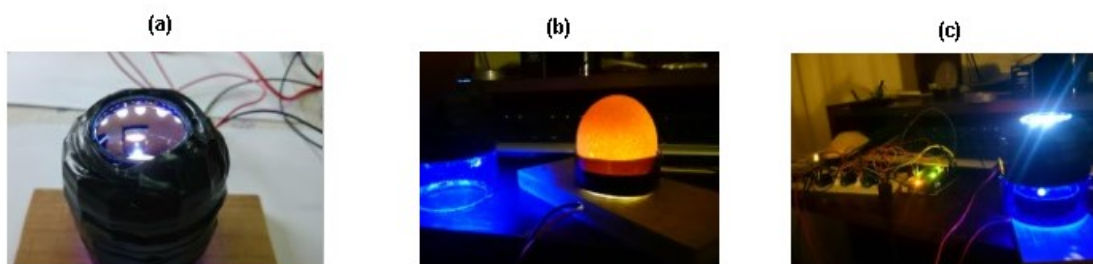
**Figura 20 - Fixação do ovo e encaixe da iluminação**



**Fonte: Autoria própria**

A Figura 21 mostra os detalhes da iluminação acionada, com todos os LEDs acesos das laterais e em cima (a) e da parte inferior (b), provocando um efeito de iluminação que ajuda a uma melhor captação das imagens internas do ovo, independente da iluminação externa (c).

**Figura 21 - Detalhe da iluminação sobre o ovo**

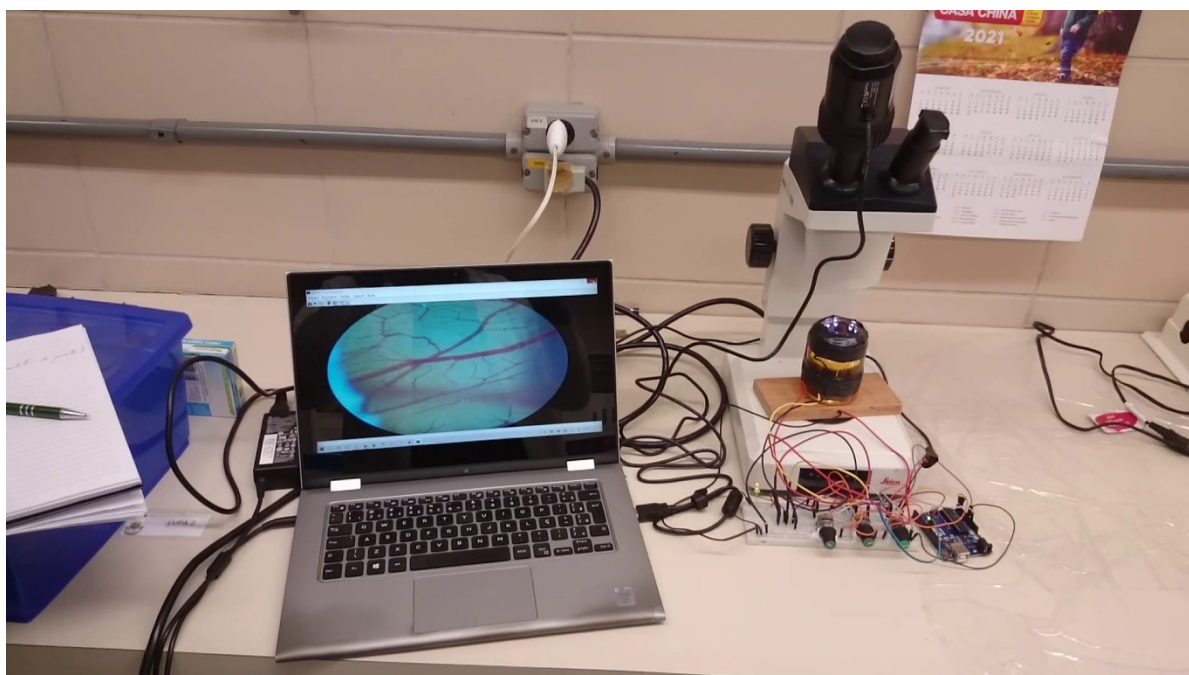


**Fonte: Autoria própria**

Os experimentos foram realizados em laboratório, em um cenário conforme mostrado na Figura 22, onde o corpo de iluminação foi posicionado sob a lente da lupa do Leica 2000, acomodando o ovo a ser observado no seu interior. O circuito de controle de intensidade posicionado ao lado permitiu ajustar a luminosidade de acordo com a necessidade de cada ovo que ia sendo colocado para observação.

A câmera acoplada ao Leica permitiu acompanhamento ao vivo, permitindo assim a busca por um melhor resultado em cada situação. Nota-se que o corpo se adapta à altura do equipamento permitindo o ajuste de foco

**Figura 22 - Posicionamento do corpo de iluminação no Leica 2000**



**Fonte: Autoria própria**

Sua carcaça escura protege da iluminação do ambiente, fazendo com que a equipe não se incomode com a iluminação em volta enquanto que o circuito de ajuste de luminosidade fica ao lado, facilitando o controle. Todos os ajustes são previamente observados na tela do computador que está conectado à câmera DM800 em cima da lupa.

### **3.3 Quantificação dos resultados**

A detecção de bifurcações vasculares e cruzamentos de uma imagem contendo vasos é uma das etapas básicas para análise de testes de variações de resultados e é normalmente realizada em um procedimento manual demorado (CHAPMAN et al., 2002). Para melhorar a eficiência, é muito importante automatizar o processo e evitar imprecisões devido à fadiga humana.

O laboratório utiliza um método de contagem manual, marcando uma região de interesse com um quadrado dividido em 9 quadrantes na imagem adquirida da CAM. Esse método foi inspirado no método de Neubauer (COLLINS et al., 2010), torna o trabalho mais preciso e menos tedioso, porém, não possui muita referência literária, apesar de ser citado em (YANG et al., 2005). Foi utilizado nesse experimento para testes iniciais e se demonstrou interessante para criar uma estimativa sobre resultados e fortalecer a expectativa de um resultado promissor. Mais detalhes dessa técnica são mostrados mais adiante na discussão dos resultados obtidos.

Para comprovação dos resultados através de métodos mais aceitos no meio científico, foi utilizado um ramo da matemática chamado fractais, muitas vezes designado como a “geometria da natureza” (MANDELBROT e WHEELER, 1983). As formas estranhas e caóticas dos fractais descrevem alguns fenômenos naturais descritos em vários artigos científicos de diversas áreas como, por exemplo: vascularidade de retina (JELINEK et al., 2012); morfologia de tumores (FABRIZII et al., 2014); padrões neurológicos (KARPERIEN e JELINEK, 2017); arqueologia (BROWN et al., 2005) e também comprovação da variação da vascularização da CAM (COSTA et al., 2013). Sendo uma boa opção para as necessidades desse projeto como medida de comparação entre os resultados obtidos das imagens de CAMs com iluminação normal do microscópio e as obtidas com o corpo de iluminação com LEDs. A contagem de caixas, utilizando o conceito de fractais, terá seu conceito melhor descrito mais adiante.

Para preparar a imagem para ser analisada usando a metodologia de fractais, é necessário antes utilizar um processo de segmentação e detectar os vasos sanguíneos contidos nas imagens de CAM. O processo de segmentação de imagens geralmente é um desafio e, no caso de imagens com estruturas complexas e de discriminação, como as obtidas nos experimentos com a CAM mostrou-se mais desafiador ainda.

Os métodos existentes de automatizar a detecção de vasos podem ser categorizadas em duas classes: abordagens baseadas em características geométricas e baseadas em modelos. Os primeiros métodos são altamente dependentes das técnicas de segmentação e esqueletização. Eles também envolvem um extenso processamento local de pixels e análise de pontos de ramificação (CALVO et al., 2011). Bifurcações incompletas, que são comumente

produzidas por técnicas de segmentação automática, geralmente não são detectadas por tais abordagens baseadas em esqueletização. Por outro lado, as abordagens baseadas em modelos são geralmente mais adaptativas e têm menor complexidade computacional, o que as torna mais apropriadas para aplicações em tempo real (TSAI et al., 2004). No entanto, as abordagens baseadas em modelo sofrem de capacidade de generalização insuficiente, pois muitas vezes são incapazes de modelar todas as características de interesse. Conseqüentemente, esses métodos podem falhar na detecção de bifurcações atípicas.

Os filtros COSFIRE, usados para a detecção de bifurcações, são operadores treináveis de detecção de pontos-chave, que são seletivos para determinados padrões locais que consistem em combinações de segmentos de contorno. Esses operadores são inspirados nas propriedades de alguns neurônios localizados na retina, que são seletivos para partes de contornos (curvos) ou para combinações de segmentos de linha (AZZOPARDI e PETKOV, 2013).

### 3.3.1 Descrição do método B-COSFIRE

Azzopardi et al. (2015) descreve em seu trabalho que técnicas de rastreamento de vasos são métodos não supervisionados que usam um conjunto inicial de pontos, que são escolhidos manualmente ou automaticamente, para obter a árvore vascular perseguindo as linhas centrais do vaso. Outros métodos não supervisionados, que usam informações *a priori* sobre a estrutura do perfil dos vasos, empregam morfologia matemática para segmentar a árvore dos vasos do fundo. Operadores morfológicos têm sido usados para realçar os vasos e então combinar a análise de curvatura com filtragem linear para discriminar os vasos do fundo (FANG et al., 2003). Técnicas de filtragem combinadas (AL-RAWI et al., 2007) modelam o perfil dos vasos usando um modelo bidimensional (2D) de kernel com uma seção transversal gaussiana. O crescimento de um modelo de contorno ativo “*Ribbon of Twins*” pode ser usado tanto para segmentação quanto para medição da largura dos vasos (AL-DIRI et al., 2009). Por outro lado, métodos supervisionados têm sido usados para rotular automaticamente os pixels como vaso ou não vaso. Em tais métodos, os classificadores são treinados por vetores de recursos em pixels que são extraídos de imagens de vasos sanguíneos de treinamento, cujos rótulos (*ground-truth*) são obtidos manualmente.

Os métodos não supervisionados existentes são baseados na maioria das vezes em técnicas de filtragem que dependem de operações lineares usando kernels predefinidos. Em particular, a saída desses métodos de filtragem é essencialmente uma soma de pixels vizinhos ponderados (correspondência de modelo). Al-Rawi et al. (2007), para a segmentação de imagens de retina, utilizam uma imagem de retina pré-processada com filtros gaussianos, e Ricci e Perfetti (2007) usam um conjunto de modelos fixos feitos à mão. Os métodos de correspondência de gabaritos são sensíveis a leves deformações do padrão esperado.

Azzopardi et al. (2015) criou uma abordagem chamada B-COSFIRE, onde B significa barra, devido a sua semelhança com uma estrutura de vaso em combinação a resposta de um filtro de deslocamento (COSFIRE - *Combination of Shifted Filter Response*). O filtro B-COSFIRE proposto é não linear, pois atinge a seletividade de orientação ao multiplicar a saída de um grupo de filtros Diferença de Gaussianos (DoG), cujos suportes são alinhados de forma colinear. É tolerante a variações de rotação e ligeiras deformações. O COSFIRE é uma abordagem de filtro treinável, isso significa que a seletividade do filtro não é predefinida na sua implementação, mas é determinada a partir de um padrão de protótipo especificado pelo usuário (por exemplo, um vaso reto, uma bifurcação ou um ponto de cruzamento) em um processo de configuração automática. Esses dois filtros foram desenhados para ter alta seletividade para formato *em barra* e *final de barra*, como vasos sanguíneos.

O filtro B-COSFIRE<sup>2</sup> proposto e implementado por Azzopardi et al. (2015) é configurado e usado para a segmentação em imagens com vasos sanguíneos, principalmente imagens de retina.

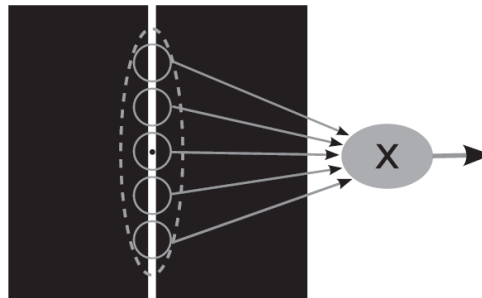
Antes da aplicação do filtro B-COSFIRE, deve ser realizada uma etapa de pré-processamento para aumentar o contraste dos vasos e suavizar a borda do campo de visão (FOV) da imagem. A Figura 23 ilustra o conceito principal do filtro B-COSFIRE, que está configurado para ser seletivo para uma barra vertical. Usa as respostas dos filtros DoG centralizados em certas posições em relação ao centro de sua área de suporte. Esses filtros DoG fornecem respostas altas às mudanças de intensidade na imagem de entrada. Cada círculo cinza na Figura 23 representa a

---

<sup>2</sup> Software para download e mais especificações: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/49172-trainable-cosfire-filters-for-curvilinear-structure-delineation-in-images>

área de suporte de um filtro DoG. A resposta de um filtro B-COSFIRE é calculada como a média geométrica ponderada, essencialmente o produto, das respostas dos filtros DoG em questão nos centros dos círculos correspondentes.

**Figura 23 - Esboço do filtro B-COSFIRE proposto**



**Fonte: Azzopardi et al. (2015)**

Na Figura 23, o ponto preto no meio da barra branca indica o centro do suporte do filtro, que é ilustrado como uma elipse tracejada. Um filtro B-COSFIRE combina as respostas de um grupo de filtros DoG (representados pelos círculos sólidos) por multiplicação.

Denota-se por  $DoG_{\sigma}(x, y)$  uma função DoG central com uma região central excitatória (ou seja, positiva) e uma região inibitória (ou seja, negativa) circundante:

$$DoG_{\sigma}(x, y) \stackrel{\text{def}}{=} \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left(\frac{-x^2+y^2}{2\sigma^2}\right) - \frac{1}{2\pi(0,5\sigma)^2} \exp\left(\frac{-x^2+y^2}{2(0,5\sigma)^2}\right) \quad (6)$$

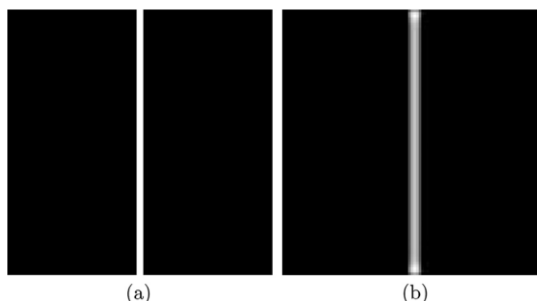
Onde  $\sigma$  é o desvio padrão da função gaussiana que determina a extensão do entorno. Segundo Azzopardi et al. (2015), 0,5 é uma constante obtida a partir de experimentos e mostra-se adequada para a identificação dos vasos sanguíneos nas imagens. Para uma determinada posição  $(x, y)$  da imagem  $I$  a resposta  $C_{\sigma}(x, y)$  de um filtro  $DoG_{\sigma}$  é obtida por convolução:

$$c_{\sigma}(x, y) \stackrel{\text{def}}{=} |I * DoG_{\sigma}|^+ \quad (7)$$

Onde  $|\cdot|^+$  denota retificação de meia onda já que a retificação de meia onda é uma operação que suprime (define como 0) os valores negativos. A Figura

24(b) mostra a imagem de resposta de um filtro DoG que é aplicado à imagem de entrada sintética mostrada na Figura 24(a).

**Figura 24 - Entrada (a) e resposta (b) do filtro DoG centralizado**



**Fonte: Azzopardi et al. (2015)**

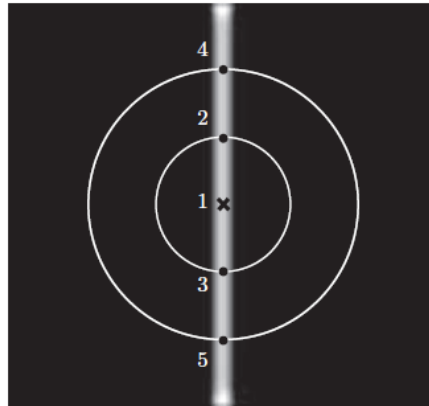
Na Figura 24(a), a imagem de entrada sintética (de tamanho 100 x 100 pixels) de uma linha vertical (5 pixels de largura) e Figura 24(b) a imagem de resposta correspondente de um filtro *DoG* centralizado na linha vertical.

A Figura 25 ilustra um exemplo da configuração automática de um filtro B-COSFIRE. Mostra uma imagem sintética que contém uma barra vertical, como o mostrado na Figura 24(a). O ponto central que é identificado por '1' na Figura 25 passa por um processo automático onde é analisada sua vizinhança local. Nesse processo é aplicado um filtro *DoG* centralizado com um determinado  $\sigma$  para o padrão de entrada. Em seguida, considerando as respostas  $C_{\sigma}(x, y)$  do filtro *DoG* ao longo de um número  $k$  de círculos concêntricos em torno do ponto central (marcado por '1' na Figura 25), as posições ao longo desses círculos em que essas respostas atingem máximos locais significativos são as posições dos pontos que caracterizam as variações de intensidade dominante em torno do ponto de interesse. Para o exemplo considerado, existem duas dessas posições para cada um dos dois círculos. Esses pontos são rotulados de '2' a '5' na Figura 25. O número de tais pontos depende do número  $k$  de círculos concêntricos e do padrão de protótipo especificado.

No filtro B-COSFIRE, cada ponto  $i$  que é selecionado com o método mencionado anteriormente é descrito por uma tupla de três parâmetros  $(\sigma_i, \rho_i, \varphi_i)$ ,  $\sigma_i$  representa o desvio padrão do filtro *DoG* que responde mais fortemente e que fornece a entrada, enquanto  $\rho_i$  e  $\varphi_i$  são as coordenadas polares em relação ao centro de suporte do filtro B-COSFIRE.

Denota-se por  $S = \{(\sigma_i, \rho_i, \phi_i) \mid i = 1, \dots, n\}$  o conjunto de 3-tuplas de um filtro B-COSFIRE, onde  $n$  representa o número de respostas *DoG* consideradas. Na Equação 7 são relatados os valores dos parâmetros de um conjunto  $S$  que são determinados pela análise automática do padrão de entrada mostrado na Figura 25.

**Figura 25 - Exemplo de configuração de um filtro B-COSFIRE**



Fonte: Azzopardi et al. (2015).

Esse processo de configuração resulta em um filtro B-COSFIRE que é seletivo para o arranjo espacial colinear de cinco fortes variações de intensidade. As respostas *DoG* são usadas nas posições determinadas para calcular a saída do filtro B-COSFIRE.

As respostas *DoG* foram borradas para permitir alguma tolerância na posição dos respectivos pontos. Azzopardi et al.(2015) define a operação de desfoque como o cálculo do valor máximo das respostas de limiar ponderadas de um filtro *DoG*. Para a ponderação, foi multiplicado as respostas do filtro *DoG* pelos coeficientes de uma função Gaussiana  $G_{\sigma'}(x', y')$ , cujo desvio padrão  $\sigma'$  é uma função linear da distância  $\rho_i$  do centro de suporte do filtro:

$$\sigma' = \sigma'_0 + \alpha \rho_i, \quad (8)$$

Onde  $\sigma'_0$  e  $\alpha$  são constantes

Em seguida cada resposta borrada *DoG* é mudada por uma distância  $\rho_i$  na direção oposta a  $\phi_i$ , de modo que eles se encontrem no centro de suporte do



filtro B-COSFIRE. O vetor de deslocamento em questão é  $(\Delta x_i, \Delta y_i)$  onde  $\Delta x_i = -\rho_i \cos \phi_i$  e  $\Delta y_i = -\rho_i \sin \phi_i$ .

Denotado por  $S_{\sigma_i, \rho_i, \phi_i}(x, y)$  a resposta borrada e deslocada de um filtro DoG para cada tupla  $(\sigma_i, \rho_i, \phi_i)$  no conjunto S. Foi definido a i-ésima resposta DoG desfocada e deslocada como:

$$S_{\sigma_i, \rho_i, \phi_i}(x, y) = \max_{x', y'} \{C_{\sigma_i}(x - \Delta x_i - x', y - \Delta y_i - y') G_{\sigma'}(x', y')\} \quad (9)$$

Onde  $-3\sigma' \leq x', y' \leq 3\sigma'$ .

A saída de um filtro B-COSFIRE foi definida como a média geométrica ponderada de todas as respostas desfocadas e deslocadas DoG que correspondem às tuplas no conjunto S:

$$r_s(x, y) \stackrel{\text{def}}{=} \left| \left( \prod_{i=1}^{|S|} \left( S_{\sigma_i, \rho_i, \phi_i}(x, y) \right)^{\omega_i} \right)^{\frac{1}{\sum_{i=1}^{|S|} \omega_i}} \right|_t \quad (10)$$

$$\omega_i = \exp - \frac{\rho_i^2}{2\sigma^2}, \quad \delta = \frac{1}{3_{i \in \{1, \dots, |S|\}}} \max\{\rho_i\} \quad (11)$$

Onde  $|\cdot|_t$  representa o limiar da resposta a uma fração  $t$  ( $0 \leq t \leq 1$ ) das respostas máximas. A média geométrica ponderada é uma função do tipo AND, ou seja, um filtro B-COSFIRE obtém uma resposta apenas quando todas as respostas desfocadas e deslocadas aferentes  $S_{\sigma_i, \rho_i, \phi_i}(x, y)$  são maiores que zero. A contribuição das respostas desfocadas e deslocadas diminui com o aumento da distância do centro do suporte do filtro B-COSFIRE. Um filtro B-COSFIRE é seletivo para uma barra de uma dada orientação preferencial, aquela da estrutura de barra protótipo que foi usada para sua configuração.

Nesse caso, a preferência de orientação de um filtro B-COSFIRE, depende da orientação da estrutura da barra utilizada como entrada para a configuração do filtro. Pode-se configurar um filtro com uma preferência de orientação diferente, apresentando uma barra girada. Alternativamente, pode-se manipular o parâmetro no conjunto S, que corresponde à preferência de orientação  $0^\circ$ , para obter um novo conjunto  $R_\psi(S)$  com preferência de orientação  $\psi$ :

$$R_\psi(S) = \{(\sigma_i, \rho_i, \phi_i + \psi) \vee \forall (\sigma_i, \rho_i, \phi_i) \in S\} \quad (12)$$

Para detectar barras em várias orientações, combinam-se as respostas dos filtros B-COSFIRE com diferentes preferências de orientação, tomando o valor máximo em cada localização  $(x,y)$ :

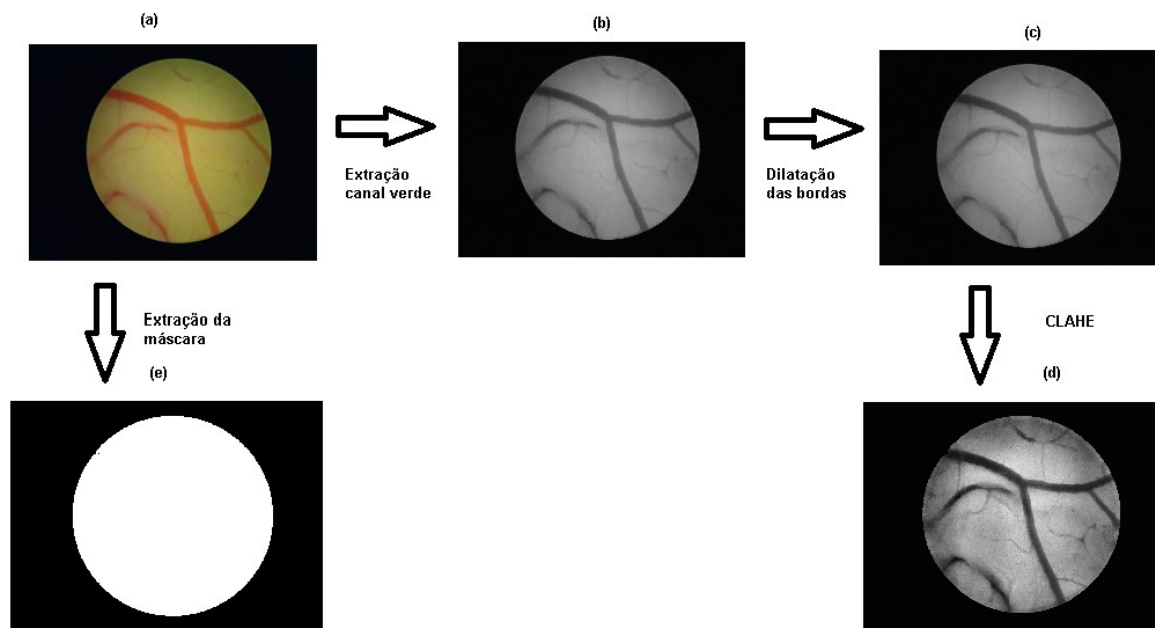
$$\hat{r}_s(x, y) \stackrel{\text{def}}{=} \max_{\psi \in \Psi} \{r_{R_\psi(s)}(x, y)\} \quad (13)$$

$$\text{Onde } \psi = \left\{0, \frac{\pi}{12}, \frac{\pi}{6}, \dots, \frac{11\pi}{12}\right\}$$

### 3.3.2 Etapas de Pré-Processamento

Na Figura 26 é mostrada uma ilustração passo a passo das técnicas de pré-processamento aplicadas às imagens da CAM. Em (a) uma imagem da CAM RGB original (de tamanho 640 x 480 pixels), depois em (b), apenas o canal verde é considerado, em (c) ocorre a dilatação das regiões em torno da circunferência FOV do canal verde. Em (d) ocorre a aplicação da adaptação limitada por contraste equalização do histograma CLAHE (PIZER et al., 1987). Em (e) mostra-se uma máscara da área FOV calculada automaticamente para cada imagem dos conjuntos de dados por limite do canal de luminosidade da versão CIELab da imagem original. Essas etapas são mais bem descritas nos itens seguintes.

Figura 26 - Etapas das técnicas de pré-processamento



Fonte: Adaptado de Azzopardi et al. (2015)

### 3.3.2.1 Separação de canais RGB

(MENDONÇA e CAMPILHO, 2006) avaliaram o desempenho de diferentes representações de cores, como o componente verde da imagem RGB original, o canal de luminância do National Television Systems Committee (NTSC) e o espaço de cores  $a^*$  componente do  $L^* a^* b^*$  (CIELAB, 2021). Eles descobriram que o maior contraste entre os vasos e o fundo é, em geral, mostrado no canal verde da imagem RGB, o canal vermelho em geral tem baixo contraste e o canal azul em geral mostra uma pequena faixa dinâmica (Figura 26(b)).

### 3.3.2.2 Extração do *Field of View* (FOV)

Devido ao forte contraste em torno do campo de visão (FOV) das imagens da CAM, os pixels próximos à circunferência podem causar a detecção de vasos falsos. Devido a isso foi utilizado o algoritmo de pré-processamento proposto por (SOARES et al., 2006) para suavizar o forte contraste em torno da borda circular da área de FOV (Figura 26(e)). Ele usa uma região de interesse (ROI) determinada pela máscara FOV da CAM que é obtida estabelecendo um limiar2 para o plano de

luminosidade da versão CIELab que é um espaço de cor especificado pela Comissão Internacional de Iluminação, da imagem RGB original.

### **3.3.2.3 Dilatação das bordas**

Em seguida, as bordas são dilatadas no seguinte procedimento iterativo. Na primeira iteração, foi considerado cada pixel preto que fica apenas no limite externo da máscara FOV. Em seguida, cada pixel foi substituído pelo valor médio dos pixels de seus 8 vizinhos que estão dentro da ROI. Após a primeira iteração, o raio da ROI é aumentado em 1 pixel. Este procedimento foi repetido 50 (em geral  $m$ ) vezes, pois é suficiente para evitar a falsa detecção de linhas ao redor da borda do FOV da imagem com vasos (Figura 26(c)).

### **3.3.2.4 Aprimoramento de imagem**

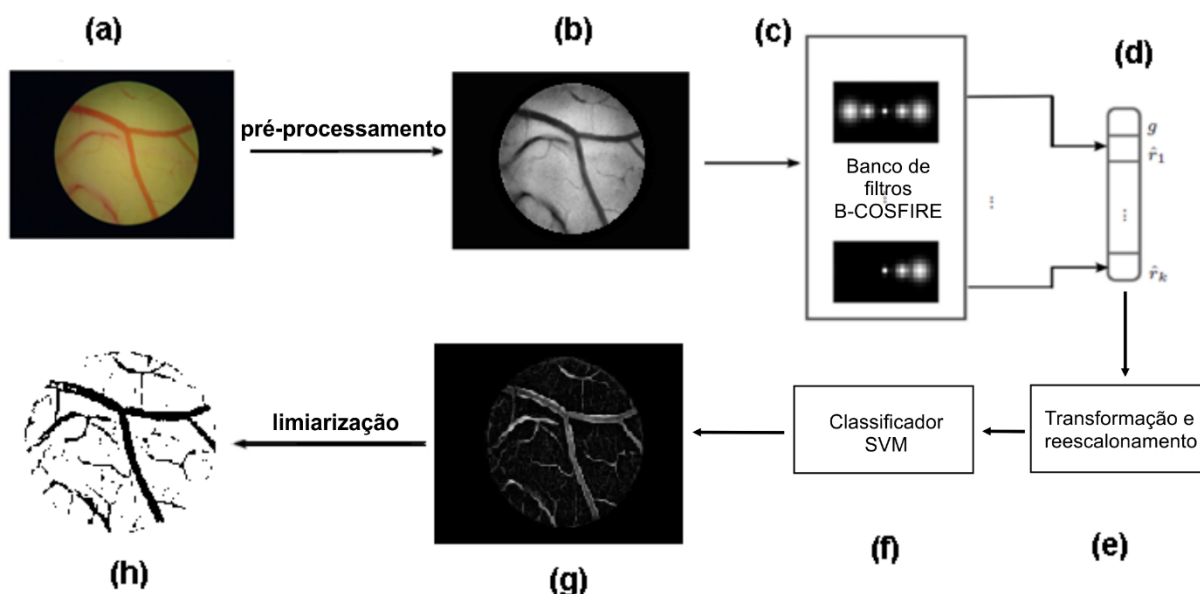
Em seguida, a imagem é aprimorada usando o método CLAHE (PIZER et al., 1987). O algoritmo CLAHE, que é comumente usado como uma etapa de pré-processamento na análise de imagens com vasos sanguíneos (SETIAWAN et al., 2013), permite a melhoria do contraste local evitando uma amplificação de ruído em regiões relativamente homogêneas (Figura 26(d)).

### **3.3.3 Aplicação do filtro B-COSFIRE**

Para utilização do software de detecção de vasos, alguns parâmetros são necessários serem informados:  $\sigma$  (Valor do desvio padrão da função gaussiana externa no DoG);  $\rho$  (O comprimento do suporte do filtro);  $\sigma^0$  (Valor do desvio padrão da função de ponderação gaussiana);  $\alpha$  (Coeficiente Alpha da função de ponderação).

O parâmetro  $\sigma$  foi o único que necessitou ser modificado em relação ao seu valor default 2,4 foi ajustado para 10, oferecendo um melhor resultado principalmente nas imagens de mais baixa qualidade. Esse parâmetro refere-se ao filtro simétrico, ou seja, na detecção de vasos completos dentro da FOV.

Figura 27 – Diagrama da aplicação do método B-COSFIRE



Fonte: Adaptado de Strsciuglio et al. (2016)

Na Figura 27, em (a) a imagem da CAM passa por um pré-processamento (b). Em (c) as respostas do banco de filtros B-COSFIRE selecionados e o canal verde, são usados para formar um vetor de características (d). Após, em (e) ocorre a transformação e reescalonamento do vetor. Em (f) um classificador SVM (Support Vector Machines) é então usado para classificar cada pixel na imagem de entrada e obter um mapa de resposta (g). A saída binária é obtida através do limite dos escores de probabilidade SVM (h). Para a realização das etapas (c) até (h) foi adotada a implementação disponível em Azzopardi et al. (2015).

### 3.3.4 Avaliando a densidade com Fractais

A palavra fractal, cunhada por Benoit Mandelbrot, foi originada do radical *fractus*, participio passado do verbo latino *frangere*, que quer dizer quebrar, produzir pedaços irregulares, em alusão à forma irregular e fragmentada dos objetos ditos fractais (MANDELBROT e WHEELER, 1983).

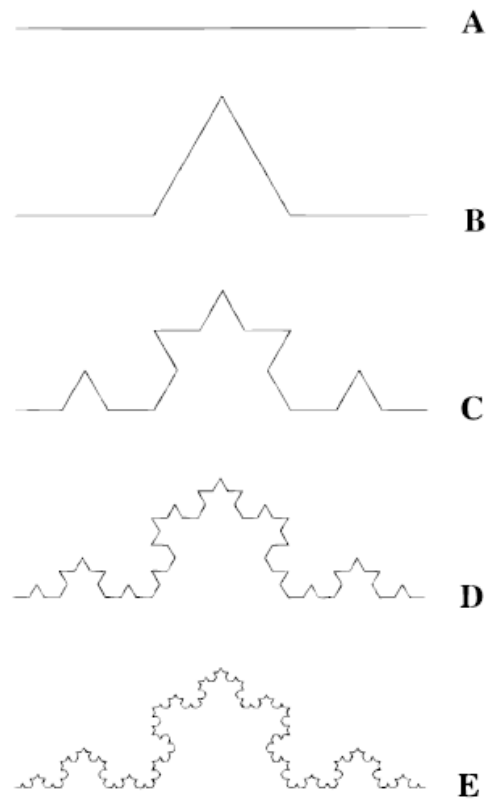
Diz-se que um objeto é fractal se certos critérios, como o objeto ser auto-similar ou invariante de escala, forem atendidos. A Figura 28 mostra uma aproximação de um fractal ideal / teórico com uma dimensão fractal de 1,26 que foi descrito pelo matemático sueco, Helge von Koch em 1904. Fractais gerados por

computador, como a curva de Koch, às vezes são chamados de pré-fractais, pois são limitadas as imagens de resolução e, portanto, não percebem o detalhe implícito na formulação matemática completa (FEDER, 1988). Os fractais também são reconhecidos por compartilharem de algumas características, tais como: a) auto similaridade; b) lei de potência; c) propriedades estatísticas anômalas; d) dimensão fractal, em geral não inteira; e) lei ou algoritmo de construção (DE MELO DE MENDONÇA et al., 2007).

A forma de um objeto fractal é complexa, uma vez que qualquer alteração na ampliação e/ou escala mostrará mais detalhes para o limite de resolução conforme a ampliação é aumentada. Esta adição de detalhes resulta em um objeto fractal ideal com um comprimento de limite infinito (PEITGEN e RICHTER, 1986). Mandelbrot mostrou que o comprimento limite de um objeto fractal pode ser expresso matematicamente como uma lei de potência. Assim, os fractais são sempre descritos por funções de potência, uma vez que as leis de potência homogêneas carecem de escalas naturais; ou seja, eles não têm uma unidade característica de comprimento, tempo ou massa (TAKAYASU, 1990). A resposta mais adequada à pergunta acerca do tamanho dessas estruturas biológicas é: não existe nenhum tamanho característico, a não ser que se especifique a escala de medida. Caso contrário, a variância das medidas tende ao infinito e nenhuma média existe: as propriedades estatísticas são anômalas. Tudo o que se pode fazer é quantificar como as medidas crescem na medida em que o fractal é observado com maior riqueza de detalhes, o que é expresso pela dimensão de auto similaridade (ou dimensão fractal) (IANNACCONE e KHOKHA, 1997).

Muitos padrões na biologia exibem uma auto similaridade limitada ou auto similaridade aproximada. Geralmente, eles são considerados estatisticamente semelhantes. Além disso, deve-se ter em mente que todos os objetos naturais são, em contraste com os fractais matemáticos, inevitavelmente finitos e limitados em escala por sua própria natureza. Assim, os padrões naturais exibem auto similaridade estatística apenas entre um limite superior e inferior. Limitações também são impostas por técnicas de gravação e imagem. O valor final da quantidade de detalhes ou irregularidades em diferentes escalas associadas a um objeto natural pode ser determinado pelo uso de análise fractal.

**Figura 28 - Passos da construção da curva de Koch**



**Fonte: De Melo De Mendonça et al. (2007)**

Na Figura 28, em qualquer um dos passos da construção da curva de Koch, o coeficiente de redução é  $r=3$ , sendo o número de partes iguais obtidas a cada iteração  $N=4$ . A dimensão da curva de Koch será, então,  $D = \log N / \log r = \log 4 / \log 3 = \log 16 / \log 9 = \log 64 / \log 27 = \log 256 / \log 81 \approx 1,26$ .

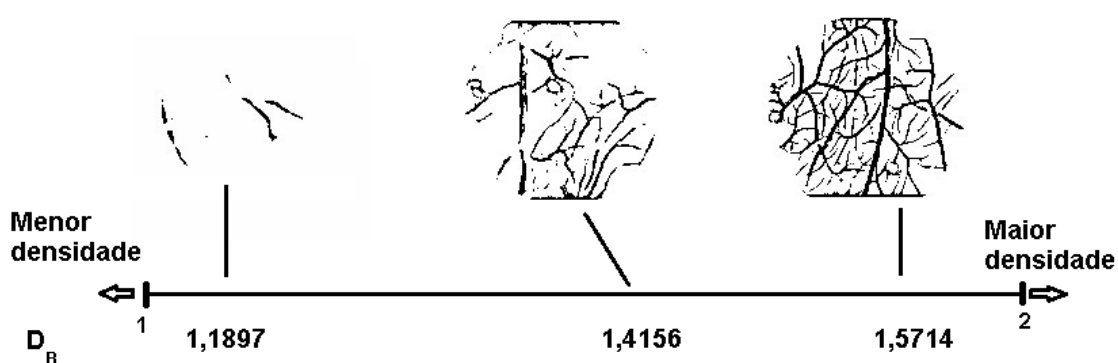
### **3.3.4.1 Dimensões Fractais**

Um parâmetro importante na análise fractal de estruturas biológicas é a dimensão fracionária ou fractal ( $D$ ), que aumenta de valor com o aumento da complexidade estrutural e descreve a natureza “fraturada” dos objetos na natureza (10).  $D$  é chamado de fractal porque geralmente não é um número inteiro. É chamado de dimensão porque fornece uma medida de quão completamente um objeto preenche o espaço. Quando  $D$  assume um valor inteiro, é igual à dimensão euclidiana padrão para a qual um ponto ideal tem uma dimensão de 0, um ideal a

linha tem uma dimensão de 1, um plano ideal tem uma dimensão de 2, e um volume perfeitamente sólido tem uma dimensão de 3.

Nos vasos analisados em um CAM, quando vistas em duas dimensões não são linhas retas e não cobrem completamente a área bidimensional, seus valores de  $D_B$  ficam entre 1 e 2. Valores baixos de  $D_B$  (Figura 29), como 1,1897, teriam relativamente baixa vascularização e cobrem uma área bidimensional de forma bem inferior a uma CAM com valores de  $D_B$  mais altos, como 1,5714.

**Figura 29 - Variações de densidade calculadas com box counting**



**Fonte: Autoria própria**

A Figura 29 mostra variações de densidade calculadas com box counting usando amostras de CAM (2D) obtidas em laboratório. A imagem à esquerda é da CAM de um embrião morto, a do centro com a aplicação de  $5\mu\text{Mols}$  de MI-D e à direita a CAM do ovo de controle.

Existem na literatura muitos tipos diferentes de dimensões fractais, de modo que mesmo os matemáticos de pesquisa não estão de acordo com seus nomes ou equivalência (FERNÁNDEZ e JELINEK, 2001). O Quadro 8 lista algumas das dimensões fractais mais importantes com seus sinônimos e contexto.



Quadro 8 – Tipos diferentes de fractais

Dimensão	Símbolo	Sinônimo	Contexto	Referência
Fractal	D		Termo genérico para dimensão fractal	(MANDELBROT e WHEELER, 1983)
Hausdorff	D <sub>H</sub>	Dimensão Hausdorff–Besicovitch	Amplamente utilizado em matemática pura, mas não pode ser estritamente aplicado a objetos naturais devido à sua gama finita de estrutura fractal	(BESICOVITCH, 1950)
Minkowski–Bouligand	D <sub>M</sub>	Dimensão de observação Minkowsky	Mais fácil de avaliar do que D <sub>H</sub> ; geralmente é maior ou igual à dimensão de Hausdorff	(SCHROEDER, 2009)
Calliper	D <sub>C</sub>	Dimensão de Richardson	Frequentemente usado no cálculo da dimensão fractal de contornos	(TAKAYASU, 1990)
Box counting	D <sub>B</sub>	Dimensão de capacidade, D(0) em análise multifractal	Usado para calcular as dimensões fractais de muitas estruturas biológicas em 2D e 3D	(KARPERIEN e JELINEK, 2017)
Mass	D <sub>MR</sub>	Dimensão fractal de massa	Usado no contexto de clusters e redes; também pode ser aplicado a superfícies e estruturas biológicas	(MARTÍN e TAGUAS, 1998)

Fonte: Fernández e Jelinek (2001)

### 3.3.4.2 Box counting

De forma simples, a contagem de caixas é um método para calcular a dimensão fractal de objetos de forma irregular, dividindo um conjunto de dados, objeto, imagem etc. em partes cada vez menores, tipicamente em forma de "caixa" e analisando as partes em cada escala menor (KARPERIEN e JELINEK, 2017).

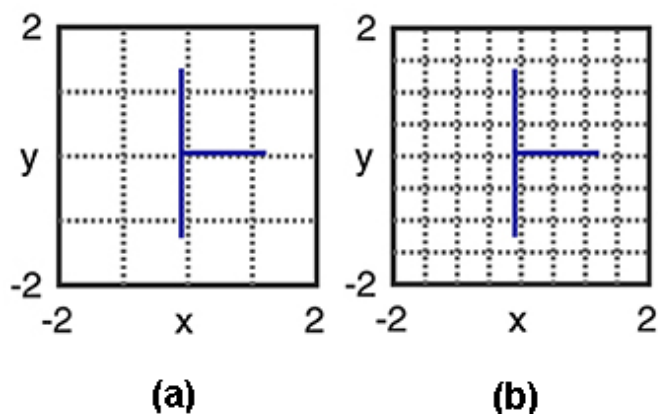
Em cada etapa da contagem de caixas, um objeto é coberto por uma grade de caixas de comprimento lateral se o número de caixas N interceptadas pelo objeto é encontrado (Figura 30). Reduzindo o tamanho da grade repetidamente, a estrutura do padrão é capturada com mais precisão. A dimensão de contagem de caixa D é definida como:

$$D = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{-\log(N(s))}{\log(s)} \quad (14)$$

O Box-Counting tem como objetivo cobrir o fractal com uma grade de caixas n-dimensionais ou hiper cubos todos com lado s, e conta-se o número de caixas não vazias N, como mostra a Figura 30, podendo ser usado recursivamente

diferentes tamanhos de cubos, neste exemplo de objeto onde  $s = 1$  e  $N(s) = 6$  em (a), e  $s = 1/2$ ,  $N(s) = 9$  em (b).

**Figura 30 - Box Counting em 2D com um exemplo de objeto**



Fonte: Karperien e Jelinek (2017)

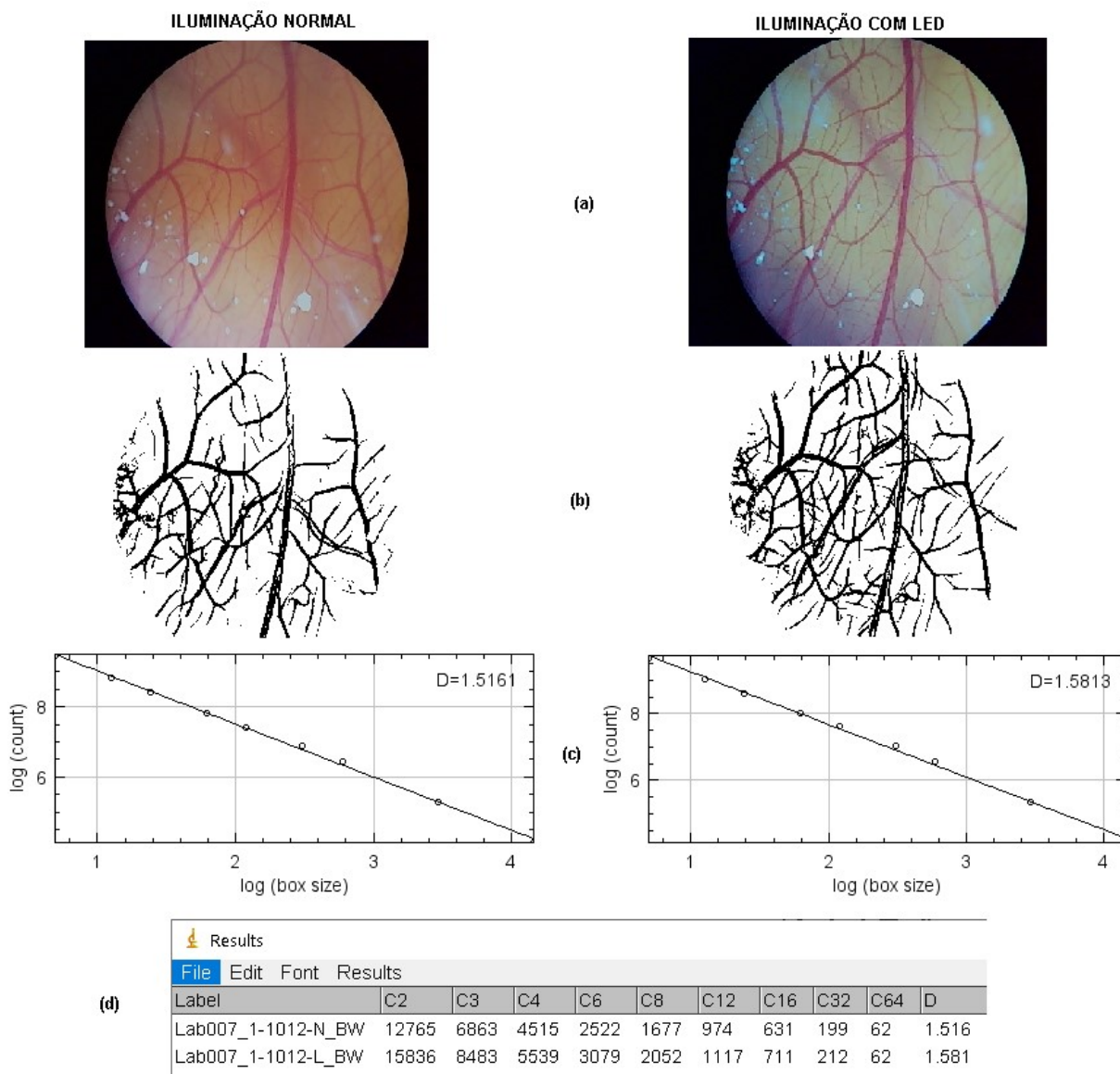
Na análise fractal, o fator de escala nem sempre é conhecido com antecedência, então algoritmos de contagem de caixa tentam encontrar uma maneira otimizada de cortar um padrão que revelará o fator de escala. O método fundamental para fazer isso começa com um conjunto de elementos de medição - caixas - consistindo em um número arbitrário, que pode ser chamado  $E$  (Epsilon), de tamanhos ou calibres, que pode ser chamado de conjunto de  $\epsilon$  (epsilon  $s$ ). Em seguida essas caixas do tamanho de  $\epsilon$  são aplicadas ao padrão e contadas. Para fazer isso, para cada  $\epsilon$  em  $E$ , um elemento de medição que é tipicamente um quadrado bidimensional ou uma caixa tridimensional com comprimento lateral correspondente a  $\epsilon$  é usado para escanear um padrão ou conjunto de dados (por exemplo, uma imagem ou objeto) de acordo com um plano de escaneamento predeterminado para cobrir a parte relevante do conjunto de dados, registrando, ou seja, contando, para cada passo na varredura de recursos relevantes capturados dentro do elemento de medição. (MANDELBROT e WHEELER, 1983).

Na Figura 31 é demonstrado a utilização do programa ImageJ<sup>3</sup> para processar a imagem e executar a função de contagem de caixa incorporada ao programa. Ambas as imagens são capturadas nas mesmas posições e ângulo na

<sup>3</sup> <https://imagej.nih.gov/ij/>

lente do estereomicroscópio, porém, com as duas fontes diferentes fontes de iluminação usadas individualmente.

**Figura 31 - Diferença na dimensão fractal usando “Contagem de Caixas”**



**Fonte: Autoria própria.**

Na Figura 31, em (a) as imagens originais, sendo a da esquerda com iluminação normal e a da direita com LEDs. Em (b) o resultado da segmentação usando o filtro B-COSFIRE. Calculando a dimensão fractal usando as dimensões sugeridas pelo ImageJ que são: 2,3,4,6,8,12,16,32 e 64, obtêm-se as diferenças de volume espacial em 2D (c) e (d). Nesse exemplo verifica-se que a imagem com iluminação em LED apresenta uma dimensão fractal superior, ou seja, a quantidade de vasos detectados é maior.

#### **3.3.4.3 Análise estatística**

Os dados obtidos foram avaliados segundo a média  $\pm$  desvio padrão. O estudo estatístico foi baseado na análise unilateral de variância (ANOVA) conjugado ao Teste de Tukey. A homogeneidade dos grupos foi confirmada por CV (coeficiente de variação de Pearson). Valores  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Para os cálculos estatísticos foi utilizado o Microsoft Excel.

#### **3.3.4.4 Comitê de ética**

Este projeto já foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional sob os números 850/2016; e as licenças de números 850A/2016 e 850G/2016.

## **4 RESULTADOS e DISCUSSÕES**

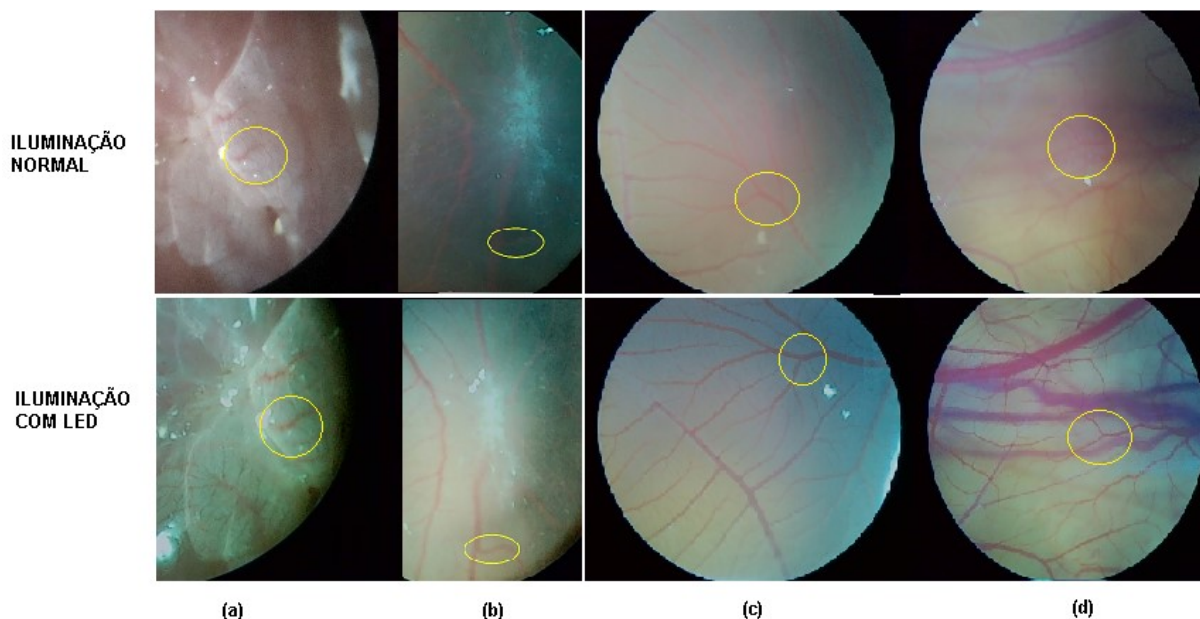
As análises apresentadas utilizam os valores obtidos em laboratório com as amostragens disponíveis. As coletas foram agrupadas em compostos e níveis de concentração apesar desses dados não fazerem parte do escopo desse projeto, necessitando uma amostragem em quantidade muito superior para esse fim. O escopo aqui é verificar se de uma forma geral a iluminação em LED apresentou vantagens que propiciam um melhor acompanhamento nas variações de densidade dos vasos observados.

### **4.1 Avaliação inicial**

Nos experimentos em laboratório observou-se que as amostras não sofreram mais influência da iluminação externa, não havendo mais o comprometimento da equipe em manter luzes apagadas ou cortinas fechadas para não haver influência. O corpo fechado também propiciou isolamento térmico, apesar de que a principal fonte de calor indesejada era proveniente das luzes embutidas no estereomicroscópio. As lâmpadas de LED por terem eficiência energética elevada não geraram calor a ponto de influenciar, mantendo o experimento na temperatura ambiente durante a observação.

Na Figura 32, observando algumas imagens comparativas nos primeiros testes de laboratório, foram selecionados pontos de referência dentro da área de visão para estudo da viabilidade. Esses pontos se destacam por estarem localizados perto de vasos mais calibrosos, de preferência entre dois, de forma a possibilitar o acompanhamento do surgimento de novos vasos de acordo com os compostos que são inseridos naquela região.

**Figura 32 – Exemplos de pontos de referência em cada par de imagens**

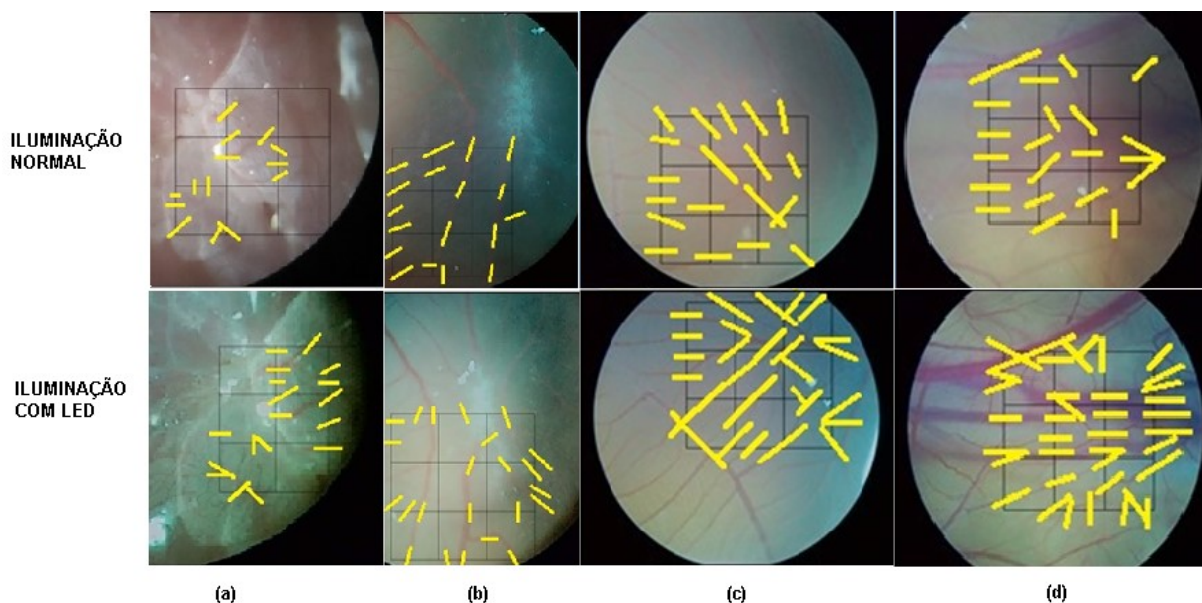


**Fonte: Autoria própria**

Na parte superior da Figura 32, amostras de imagens de CAM capturadas com o uso da iluminação original do microscópio, e com o método de iluminação proposto na linha de baixo. Os contornos em amarelo identificam as mesmas regiões em cada par de imagens como sendo pontos de interesse, onde são testados os compostos. Em (a) uma região em torno de um tumor, em (b) logo abaixo do que pode ser uma fibrose, em (c) um ponto propício para avaliação, porém, como o embrião ainda está vivo deve-se cuidar com deslocamento e rotações, em (d) destaque dos vasos mais profundos obtidos com a iluminação com LEDs e sua relevância na composição da imagem.

Uma metodologia usada para verificação de volume de vasos ao redor da região de interesse é a inserção de um quadrado de  $1\text{cm}^2$  com 9 divisões internas, como mostrado na Figura 33. Dessa forma fica mais fácil comprovar que houve uma detecção de um número maior de vasos em torno de uma região de interesse (LEITOLIS et al., 2017). Nessa figura, foi realizado uma contagem manual dos vasos que cruzam as bordas de cada quadrado, considerando-se depois a média da soma de no mínimo 5 quadrados até o número máximo de 9.

**Figura 33 – Contagem de vasos por quadrante nos pontos de referência**



**Fonte: Autoria própria**

Na Figura 33 em (a) percebe-se que as diferenças de brilho, contraste e nitidez são muito marcantes, a região do tumor consegue ter uma coloração mais natural, menos avermelhada e com isso os vasos sanguíneos ficam mais evidentes. Em (b), a iluminação vinda por baixo não é impedida pela fibrose e com isso os vasos que estão ao lado conseguem ser melhor visualizados. Em (c) e (d), rotacionando ou não, os vasos mais profundos tendem a se destacar muito mais, facilitando a contagem manual ou posteriormente com uso de processamento de imagens.

Na amostragem inicial para teste, seguindo os critérios de contagem do laboratório, obtiveram-se os resultados (Tabela 1) onde as colunas Normal e Led representam a média da contagem de vasos que atravessam os nome quadrantes. O ganho é representado pela diferença e conseqüentemente pelo percentual, muito significativo principalmente quando da detecção de vasos mais profundos como na imagem 4, manifestando um aumento significativo na quantidade de vasos obtidos com a iluminação com LED demonstrando que o corpo de iluminação foi eficiente, e viável para uma melhor avaliação.

**Tabela 1 - Total experimento - Valores obtidos na amostragem de teste**

<b>Img</b>	<b>Normal</b>	<b>LED</b>	<b>Dif.</b>	<b>Ganho</b>
1	2,89	3,67	0,78	26,92%
2	2,89	3,89	1,00	34,62%
3	3,89	6,22	2,33	60,00%
4	3,44	6,67	3,22	93,55%
<b>Soma</b>	13,11	20,44	7,33	<b>55,93%</b>

**Fonte: Autoria própria**





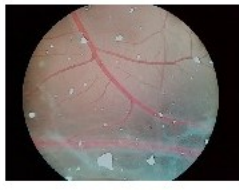

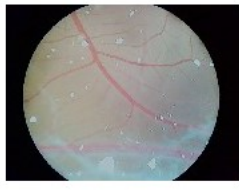



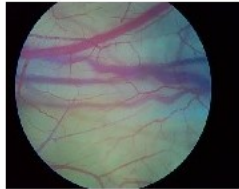

Esse método utilizado em nossos experimentos com a CAM, inspirado no método de Neubauer (COLLINS et al., 2010), que torna o trabalho mais preciso e menos tedioso, porém, as referências são escassas. YANG e colaboradores (2005) descrevem esse método manual de contagem, o que levou à busca de métodos digitais de contagem de vasos, referendados pela literatura internacional. Utilizou-se neste protocolo experimental a forma digital para segmentação dos vasos, o filtro B-COSFIRE e a medida de densidade fractal com o método de contagem de caixas (MANDELBROT et al., 1983).

## **4.2 Segmentação por processamento de imagem**

Com a utilização do algoritmo B-COSFIRE, obteve-se uma boa qualidade na segmentação de vasos para a maioria das imagens, principalmente as que utilizaram iluminação com LED, favorecendo as imagens com melhor brilho e contrastes naturais, destacando os detalhes dos vasos mais profundos e aumentando a densidade de vasos detectados. Essas variações de densidade são contabilizadas usando-se a metodologia de contagem de caixas para se obter a densidade fractal em 2D (MILOSEVIC e RISTANOVIC, 2008). Esse procedimento é destacado na Figura 34 onde são obtidas as dimensões fractais após segmentação das imagens.







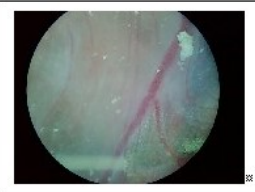

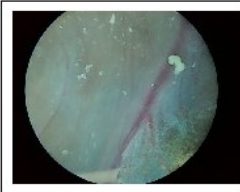

**Figura 34 - Resultado obtido em relação à iluminação**

ILUMINAÇÃO NORMAL		Df	ILUMINAÇÃO COM LED		Df
		1,516			1,581
		1,367			1,428
		1,117			1,566

**Fonte: Autoria própria**

Em alguns casos os resultados foram favoráveis à iluminação normal como pode ser visualizado na Figura 35. Com a existência de mais objetos dentro da região de interesse, a iluminação mais profunda pode ou não favorecer a segmentação. Até certo ponto, detalhes observados na imagem como penas, patas, regiões de desidratação e outros, ficam mais definidos, favorecendo assim o software de segmentação em distinguir o que é ou não vaso mais facilmente, gerando menos ruídos na imagem e assim a medição da densidade fractal tem menos ruídos para contabilizar.

**Figura 35 - Resultados negativos com LED**

ILUMINAÇÃO NORMAL		Df	ILUMINAÇÃO COM LED		Df
		1,490			1,410
		1,381			1,342

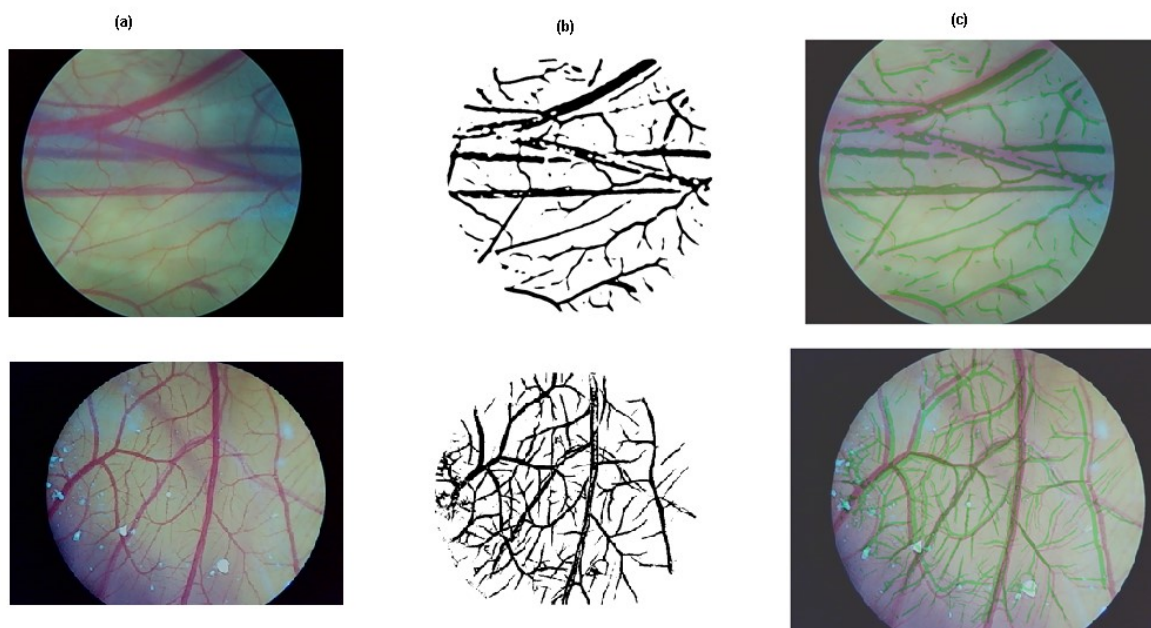
**Fonte: Autoria própria**

Com baixa iluminação, o contraste baixo da imagem dificulta a segmentação e com isso pode gerar ruídos, principalmente em imagens de pior qualidade, até mesmo pelas condições em que se encontra a CAM.

Em alguns casos, onde a casca era mais grossa ou mais escura, foi utilizada a potência máxima de iluminação do circuito, nesses casos verifica-se uma limitação do projeto, limitação essa que poderia ser melhorada em versões futuras com a utilização de LEDs e transistores mais potentes.

O software B-COSFIRE apresentou uma boa segmentação como exemplificado na Figura 36, detectando a maior parte dos vasos quando esses foram inicialmente melhor destacados na imagem original. Em (a) duas imagens originais iluminadas com LEDs, em (b) o resultado da segmentação binarizada e em (c) a sobreposição da imagem original com o resultado da segmentação.

**Figura 36 - Resultado da segmentação sobreposta à imagem original**



**Fonte: Autoria própria**

O software B-COSFIRE usa parâmetros pré-definidos pelo desenvolvedor (Azzopardi et al., 2015) conforme mostrado na Figura 37. Em todas as imagens, o único parâmetro que necessitou ser ajustado e em apenas alguns casos foi o Sigma simétrico, variando do valor padrão 2,4 até 10 em situações extremas para conseguir uma segmentação pelo menos satisfatória em imagens mais críticas.

**Figura 37 - Configurações padrões do B-COSFIRE**

```

MATLAB R2020a - student use
HOME PLOTS APPS EDITOR PUBLISH VIEW
New Open Save Find Files Compare Print Go To Comment Indent Breakpoints Run Run and Advance Run and Time
FILE NAVIGATE EDIT BREAKPOINTS RUN

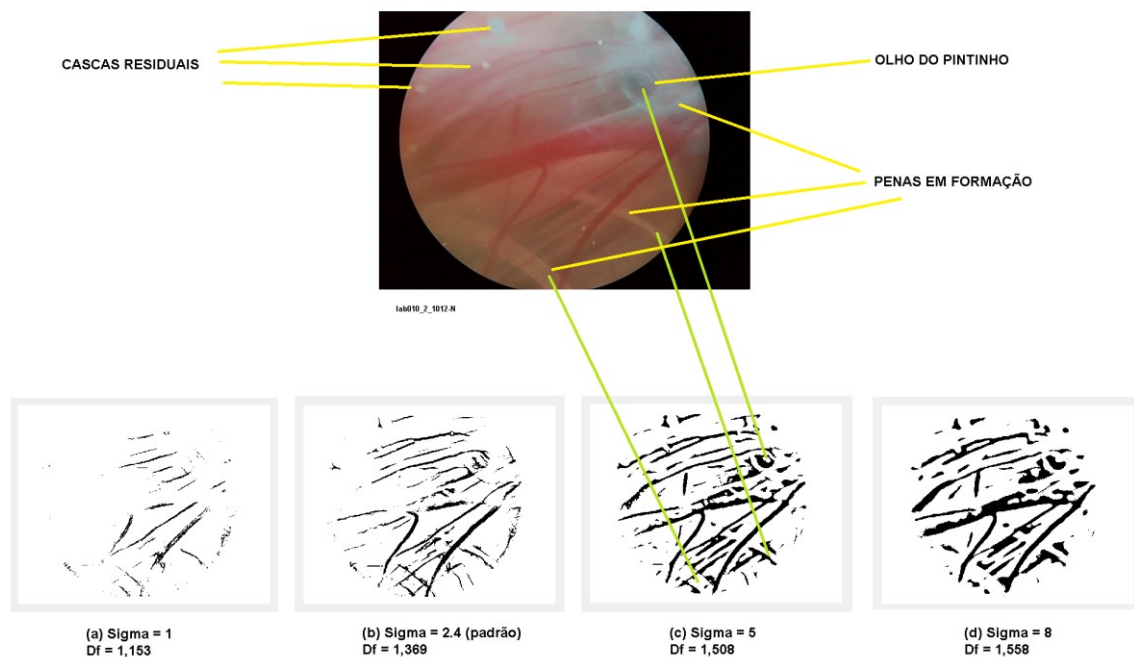
D:\B-COSFIRE\B-COSFIRE
Editor - D:\B-COSFIRE\B-COSFIRE\ExampleBloodVesselSegmentation.m*
ExampleBloodVesselSegmentation.m* BCOSFIRE_media15.m preprocess.m fakepad.m +
40 % Example with an image from DRIVE data set
41 %image = double(imread('./data/Retina_example/test/images/03-Vessel_L.jpg')) ./ 255;
42 file = 'Lab007_1-1012-L';
43 diretorio = 'C:/Users/Marcelo/Dropbox/Temp/';
44 image = double(imread([diretorio, file, '.png'])) ./ 255;
45
46
47 %% Symmetric filter params
48 symmfilter = struct();
49 symmfilter.sigma = 2.4;
50 symmfilter.len = 8;
51 symmfilter.sigma0 = 3;
52 symmfilter.alpha = 0.7;
53
54 %% Asymmetric filter params
55 asymmfilter = struct();
56 asymmfilter.sigma = 1.8;
57 asymmfilter.len = 22;
58 asymmfilter.sigma0 = 2;
59 asymmfilter.alpha = 0.1;
60
61 %% Filters responses
62 % Thresholds values
63 % DRIVE -> preprocesssthresh = 0.5, thresh = 37
64 % STARE -> preprocesssthresh = 0.5, thresh = 40
65 % CHASE_DB1 -> preprocesssthresh = 0.1, thresh = 38
66 output = struct();
67 if nargout == 1 || nargout == 0
68 [output.respimage] = BCOSFIRE_media15(image, symmfilter, asymmfilter, 0.5);
69 elseif nargout == 2
70 [output.respimage, oriensmap] = BCOSFIRE_media15(image, symmfilter, asymmfilter, 0.5);
71 else
72 error('ERROR: too many output arguments !');

```

Fonte: Azzopardi et al. (2015)

Algumas modificações de sigma (STRISCIUGLIO e PETKOV, 2017) podem acarretar situações indesejadas conforme mostrado na Figura 38, onde abaixo do valor padrão houve falhas na segmentação e acima podem causar distorções ou engrossamento dos vasos detectados.

**Figura 38 - Níveis de variação de sigma**

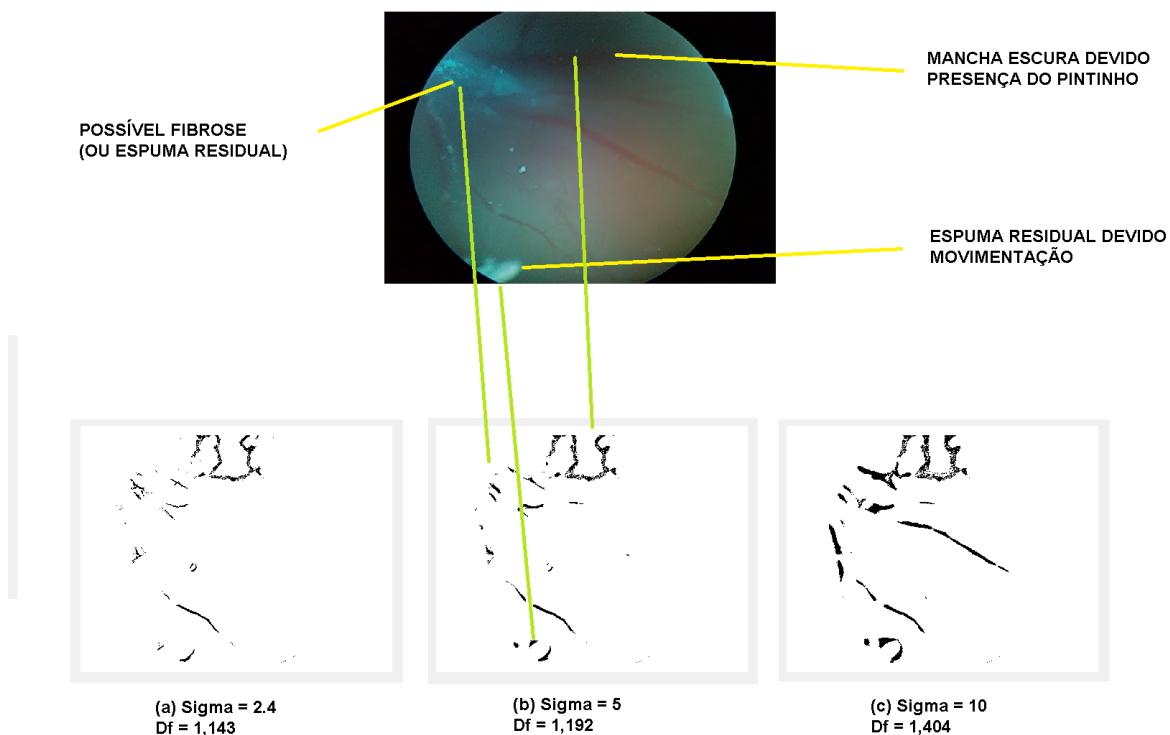


**Fonte: Autoria própria**

Na Figura 38 em (b) os níveis de detalhes obtidos se aproximam do máximo que o B-COSFIRE consegue obter sem começar a interpretar outras formas e a gerar segmentações ruidosas como mostrado em (c) onde os detalhes do embrião são segmentados indevidamente gerando dados indevidos, o que pode interferir no cálculo da densidade (STRISCIUGLIO e PETKOV, 2017). Valores de sigma muito baixos (a) são insuficientes e a detecção de vasos fica muito abaixo do esperado. Já valores muito altos de sigma (d), ressaltam os vasos mais calibrosos enquanto os mais finos começam a perder suas limitações dentro da segmentação e começam a perder a forma. O aumento da densidade fractal não deve ser validado quando ocorre a saturação da imagem pelo aumento do sigma, por isso, pela qualidade da imagem obtida com os valores padrões proposto pelo B-COSFIRE optou-se por manter esses valores propostos.

Em alguns poucos casos específicos, para um aproveitamento da imagem disponível, optou-se por utilizar um sigma mais elevado como exemplificado na Figura 39.

**Figura 39 - Utilização de sigma mais elevado**



**Fonte: Autoria própria**

Na Figura 39 em (a) o nível de detalhamento usando valores padrões de sigma foi muito baixo, com o aumento do sigma (b) a presença dos vasos são mais destacados, porém, as características não desejáveis começam a se sobressair também. Nesse exemplo percebe-se que efeitos dos compostos utilizados podem gerar alguma reação ou até mesmo sinais de desidratação podem interferir na qualidade da imagem. Em (c) a qualidade dos vasos se destacam mais, porém os artefatos começam a interferir ao se medir a densidade fractal.

### 4.3 Análise estatística das amostras

Foram analisadas um total de 40 amostras (Quadro 9), divididas em grupos de compostos e de acordo com as concentrações utilizadas. A densidade fractal calculada está apresentada nas colunas internas de acordo com a fonte de iluminação. As colunas à direita contém a média da densidade de acordo com o grupo que possui a mesma concentração do composto utilizado.

**Quadro 9 – Compostos em sequência de concentração**

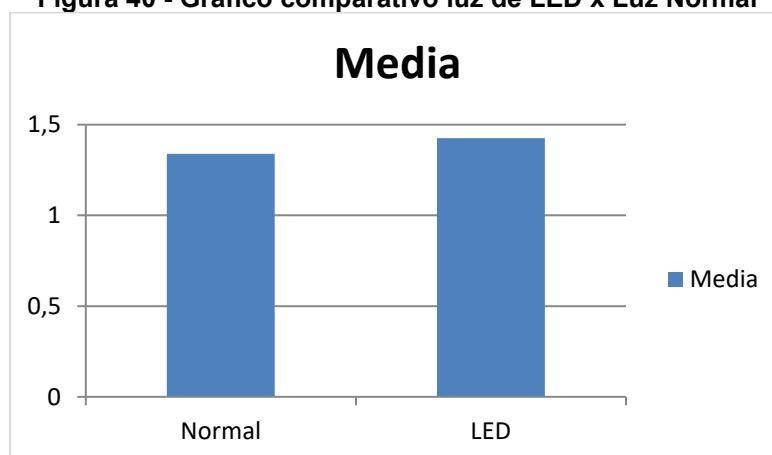
Composto testado	Concentração	Densidade fractal		Média da densidade	
		Normal	LED	Normal	LED
Controle	Nenhuma	1,384	1,481	1,443	1,501
		1,516	1,581		
		1,502	1,515		
		1,369	1,428		
Células tumorais		1,534	1,563	1,534	1,563
Vanadato de Cobre	0,5µg/mL	1,361	1,443	1,361	1,443
	1µg/mL	1,360	1,436	1,313	1,433
	1µg/mL	1,125	1,375		
	1µg/mL	1,455	1,489		
	3,15µg/mL	1,117	1,566	1,164	1,543
	3,15µg/mL	1,149	1,503		
	3,15µg/mL	1,227	1,561		
MI-D	5µM	1,325	1,234	1,369	1,402
	5 µM	1,412	1,569		
	12,5 µM	1,395	1,498	1,371	1,407
	12,5 µM	1,346	1,316		
	25 µM	1,326	1,408	1,326	1,408
	50 µM	1,335	1,408	1,287	1,284
	50 µM	1,311	1,277		
	50 µM	1,367	1,428		
	50 µM	1,192	1,055		
	50 µM	1,229	1,251		
Vanadato de prata	1µg/mL	1,464	1,452	1,383	1,418
	1µg/mL	1,301	1,384		
	3,01µg/mL	1,396	1,458	1,396	1,458
	3,15µg/mL	1,490	1,410	1,287	1,429
	3,15µg/mL	1,369	1,425		
	3,15µg/mL	1,251	1,317		

	3,15µg/mL	1,207	1,472		
	3,15µg/mL	1,388	1,384		
	3,15µg/mL	1,175	1,523		
	3,15µg/mL	1,186	1,476		
	3,15µg/mL	1,228	1,427		
	3,35µg/mL	1,401	1,335	1,463	1,458
	3,35µg/mL	1,524	1,581		
	3,5µg/mL	1,408	1,445		
	3,5µg/mL	1,231	1,439	1,340	1,409
	3,5µg/mL	1,381	1,342		
	5µg/mL	1,447	1,397	1,447	1,397
	25µg/mL	1,360	1,415	1,360	1,415

Fonte: Autoria própria

Estatisticamente o coeficiente de variação calculado ficou em 13,45% para LED e 11,84% para iluminação normal, comprovando a homogeneidade das amostras testadas. Conforme a Figura 40 percebe-se que a média dos valores de densidade obtidos com a luz LED ( $1,426 \pm 0,106$ ) foi maior significativamente ( $p < 0,05$ ) que a luz normal ( $1,338 \pm 0,113$ ). Sendo que houve um ganho de aproximadamente 7%, o que favoreceu os experimentos, por aumentar a definição dos vasos sanguíneos e, por conseguinte, propiciar uma quantificação mais fiel dos vasos.

Figura 40 - Gráfico comparativo luz de LED x Luz Normal



Fonte: Autoria própria



## 5 CONCLUSÃO

Muitas das dificuldades observadas nos experimentos foram contornadas com a câmara de iluminação substituindo a iluminação padrão do estereomicroscópio Leica.

Os vasos mais profundos da CAM foram bem destacados, melhorando a observação do seu crescimento em todas as dimensões, garantindo uma melhor definição nos resultados dos experimentos.

As influências externas, tanto a térmica quanto a de objetos estranhos emitindo luzes, deixaram de ser uma preocupação devido ao isolamento que a câmara proporcionou.

Facilitou obter um ângulo de observação mais apropriado, pois os LEDs ficam posicionados em torno do objeto analisado e com o ajuste de luminosidade tornou-se possível corrigir o brilho e a saturação evitando-se assim reflexos e sombras na superfície.

O processo de segmentação usando o B-COSFIRE se demonstrou relativamente eficiente para definir dentro das imagens o que é vaso ou não. Trata-se de um filtro treinável que dispensa a utilização de um banco de imagens, fato inviável devido à enorme variedade de formações e situações em que se encontram as CAM depois da aplicação de alguns compostos para testes.

O cálculo das dimensões fractais capturou consistentemente a quantidade de vasos sanguíneos dentro de uma CAM independente das dimensões e ângulos que se encontram esses vasos, facilitando a verificação do comportamento de agentes angiogênicos ou antiangiogênicos, isso de forma automatizada, dispensando a contagem manual para acompanhamento dos resultados.

## 5.1 Trabalhos Futuros

Seguindo a mesma linha de raciocínio dentro das pesquisas com iluminação, existem muitas possibilidades em termos de melhorias no corpo de iluminação, com a utilização de LEDs mais eficientes e mais potentes. Testes com LEDs de colorações variadas (RGB), também pode ser cogitado como alternativa para substituição de corantes que acentuam a coloração de vasos e que podem alterar quimicamente a amostra, influenciando nos resultados finais.

A pouca quantidade de amostras não permite fazer uma avaliação precisa do comportamento de cada composto utilizado. Um acompanhamento estatístico de cada composto poderia descrever reações que influenciam na composição e características das membranas assim indicando prováveis melhorias no processo de iluminação de uma forma que atenda as necessidades experimentais.

Com os resultados verificados com a utilização do B-COSFIRE que é desenvolvido no Matlab, infere-se sua utilização em outros métodos de contagem, servindo de base para o desenvolvimento de algoritmos de processamento de imagens para a análise automática das imagens, de parâmetros importantes para a quantificação da vascularização das membranas CAM, tais como número de vasos, número de bifurcações, estimativa do número de vasos pelo método da intersecção com grade sobreposta, *vessel density index (vdi%)*.

A automatização desse processo se torna viável, sendo necessário realimentar o circuito de iluminação até encontrar melhores valores, tornando possível um acompanhamento em uma amostragem significativamente mais numerosa sem o desgaste do operador.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. **Biologia molecular da célula**. 2008.

AL-DIRI, B.; HUNTER, A.; STEEL, D. An Active Contour Model for Segmenting and Measuring Retinal Vessels. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, v. 28, n. 9, p. 1488–1497, 2009.

AL-KADI, T.; AL-TUWAIJRI, Z.; AL-OMRAN, A. Arduino Wi-Fi network analyzer. **Procedia Computer Science**, v. 21, p. 522–529, 2013.

AL-RAWI, M.; QUTAISHAT, M.; ARRAR, M. An improved matched filter for blood vessel detection of digital retinal images. **Computers in Biology and Medicine**, v. 37, n. 2, p. 262–267, 2007.

AMCAP. **Software AMCAP**. Link: <<https://amcap.br.uptodown.com/windows>>. Acessado em: Dezembro de 2020.

ANDRADE, S.; FAN, T.; LEWIS, G. Quantitative *in vivo* studies on angiogenesis in a rat sponge model. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 68, n. 6, p. 755–766, 1987.

ANTTI, N.; VALERIE, D.; OLLI, Y.-H.; WEI, Z.; SHMULEVICH, I. Analysis of angiogenesis using in vitro experiments and stochastic growth models. **PHYSICAL REVIEW**, v. 72, n. 6, p. 062902–1– 062902–4, 2005.

AOYAMA, Y.; TOSHIKI, Y. An led module array system designed for streetlight use. **2008 IEEE Energy 2030 Conference**, 2008.

ARDUINO. **Arduino**. Disponível em: < <http://www.arduino.cc/>>. Acessado em: Janeiro de 2020.

ARDUINO **CREATIVE**. Creative Commons Disponível em: <<https://creativecommons.org>>. Acessado em: janeiro de 2021

ARDUINO IDE, **Arduino-cartilha para programação em C**, Ed. 1.0,2012. Link: <[http://www.arduinoetecnologia.com.br/upload/apostilas/CartilhadoArduino\\_ed1.pdf](http://www.arduinoetecnologia.com.br/upload/apostilas/CartilhadoArduino_ed1.pdf)> Acessado em: Janeiro 2020.

ARDUINO **PWM**. HIRZE, Timothy.PWM. 2018. Link: <<https://www.arduino.cc/en/Tutorial/PWM>>. Acessado em: Fevereiro de 2020.

AZZOPARDI, G.; PETKOV, N. Automatic detection of vascular bifurcations in segmented retinal images using trainable COSFIRE filters. **Pattern Recognition Letters**, v. 34, n. 8, p. 922–933, 2013.

AZZOPARDI, G.; STRISCIUGLIO, N.; VENTO, M.; PETKOV, N. Trainable COSFIRE filters for vessel delineation with application to retinal images. **Medical Image Analysis**, v. 19, n. 1, p. 46–57, 2015

BESICOVITCH, F. R. S. Mathematics at Cambridge. **Nature**, v. 165, n. 4192, p. 342–342, 1950.

BLATT, R. J.; CLARK, A. N.; COURTNEY, J.; TULLY, C.; TUCKER, A. L. Automated quantitative analysis of angiogenesis in the rat aorta model using Image-Pro Plus 4.1. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 75, n. 1, p. 75–79, 2004.

BO, Z.; LIYA, A.; SHAO, L.; ZHONGYU, X. AngioIQ : a novel automated analysis approach for angiogenesis image quantification. **2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics**, 2009.

BRIGGER, I.; COUVREUR, C.; DUBERNET, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 24–36, 2012.

BROWN, C. T.; WITSCHHEY, W. R. T.; LIEBOVITCH, L. S. The broken past: Fractals in archaeology. **Journal of Archaeological Method and Theory**, v. 12, n. 1, p. 37–78, 2005

CADUFF, J. H.; FISCHER, L. C.; BURRI, P. H. Scanning Electron microscopic study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. **The Anatomical record. New York**, v. 216, n. 2, p. 154–164, 1986.

CALVO, D.; ORTEGA, M.; PENEDO, M. G.; ROUCO, J. Automatic detection and characterisation of retinal vessel tree bifurcations and crossovers in eye fundus images. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 103, n. 1, p. 28–38, 2011.

CHANG, M. H.; DAS, D.; VARDE, P. V.; PECHT, M. Light emitting diodes reliability review. **Microelectronics Reliability**, v. 52, n. 5, p. 762–782, 2012.

CHAPMAN, N.; DELL'OMO, G.; SARTINI, M. S.; et al. Peripheral vascular disease is associated with abnormal arteriolar diameter relationships at bifurcations in the human retina. **Clinical Science**, v. 103, n. 2, p. 111, 2002.

CHAVES, A. M.; SILVA, G. Proposta De Uma Arquitetura De Software E Funcionalidades Para Implementação De Um Ambiente Integrado De Desenvolvimento Para a Linguagem Php Software. **I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí**, p. 1–5, 2008.

CHEN, J.; SOMANATH, P. R.; RAZORENOVA, O.; et al. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability *in vivo*. **Nat Med**, v. 11, n. 11, p. 1188–1196, 2008.

CIELAB. **The International Commission on Illumination**. Link: <<https://cie.co.at/>>. Acessado em: Janeiro de 2021.

COBB. **Guia De Manejo De Incubação**. Disponível em: <[https://wp.ufpel.edu.br/avicultura/files/2012/04/Guia\\_incubação\\_Cobb.pdf](https://wp.ufpel.edu.br/avicultura/files/2012/04/Guia_incubação_Cobb.pdf)>. Acessado em: Março de 2020.

COLLINS, C. E.; YOUNG, N. A.; FLAHERTY, D. K.; AIREY, D. C.; KAAS, J. H. A rapid and reliable method of counting neurons and other cells in brain tissue: A comparison of flow cytometry and manual counting methods. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 4, n. FEB, p. 10–15, 2010.

COSTA, E. V. L.; JIMENEZ, G. C.; BARBOSA, C. T. F.; NOGUEIRA, R. A. Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in Japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields. **Bioelectromagnetics**, v. 34, n. 2, p. 114–121, 2013.

CRISTINA, C.; LUQUE, G. M.; DEMARCHI, G.; et al. Angiogenesis in pituitary adenomas: Human studies and new mutant mouse models. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, n. Mvd, 2014.

DE MELO DE MENDONÇA, M. B.; DE AMORIM GARCIA, C. A.; DE ALBUQUERQUE NOGUEIRA, R.; et al. Fractal analysis of retinal vascular tree: Segmentation and estimation methods. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 3, p. 413–422, 2007.

DERYUGINA EI. Chorioallantoic membrane microtumor model to study the mechanisms of tumor angiogenesis, vascular permeability, and tumor cell intravasation. **Angiogenesis Protocols**. v.1430, p. 283-298. 2016.

DOMENICO, R.; ROBERTO, T. The chick embryo chorioallantoic membrane as an *in vivo* experimental model to study human neuroblastoma. **wileyonlinelibrary.com/journal/jcp**, v. 29, n. 1, 2018.

DONOVAN, D.; BROWN, N. J.; BISHOP, E. T.; LEWIS, C. E. Comparison of three *in vitro* human 'angiogenesis' assays with capillaries formed *in vivo*. **Angiogenesis**, v. 4, n. 2, p. 113–121, 2001.

DUALSHOP. **DualShop**. Link: <[www.ledseleds.com.br/](http://www.ledseleds.com.br/)>. Acessado em: Janeiro de 2021.

DOUKAS, C. N.; MAGLOGIANNIS, I.; CHATZIOANNOU, A. A. Computer-supported angiogenesis quantification using image analysis and statistical averaging. **IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine**, v. 12, n. 5, p. 650–657, 2008.

FABRIZII, M.; MOINFAR, F.; JELINEK, H. F.; KARPERIEN, A.; AHAMMER, H. Fractal analysis of cervical intraepithelial neoplasia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

FANG, B.; WYNNE, H.; MONG, L. L. Reconstruction of vascular structures. **image Processing, 2003. ICIIP 2003. Proceedings. 2003 International Conference on**, p. 157–160, 2003.

FEDER, J. **Fractals**. Boston, MA: Springer US, 1988.

FERNÁNDEZ, E.; JELINEK, H. F. Use of fractal theory in neuroscience: Methods, advantages, and potential problems. **Methods**, v. 24, n. 4, p. 309–321, 2001.

FERRARA, N.; KERBEL, R. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, p. 967–974, 2005.

FERREIRA, N. N.; M.B. FERREIRA, L.; MIRANDA-GONÇALVES, V.; et al. Alginate hydrogel improves anti-angiogenic bevacizumab activity in cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 271–282, 2017.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 285, n. 21, p. 1182–1186, 1971.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature medicine**, v. 1, n. 1, p. 27–31, 1995.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, v. 29, n. 6, p. 8–15, 2002.

GABRIELLI, M. G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: A model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

GHAFFARI-TABRIZI-WIZSY N.; PASSEGGGER C.A.; NEBEL L.; KRISMER F.; HERZER-SCHNEIDHOFER G.; SCHWACH G.; PFRAGNER R. The avian chorioallantoic membrane as an alternative tool to study medullary thyroid cancer. **Endocrine Connections**. 8(5):462-467. 2019.

GRIFFIOEN, A.; THIJSSSEN, V. Galectins in tumor angiogenesis. **Annals of Translational Medicine**, v. 2, n. 9, 2014.

Hamburger, V.; Hamilton, H.L. (1951), A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J. Morphol.**, 88: 49-92, 1951.

HE, Z.; CHEN, H.; LEE, Y.-H.; WU, S.-T. Tuning the correlated color temperature of white light-emitting diodes resembling Planckian locus. **Optics Express**, v. 26, n. 2, p. A136, 2018.

HOLZMANN, P.; NICULESCU-MORZSA, E.; ZWICKL, H.; et al. Investigation of bone allografts representing different steps of the bone bank procedure using the CAM-model. **Altex**, v. 27, n. 2, p. 97–103, 2010.

Huang, W. An angiogenesis platform using a cubic artificial eggshell with patterned blood vessels on chicken chorioallantoic membrane. **PLoS ONE**, 12(4), 1-20. 2017.

IANNACCONE, P. M.; KHOKHA, M. **Fractal Geometry in Biological Systems: An Analytical Approach**. Boca Raton: CRC Press, 1997.

INMETRO **Lâmpadas de LED** -  
<<http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/cartilhas/lampada-led/lampadaled.pdf>>. Acessado em: Janeiro de 2021.

JAIN, R. K.; SCHLENGER, K.; HÖCKEL, M.; YUAN, F. Quantitative angiogenesis assays: Progress and problems. **Nature Medicine**, v. 3, n. 11, p. 1203–1208, 1997.

JELINEK, H.; MENDONÇA, M.; FERNANDO, O.; et al. Fractal Analysis Of The Normal Human Retinal Vasculature. **The Internet Journal of Ophthalmology and Visual Science**, v. 8, n. 2, 2012.

JO, S. A.; LEE, C. H.; KIM, M. J.; FERRACANE, J.; LEE, I. B. Effect of pulse-width-modulated LED light on the temperature change of composite in tooth cavities. **Dental Materials**, v. 35, n. 4, p. 554–563, 2019.

KARPERIEN, A. L.; JELINEK, H. F. **Morphology and Fractal-Based Classifications of Neurons and Microglia A Brief Introduction to Neurons and Microglia**. Albury, NSW, Australia: Charles Sturt University, 2017.

KERBEL, R.; FOLKMAN, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 10, p. 727–739, 2002.

KERR, P. H.; FISHER, E. M.; BUFFINGTON, M. L. Dome lighting for insect imaging under a microscope. **American Entomologist**, v. 54, n. 4, p. 198–200, 2008.



KESKIN, R.; ALISKAN, I. Design of Non-Inverting Buck-Boost Converter for Electronic Ballast Compatible with LED Drivers. **Karaelmas Science and Engineering Journal**, v. 8, n. 2, p. 473–481, 2018.

KRAMES, M. R.; SHCHEKIN, O. B.; MUELLER-MACH, R.; et al. Status and future of high-power light-emitting diodes for solid-state lighting. **IEEE/OSA Journal of Display Technology**, v. 3, n. 2, p. 160–175, 2007.

LEITOLIS, A.; DE SOUZA, F. G.; FREITAS, K.; et al. Tissue damage and embryonic malformation induced by aqueous extract of *Pteridium aquilinum* on chorioallantoic membrane of chick embryo (CAM). **Seminário de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1451–1460, 2017.

LIU, Z.; FAN, F.; WANG, A.; ZHENG, S.; LU, Y. Dll4-Notch signaling in regulation of tumor angiogenesis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, n. 4, p. 525–536, 2014.

LOKMAN, N. A.; ELDER, A. S. F.; RICCIARDELLI, C.; OEHLER, M. K. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an *in vivo* model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9959–9970, 2012.

MANDELBROT, B. B.; WHEELER, J. A. The Fractal Geometry of Nature. **American Journal of Physics**, v. 51, n. 3, p. 286–287, 1983.

MANUAL LEICA. **leica-microsystems**. Link: <<https://www.leica-microsystems.com>>. Acessado em: Fevereiro de 2020.

MARTÍN, M. A.; TAGUAS, F. J. Fractal modelling, characterization and simulation of particle-size distributions in soil. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 454, n. 1973, p. 1457–1468, 1998.

MENDONÇA, A. M.; CAMPILHO, A. Segmentation of retinal blood vessels by combining the detection of centerlines and morphological reconstruction. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, v. 25, n. 9, p. 1200–1213, 2006.

MICHAEL, M.; JAKOB, P. Role of tumour angiogenesis in haematological malignancies. **Swiss Med Wkly**, v. 144, p. w14050, 2014.

MILOSEVIC, N.; RISTANOVIC, D. The box-counting method as an efficient tool for 2D fractal analysis of neuronal dendritic arbor. **5th International Symposium “Fractals in Biology and Medicine”**, v. 1, 2008.

MUNARON, L. Systems biology of ion channels and transporters in tumor angiogenesis: An omics view. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2647–2656, 2015.

NOBEL 2014. **The Nobel Prize in Physics 2014**. Link: <<https://kva.se/nobelphysics2014>>. Acessado em: Fevereiro de 2020.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis**, v. 17, n. 4, p. 779–804, 2014.

OLIVEIRA, C. H. L. DE; COSTA, M. A. D.; COSTA, G. H. Comparação entre a Lâmpada Halógena e o LED como fontes de Iluminação na Microscopia Óptica. **Congresso Brasileiro de Metrologia.**, p. 3–6, 2015.

O'TOOLE, M.; DIAMOND, D. Absorbance based light emitting diode optical sensors and sensing devices. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2453–2479, 2008.

PEITGEN, H.-O.; RICHTER, P. H. **The Beauty of Fractals**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1986.

PIZER, S. M.; AMBURN, E. P.; AUSTIN, J. D.; et al. Adaptive Histogram Equalization and Its Variations. **Computer vision, graphics, and image processing**, v. 39, n. 3, p. 355–368, 1987.

PONTES, A. S. **Desenvolvimento de um fotômetro LED-Vis portátil e microcontrolado por Arduino**, 2014. UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 873–887, 2011.

RANGEL, M. G.; BARSAGLINI SILVA, P.; GUEDE, J. R. A. LED -Iluminação de estado sólido. **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, p. 5, 2011.

REDKIN, A. V.; VDOVIN, V. V.; VAKHTEL, V. M.; LUKYANOVICH, P. A.; MALKINA, N. A. Reduce Adverse Effects of Laparoscopic Cholecystectomy with Pulse Width Modulated LED Light (625 nm, 76 Hz, 23% Duty Cycle). **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 6, p. 293–299, 2017.

REN, R.; ZHANG, F.; LIU, B.; et al. A Closed-Loop Modulation Scheme for Duty Cycle Compensation of PWM Voltage Distortion at High Switching Frequency Inverter. **IEEE Transactions on Industrial Electronics**, v. 67, n. 2, p. 1475–1486, 2018.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; RONCALI, L.; F., D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on angiogenesis. **International Journal of Developmental Biology**, v. 40, n. 6, p. 1189–1197, 1996.

RIBATTI, D.; VACCA, A. Models for studying angiogenesis *in vivo*. **International Journal of Biological Markers**, v. 14, n. 4, p. 207–213, 1999.

RIBATTI, D.; NICO, B.; VACCA, A.; PRESTA, M. The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 85–92, 2006.

RIBATTI, D. The Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model for Tumor Biology. **Experimental Cell Research**, v. 328, p. 314–324, 2014.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. **Mechanisms of development**, 141, 70–77. 2016.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology**, v. 70, p. 97–101, 2017.

RICCI, E.; PERFETTI, R. Retinal blood vessel segmentation using line operators and support vector classification. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, v. 26, n. 10, p. 1357–1365, 2007.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature. London.**, v. 386, n. 6626, p. 671–674, 1997.

ROBOTICS **Brasil Robotics**. Disponível em: <<http://brasilrobotics.blogspot.com.br/>>. Acessado em: Janeiro de 2021

SALES, R. P. **LED, O NOVO PARADIGMA DA ILUMINAÇÃO PÚBLICA**, 2011. LACTEC/IEP.

SEBESTA, R. W. **Conceitos de linguagem de programação**. Bookman, 2003.

SERBEDZIJA, G. N.; FLYNN, E.; WILLET, C. E. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. **Angiogenesis**, v. 3, n. 4, p. 353–359, 1999.

SETIAWAN, A. W.; MENGKO, T. R.; SANTOSO, O. S.; SUKSMONO, A. B. Color retinal image enhancement using CLAHE. **Proceedings - International Conference on ICT for Smart Society 2013: “Think Ecosystem Act Convergence”, ICISS 2013**, p. 215–217, 2013.

SCHROEDER, M. R. **Fractals, Chaos and Power Laws**. Germany, 2009.

SOARES, J. V. B.; LEANDRO, J. J. G.; CESAR, R. M.; JELINEK, H. F.; CREE, M. J. Retinal vessel segmentation using the 2-D Gabor wavelet and supervised classification. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, v. 25, n. 9, p. 1214–1222, 2006.

STRISCIUGLIO, N.; AZZOPARDI, G.; VENTO, M.; PETKOV, N. Supervised vessel delineation in retinal fundus images with the automatic selection of B-COSFIRE filters. **Machine Vision and Applications**, v. 27, n. 8, p. 1137–1149, 2016.

STRISCIUGLIO, N.; PETKOV, N. Delineation of line patterns in images using B-COSFIRE filters. **arXiv**, 2017.

STUTTFELD, E.; BALLMER-HOFER, K. Structure and function of VEGF receptors. **IUBMB Life**, v. 61, n. 9, p. 915–922, 2009.

TAKAYASU, H. **Fractals in the Physical Sciences**. Manchester/New York: Manchester University Press, 1990.

TSAI, C. L.; STEWART, C. V.; TANENBAUM, H. L.; ROYSAM, B. Model-based method for improving the accuracy and repeatability of estimating vascular bifurcations and crossovers from retinal fundus images. **IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine**, v. 8, n. 2, p. 122–130, 2004.

UNICAMP, **LED – O que é, e como funciona**. Disponível em: <<http://www.iar.unicamp.br/lab/luz/dicasemail/led/dica36.htm>>. Acessado em: janeiro de 2020.

VINAYAK, R.; PUTTANANJIAH, S.; CHATTERJI, A.; SALIMATH, B. Anti-proliferative and angio-suppressive effect of *Stoechospermum marginatum* (C. Agardh) Kutzing extract using various experimental models. **Nutrition Research and Practice**, v. 8, n. 4, p. 377–385, 2014.

WAIDE, P. Phase out of incandescent lamps Implications for international supply and demand for regulatory compliant lamps. **IEA – INTERNATIONAL ENERGY AGENCY**, p. 86, 2010.

XIE, W.; GRILLO, D. C.; KOBAYASHI, M.; et al. Blue and blue/green laser diodes and LED-based display devices. **Journal of Crystal Growth**, v. 127, n. 1–4, p. 287–290, 1993.

YAM, F. K.; HASSAN, Z. Innovative advances in LED technology. **Microelectronics Journal**, v. 36, n. 2, p. 129–137, 2005.

YANG, S. H.; LIN, J. K.; HUANG, C. J.; et al. Silibinin inhibits angiogenesis via Flt-1, but not KDR, receptor up-regulation. **Journal of Surgical Research**, v. 128, n. 1, p. 140–146, 2005.

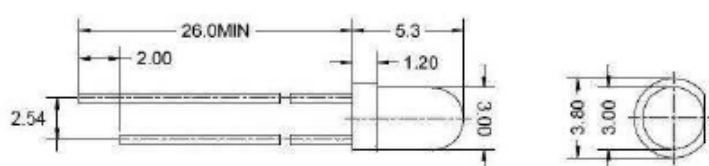
ZHANG, YONGCHANG; XIE, W.; LI, Z.; ZHANG, YINGCHAO. Model predictive direct power control of a PWM rectifier with duty cycle optimization. **IEEE Transactions on Power Electronics**, v. 28, n. 11, p. 5343–5351, 2013.

ZHANG, Y.; YANG, H. Model predictive torque control of induction motor drives with optimal duty cycle control. **IEEE Transactions on Power Electronics**, v. 29, n. 12, p. 6593–6603, 2014.

## ANEXO 1 – LEDs Características Técnicas



## LED 3MM ULTRA BRILHO PTH

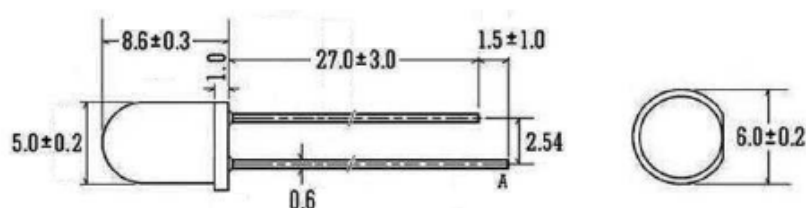


- Ângulo de visão: 20-30°
- Cor do corpo: transparente (cristal)
- Tensão Reversa [V]:  $\leq 5$
- Corrente Reversa [ $\mu$ A]:  $\leq 10$
- Resistência à ESD [V]: 1000
- Temperatura de Armazenamento [°C]: -40 a 90
- Temperatura de Operação [°C]: -40 a 85
- Vida Útil Estimada [h]: 100.000
- Processo de Solda: Onda ou Manual = 260°C por 5s (máx.)

Código	Cor de Emissão	Potência	Corrente Direta	Tensão Direta	Comprimento de Onda ou Temperatura de Cor	Fluxo Luminoso ou Intensidade Luminosa
K1234	BRANCO QUENTE	60mW	20mA	3,0-3,2V	3000-3200K	5000-7000mcd
K2164	BRANCO FRIO	60mW	20mA	3,0-3,2V	5500-6000K	8000-10000mcd
K1495	BRANCO FRIO	60mW	20mA	3,0-3,2V	6000-6500K	5000-7000mcd
K1683	VERMELHO	60mW	20mA	1,8-2,2V	620-625nm	2000-3000mcd
K1684	VERDE	60mW	20mA	3,0-3,2V	515-520nm	7000-9000mcd
K1685	AZUL	60mW	20mA	3,0-3,2V	460-465nm	4000-6000mcd
K1686	AMARELO ÂMBAR	60mW	20mA	1,8-2,2V	585-590nm	2000-3000mcd



## LED 5MM DIFUSO CORPO BRANCO LEITOSO PTH



- Ângulo de visão: 160-180°
- Cor do corpo: branco leitoso
- Tensão Reversa [V]:  $\leq 5$
- Corrente Reversa [ $\mu$ A]:  $\leq 10$
- Resistência à ESD [V]: 1000
- Temperatura de Armazenamento [°C]: -40 a 90
- Temperatura de Operação [°C]: -40 a 85
- Vida Útil Estimada [h]: 100.000
- Processo de Solda: Onda ou Manual = 260°C por 5s (máx.)

Código	Cor de Emissão	Potência	Corrente Direta	Tensão Direta	Comprimento de Onda ou Temperatura de Cor	Fluxo Luminoso ou Intensidade Luminosa
K1220	BRANCO QUENTE	60mW	20mA	3,0-3,2V	3000-3200K	1500-2000mcd
K1222	BRANCO FRIO	60mW	20mA	3,0-3,2V	6000-6500K	1500-2000mcd
K1693	VERMELHO	60mW	20mA	1,8-2,2V	620-625nm	1000-1200mcd
K1694	VERDE	60mW	20mA	3,0-3,2V	515-520nm	1500-2000mcd
K1695	AZUL	60mW	20mA	3,0-3,2V	460-465nm	1500-2000mcd
K1696	AMARELO ÂMBAR	60mW	20mA	1,8-2,2V	585-590nm	1000-1200mcd

## ANEXO 2 – Código do Arduino

```
// Projeto : Controle de luminosidade de led 3 canais com potenciometro

int pinoled_C1 = 9; //Pino logado ao anodo do led Canal1
int pinoled_C2 = 10; //Pino logado ao anodo do led Canal2
int pinoled_C3 = 11; //Pino logado ao anodo do led Canal3

int pinopot_C1 = 3; //Pino ligado do pino A3 ao pino central do potenciometro Red
int pinopot_C2 = 4; //Pino ligado do pino A4 ao pino central do potenciometro Green
int pinopot_C3 = 5; //Pino ligado do pino A5 ao pino central do poenciometro Blue

int valorpot_C1 = 0; //Armazena valor lido do potenciometro, entre 0 e 1023
int valorpot_C2 = 0; //Armazena valor lido do potenciometro, entre 0 e 1023
int valorpot_C3 = 0; //Armazena valor lido do potenciometro, entre 0 e 1023

float luminosidade_C1 = 0; //Valor de luminosidade do led
float luminosidade_C2 = 0; //Valor de luminosidade do led
float luminosidade_C3 = 0; //Valor de luminosidade do led

float luminosidade_C1_t = 0; //Valor de luminosidade do led
float luminosidade_C2_t = 0; //Valor de luminosidade do led
float luminosidade_C3_t = 0; //Valor de luminosidade do led

int variacao = 180;

void setup()
{
  Serial.begin(9600); //Inicializa a serial

  pinMode(pinoled_C1, OUTPUT); //Define o pino do led como saída
  pinMode(pinopot_C1, INPUT); //Define o pino do potenciometro como entrada

  pinMode(pinoled_C2, OUTPUT); //Define o pino do led como saída
  pinMode(pinopot_C2, INPUT); //Define o pino do potenciometro como entrada

  pinMode(pinoled_C3, OUTPUT); //Define o pino do led como saída
  pinMode(pinopot_C3, INPUT); //Define o pino do potenciometro como entrada
}

void loop()
{
  // Le o valor - analogico - do pino do potenciometro
  valorpot_C1 = analogRead(pinopot_C1);
  valorpot_C2 = analogRead(pinopot_C2);
  valorpot_C3 = analogRead(pinopot_C3);

  //Converte e atribui para a variavel "luminosidade" o
  // valor lido do potenciometro
  luminosidade_C1 = map(valorpot_C1, 0, 1023, 0, variacao);
```



```
luminosidade_C2 = map(valorpot_C2, 0, 1023, 0, variacao);
luminosidade_C3 = map(valorpot_C3, 0, 1023, 0, variacao);

//Mostra o valor lido do potenciometro no monitor serial
//Serial.print("Potenciometro R: "); Serial.println(valorpot_C1);
//Serial.print("Potenciometro G: "); Serial.println(valorpot_C2);
//Serial.print("Potenciometro B: "); Serial.println(valorpot_C3);

if ((luminosidade_C1 != luminosidade_C1_t) || (luminosidade_C2 !=
luminosidade_C2_t) || (luminosidade_C3 != luminosidade_C3_t)) {
  //Mostra o valor da luminosidade no monitor serial
  Serial.print(" Luminosidade R, G, B: "); Serial.print(luminosidade_C1); Serial.print(",
"); Serial.print(luminosidade_C2); Serial.print(", "); Serial.println(luminosidade_C3);

  //luminosidade_C1_t = luminosidade_C1;
  // luminosidade_C2_t = luminosidade_C2;
  // luminosidade_C3_t = luminosidade_C3;
}

//Envia sinal analogico para a saída do led, com luminosidade variavel
analogWrite(pinoled_C1, luminosidade_C1);
analogWrite(pinoled_C2, luminosidade_C2);
analogWrite(pinoled_C3, luminosidade_C3);

// delay(10);
}
```