

Artigo Original

Recebido em 21/10/2008, aceito em 24/07/2009

**Construção e caracterização
de um sistema de imagens
hiperespectrais**

*Construction and characterization of
a hyperspectral imaging system*

Emery Cleiton Cabral Correia Lins*
Luis Gustavo Marcassa

Instituto de Física de São Carlos, USP
Av. Trabalhador São-carlense, 400
Cx. Postal 369
13566-590 São Carlos, SP – Brazil
E-mail: emerylins@ursa.ifsc.usp.br

*Autor para correspondência

Resumo

O uso de interação da luz com a matéria não é um conceito novo em biologia para a detecção de processos físico-químicos, embora ainda seja utilizado de uma forma rudimentar. Já é sabido que imagens de refletância e fluorescência podem revelar informações importantes sobre tais processos em amostras biológicas. Apesar deste potencial, os sistemas experimentais disponíveis para a obtenção de tais imagens costumam ser complexos e de difícil implementação. Neste trabalho é descrita a construção e a caracterização de uma montagem experimental para produção de imagens hiperespectrais entre 400 e 1.000 nm. O sistema é composto de um espectrômetro, um conjunto de lentes para formação da imagem e uma câmera CCD para capturá-la. São descritos em detalhes o procedimento de calibração do sistema, o qual envolve os parâmetros largura da imagem, campo de visão, resolução espectral e espacial. O sistema de iluminação utiliza diodos emissores de luz de alta potência, tanto de luz branca quanto em 470 e 405 nm. Demonstramos que o sistema construído é capaz de obter imagens de fluorescência e/ou refletância de amostras biológicas. Como exemplos de aplicações, o instrumento aqui desenvolvido foi utilizado em dois campos distintos, a agricultura e a odontologia. Foram obtidas imagens de fluorescência de folhas de citros contaminadas com cancro cítrico, e de processos de desmineralização em dentes. Os resultados demonstram que o sistema construído está operando como projetado.

Palavras-chave: Imagens multiespectrais/hiperespectrais, Fluorescência, Espectrógrafo.

Abstract

The use of light-matter interaction for the detection of chemical-physical processes is not a new concept in biology, though it is still used in a rudimentary form. It is already known that reflectance as well as fluorescence images can reveal important information on such processes in biological samples. In spite of this potential, the experimental available image systems usually are complexes and of difficult implementation. In this work, we describe the construction and characterization of an experimental device to produce hyperspectral images between 400 and 1,000 nm. The system is composed of a spectrometer, a set of lenses for image formation and a CCD camera to capture it. We describe in details also the calibration procedure of the system, which involves parameters as image width, field of view, spectral and space resolution. The illumination system uses high power light emitting diodes, either at white light or at 470 and 405 nm. We demonstrate that our system is able to obtain reflectance as well as fluorescence images of biological samples. As examples of applications, we use it into two different fields, agriculture and dentistry. We obtained fluorescence images of citrus leaves contaminated with citrus canker and demineralization processes in teeth. Our results demonstrate that our system is operating as designed.

Keywords: Multispectral/hyperspectral images, Fluorescence, Spectrograph.

Extended Abstract

Introduction

Multispectral imaging systems have improved the accuracy on biophotonics diagnosis, because they allow spectral as well as spatial resolution. Such systems are based on optical devices offering the selection of desired wavelengths. Some examples are acoustic-optical tunable filter (AOTF) (Martin et al., 2006), a Lyot filter or a diffractive element (Vo-Dinh, 2003). Although multispectral imaging has been applied to several areas of biophotonics (Kim et al., 2001; Schultz et al., 2001; Yang et al., 2003), its use by Brazilian research groups is limited. Therefore, this review aims to present basic concepts of hyperspectral systems operation and to describe the construction and characterization of the developed system, which is a spectrograph-based hyperspectral imaging system (HIS).

Characterization of HIS

Basic Components – The HIS is composed by a spectrograph, a CCD camera, an objective lens, a system for sample illumination and a scanner. The spectrograph (Headwall Photonics, model Hyperspec-VNIR®) diffracts radiation into 400-1,000 nm spectral range with a 1.95 nm spectral resolution. It is accompanied by slits of 12 and 40 μm , which avoid images with spectral and spatial superposition. Since the slit reduces the area of observation, it is necessary to scan the sample over the region of interest (ROI). Figure 1 shows an example of hyperspectral image from spectrograph. The zero order as well as the first order of diffraction can be observed. Others orders cannot be visualized due to the small CCD sensor size. Others parameters are observed in Figure 1; ΔL is the width of image and depends on the slit width, ΔP is the distance (number of pixels) from zero order to the wavelengths of first order of diffraction and ΔC is the field of view (FOV) of image.

The camera is a monochromatic scientific CCD camera (Electrim Corporation, model EDC1000HR®) with a 753×244 pixels sensor (8.67×6.59 mm) and an exposure control from 1 to 10^5 ms. The system for sample illumination is composed by nine high power LEDs fixed in a metallic support for heat dissipation. Three groups of LEDs were used: 1) Philips Lumileds Lighting Co., model Luxeon III LXHL-PW09, providing around 3 W optical power white light at D55 standard (Judd et al., 1964); 2) Edison Opto Co., Ultraviolet Edixeon model EDEV-3LA1, providing around 1 W optical power violet light with 405 nm peak and 20 nm FWHM; 3) Philips Lumileds Lighting Co., model Luxeon III LXHL-PB09, providing around 1 W optical power blue light with 470 nm peak and 20 nm FWHM. These LEDs allow to observe either reflectance

or fluorescence images. Figure 2a presents a scheme of HIS, while Figure 2b presents a digital image of the assembly.

Calibration – The results of spatial and spectral calibration of HIS are presented in Figures 3, 4 and 5. Spatial calibration (Figures 3 and 4) was done through the measure of ΔL , ΔC and spatial resolution as function as distance between HIS and sample. All graphics present a linear behavior. Spectral calibration was performed using 442 nm-HeCd laser, 532 nm (2nd harmonic Nd:YAG laser), 660 and 780 nm (diode laser) and measuring ΔP (Figure 5).

Spectral image composition – The spectral image is composed by applying a computational routine at MATLAB®. This routine selects the ROI of a specific wavelength into all hyperspectral images and concatenate it to compose one spectral image. In order to avoid the interference of the border's slit over spectral image composition only the central region of ROI was concatenated.

Application of HIS

HIS was used in two biophotonic applications at different areas such as agriculture and dentistry. The intention was to prove the ability of HIS to provide spectral and spatial resolution of images. Then, in both cases, digital images of visual sample symptoms as well as hyperspectral fluorescence images were captured and compared.

HIS was first used to observe citrus canker in orange leaves. Figure 6a presents a digital image of an orange leaf infected by citrus canker where its lesions were marked by circles. Figure 6b and 6c present the spectral images of chlorophyll fluorescence emitted at 690 and 740 nm, respectively. All images present similar information about citrus canker contamination and prove that the contrast of spectral fluorescence images can be used to detect lesions to orange leaf healthy tissue.

HIS was also used to study dental decay and demineralization in tooth. Figure 7a presents a digital image of a tooth with marked caries lesion (I and II) and demineralization (III). Figure 7b and 7c present the spectral image of tooth's autofluorescence at 520 and 612 nm, respectively. Again the contrast of spectral fluorescence images is able to discriminate lesion to healthy tooth areas since the autofluorescence of healthy areas is different to lesion.

Conclusions

This study describes in details the construction and calibration of a HIS. It was then applied for studies in citrus leaves and tooth. The results allow to conclude that HIS is able to produce either fluorescence or reflectance images of biological samples, and is therefore more accurate than punctual spectroscopy.

Introdução

Nos últimos anos, o desenvolvimento de sistemas ópticos capazes de formar imagens com resolução espectral tem possibilitado maior precisão nos diagnósticos aplicados nas áreas da biofotônica. Essa modalidade de imagem, que combina a técnica de espectroscopia com a formação de imagens digitais, é denominada imagem multiespectral ou hiperespectral e permite a análise das propriedades ópticas das amostras com resolução espacial e espectral ao mesmo tempo (Vo-Dinh, 2003). Esta é uma grande vantagem quando comparada às técnicas tradicionais, as quais só permitem o estudo de uma porção muito pequena da amostra.

O elemento principal destes sistemas é um dispositivo óptico que permita a seleção do comprimento de onda de interesse para a pesquisa. Este dispositivo óptico pode ser um filtro modulado por onda acústica (Martin *et al.*, 2006), um filtro de Lyot, ou um elemento difrativo (Vo-Dinh, 2003). Cada um destes elementos tem características ópticas diferentes (resolução, transmissão, intervalo de operação) bem como custos distintos. É necessária uma análise precisa de cada problema experimental antes da escolha do elemento mais adequado.

Outro fator importante a ser considerado é a escala do objeto de estudo. Na escala microscópica os sistemas são utilizados principalmente na análise da fluorescência emitida por células e biomoléculas (Schultz *et al.*, 2001). Na escala macroscópica, com resolução de dezenas a milhares de metros, os sistemas têm sido utilizados para monitorar o meio ambiente, plantações e em finalidades militares. Nestes casos, os sistemas podem ser instalados em aviões ou em satélites (Chang, 2003). Em uma escala intermediária os sistemas espectrais podem ser utilizados no diagnóstico de tecidos neoplásicos (Yang *et al.*, 2003), no monitoramento de hortaliças e frutas (Kim *et al.*, 2001) e até mesmo em autenticação de obras de arte (Baronti *et al.*, 1998).

Apesar da técnica de imagem hiperespectral não ser nova, sua utilização no país é muito restrita, talvez devido à complexidade aparente de sua montagem experimental. Assim, o objetivo neste artigo é apresentar os conceitos básicos do sistema de forma didática, através da descrição detalhada da construção de um sistema que utiliza um espectrômetro.

O sistema de imagens hiperespectrais – SIH

Visão geral – O sistema de imagem hiperespectral (SIH) construído tem como objetivo obter imagens espectrais monocromáticas utilizando a radiação emitida, transmitida ou refletida por uma amostra em

comprimentos de onda definidos. O sistema baseia-se na difração da imagem para formar uma imagem hiperespectral e armazená-la. A difração possibilita a seleção espectral e permite assim a obtenção da refletância e a fluorescência emitida por uma amostra.

Em linhas gerais, o SIH é composto por um espectrômetro, uma lente objetiva, uma câmera CCD científica, um computador, um sistema para iluminação da amostra e um *scanner* para varredura da mesma. A iluminação pode ser realizada com luz branca, LED monocromático e ou laser. A escolha depende do que se está interessado em observar. O sistema de iluminação e a lente objetiva permitem a formação da imagem sobre o espectrômetro, que a difrata em vários comprimentos de onda. A imagem difratada é capturada pela câmera CCD e transferida ao computador. O *scanner* é necessário para varrer toda a amostra de interesse.

Formação da imagem hiperespectral – No SIH o espectrômetro é o componente mais importante, uma vez que a dispersão espectral da imagem ocorre nele. Espectrômetros são elementos ópticos passivos baseados em grades de difração que formam uma imagem difratada do campo de visão do conjunto espectrômetro e lente. Em seguida a câmera é posicionada no plano onde a imagem difratada é formada, sendo assim possível capturá-la (Fletcher-Holmes e Harvey, 2005).

Para que não haja superposição espacial de imagens de comprimentos de onda distintos, uma fenda de algumas dezenas de micra deve ser utilizada entre a lente e o espectrômetro. Isso evita a superposição espectral, porém faz com que a região de interesse (ROI) de análise da amostra seja reduzida, implicando na necessidade da varredura da amostra.

A Figura 1 é um exemplo típico de uma imagem hiperespectral obtida utilizando-se a fenda. Neste exemplo, uma folha de papel branca A4 foi utilizada como amostra. Para a aquisição da imagem a folha de papel foi iluminada por uma lâmpada de mercúrio de 10 mW de potência e o tempo de exposição da câmera foi de 10 ms. Na imagem é possível identificar duas ordens da difração do espectrômetro, a ordem zero e a primeira ordem de difração. A segunda ordem da difração não é detectada devido à limitação do tamanho do sensor CCD da câmara. Na primeira ordem de difração são observadas regiões bem definidas numeradas de 1 a 4. Enquanto as regiões 1 e 3 são referentes às linhas de emissão da lâmpada em 435 e 546 nm, as regiões 2 e 4 são referentes à fluorescência emitida pelo papel. Apesar da detecção, nenhuma outra linha de emissão da lâmpada é observada devido ao baixo tempo de exposição da câmara CCD.

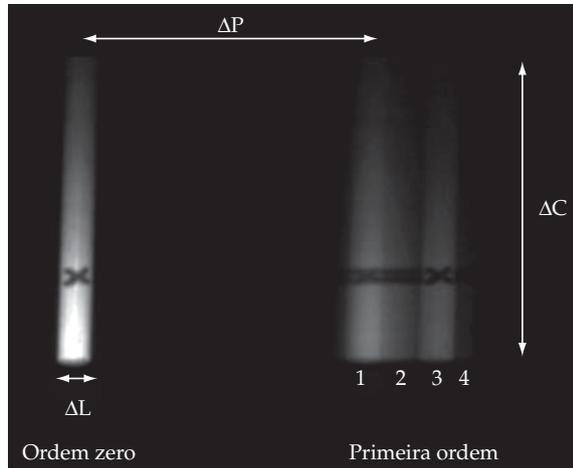


Figura 1. Exemplo de imagem hiperespectral. Ela revela a ordem zero e a primeira ordem de difração e outros parâmetros da calibração do SIH. Neste exemplo uma folha de papel branco foi iluminada por uma lâmpada de mercúrio. Regiões 1 e 3: reflexão das linhas emitidas pela lâmpada de mercúrio em 435 e 536 nm. Regiões 2 e 4: fluorescência emitida pelo papel. Na calibração desta imagem $\Delta L = 2$ mm e $\Delta C = 40$ mm. **Figure 1.** An example of hyperspectral image. It shows the zero and first diffraction order besides others calibration's parameters of HIS as well. For this example, one white paper-sheet was illuminated by a mercury lamp. Regions 1 and 3: reflection of the lines emitted by lamp at 435 and 536 nm. Regions 2 and 4: fluorescence emitted by paper. For this example $\Delta L = 2$ mm and $\Delta C = 40$ mm.

Este exemplo também permite identificar outros parâmetros importantes da imagem hiperespectral. A largura da imagem observada (ΔL) depende da largura da fenda utilizada e do sistema de lentes utilizado. A posição de um comprimento de onda na primeira ordem em relação à ordem zero de difração (ΔP) está associada com a dispersão do espectrômetro, sendo um parâmetro intrínseco que será calibrado. Outro parâmetro importante é o campo de visão (ΔC) que determina a região de máxima detecção do sistema, e está intrinsecamente associada à distância da amostra até o sistema de lentes e as características deste. Este parâmetro também requer calibração.

Especificações dos componentes do sistema – O espectrógrafo utilizado no SIH (Headwall Photonics, modelo Hyperspec-VNIR®) opera na região de 400 a 1.000 nm com resolução espectral de 1,95 nm. Fendas de 12 e 40 μm podem ser utilizadas neste sistema. Obviamente que uma fenda menor leva um ΔL menor, o que implica na necessidade de dividir a amostra em um número maior de seções, o que consome tempo e recursos computacionais. Por estas razões decidiu-se operar o sistema com fenda de 40 μm .

Uma câmara CCD monocromática (Electrim Corporation, modelo EDC-1000HR®) foi utilizada para capturar as imagens. Essa câmara possui um sensor de $8,67 \times 6,59$ mm em uma matriz de 753×244 pixels e um controle eletrônico de tempo de exposição de 1 a 10^5 ms. A exposição durante longos tempos é necessária para capturar imagens de fluorescência. É importante ressaltar que longo tempo de exposição também leva a um aumento do ruído de fundo na câmara CCD. Para compensar isso uma imagem no escuro também é capturada para que seja possível fazer a subtração e eliminar assim os ruídos.

O sistema de iluminação das amostras é composto por nove LEDs de alta potência, divididos em três conjuntos de três LEDs. Um conjunto é formado por LEDs Luxeon III LXHL-PW09 (Philips Lumileds Lighting Co.) que emitem luz branca no padrão de iluminação D55 (Judd *et al.*, 1964) com potência óptica emitida de 1 W por LED. O segundo conjunto é composto por LEDs Ultraviolet Edixeon EDEV-3LA1 (Edison Opto Co.) os quais emitem luz violeta com pico de emissão em 405 nm e com largura de banda de 20 nm; cada LED emite aproximadamente 300 mW de potência óptica. O terceiro conjunto é formado por LEDs Luxeon III LXHL-PB09 (Philips Lumileds Lighting Co.) que emitem luz azul com pico de emissão em 470 nm e com largura de banda de 20 nm; assim como no conjunto anterior, cada LED emite cerca de 300 mW de potência óptica. Apesar da emissão em banda relativamente larga, isso é suficiente para as aplicações de interesse no presente estudo. Por serem de alta potência, um aspecto crucial nestes LEDs é a dissipação de calor; por esta razão eles foram colados em suporte metálico que serve também como dissipador térmico. Este conjunto está acoplado à lente objetiva, permitindo uma iluminação uniforme em uma área circular de raio de ≈ 8 cm. Com esse sistema pode-se iluminar a amostra com luz branca, luz violeta ou com luz azul. A luz branca é utilizada para estudos da refletância das amostras, enquanto as duas últimas são utilizadas, principalmente, na formação de imagens da fluorescência emitida por tecidos biológicos.

O scanner para varredura da amostra é composto por estruturas metálicas de alumínio, uma placa de acrílico, um motor de passo e seu *drive*, rolamentos e uma fonte elétrica. A placa de acrílico foi escolhida para permitir a trans-iluminação. O conjunto realiza um deslocamento de 25 μm por passo do motor na direção de varredura, controlado pelo computador através de uma porta paralela. Dependendo de ΔL o computador ajusta o número de passos do motor para que uma imagem contínua de toda amostra seja obtida.

Finalizando, todos os componentes estão presos em uma estrutura metálica de alumínio que permite uma estabilidade mecânica para a realização das imagens. Na Figura 2a é mostrado um esquema do sistema e na Figura 2b uma foto do sistema montado.

Calibração do sistema – O desempenho do sistema de imagem, como já mencionado, depende de vários parâmetros, por sua vez dependentes de características intrínsecas do sistema de lentes, do espectrômetro e da câmara CCD. Isso leva à necessidade de conhecer as especificações espaciais e espectrais do sistema para a formação da imagem hiperespectral, ou seja, a sua calibração. Esta calibração se subdivide em duas, uma espacial e outra espectral.

A calibração espacial foi realizada medindo a largura da imagem e o campo de visão do SIH em função da distância entre o sistema de lentes e a amostra experimental. O resultado da calibração espacial é apresentado nas Figuras 3a e 3b, e como se pode observar, ambos os parâmetros apresentam um comportamento linear.

Outro parâmetro necessário para a análise das imagens capturadas pelo SIH é a resolução espacial da imagem. Este dado informa ao usuário o tamanho do grão detectado por cada pixel da imagem e pode ser calculado pela razão entre o campo de visão (ΔC) da imagem e o número de pixels da imagem na dimensão equivalente ao campo de visão. Como esse parâmetro depende da dimensão física da câmara CCD e das características do espectrômetro, a resolução espacial é exclusiva dessa montagem desenvolvida. A Figura 4 mostra o comportamento linear da resolução espacial do SIH em função da distância entre o sistema de lentes e a amostra experimental. Esse

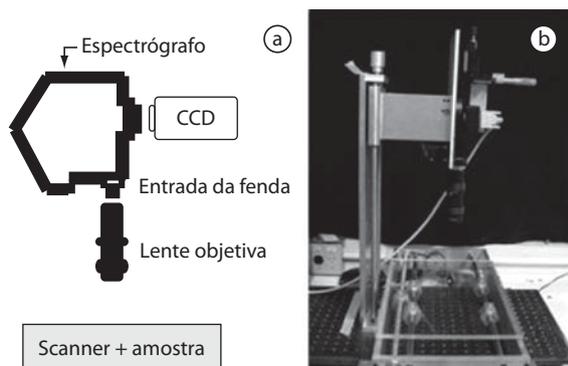


Figura 2. a) Esquema do SIH mostrando as partes que compõem o sistema e a localização de cada parte. b) Foto do sistema pronto para uso. **Figure 2.** a) Schematic of HIS showing the system's components and where each one of the components was placed. b) Digital image of HIS ready to use.

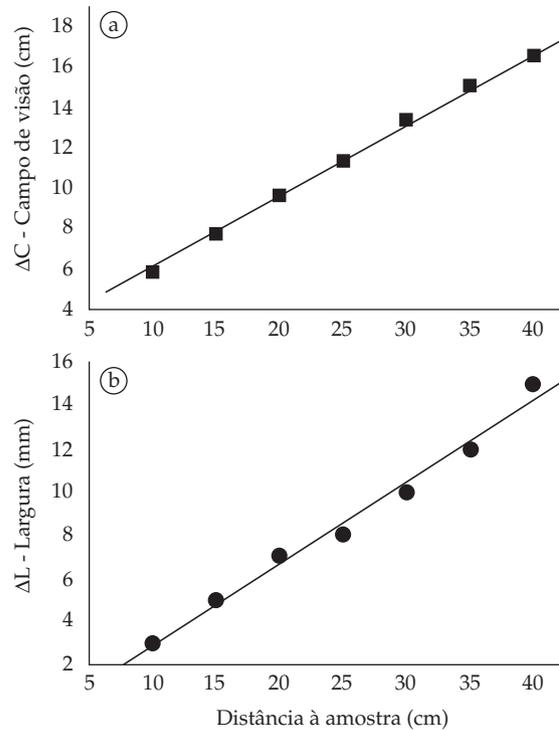


Figura 3. Calibração espacial do SIH. a) Variação do campo de visão do sistema (ΔC) em função da distância entre o sistema de lentes e a amostra. b) Variação da largura (ΔL) em função da distância entre o sistema de lentes e a amostra. Ambos apresentam um comportamento linear. **Figure 3.** Spatial calibration of HIS. a) Variation of the field of view of HIS (ΔC) as a function of the distance between lens and sample. b) Variation of the width (ΔL) as a function of the distance between lens and sample. Both present a linear behavior.

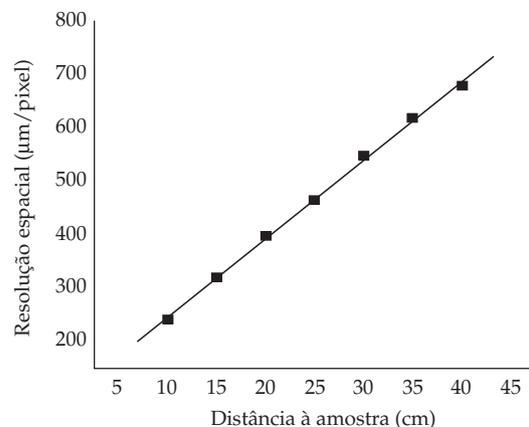


Figura 4. Resolução espacial do SIH para a montagem desenvolvida em função da distância entre o sistema de lentes e a amostra. Relação linear já esperada devido ao comportamento do parâmetro ΔC . **Figure 4.** Spatial resolution of HIS for the present setup as function as the distance between lens and sample. The linear behavior was expected because the behavior of ΔC parameter.

comportamento linear era esperado uma vez que ΔC também varia linearmente com a distância entre o SIH e a amostra.

Na calibração espectral mediu-se a posição de um comprimento de onda na primeira ordem em relação à ordem zero de difração (ΔP) em termos de pixels da câmara CCD. O resultado da curva de calibração espectral é apresentado na Figura 5 e mostra a relação linear entre ΔP e os comprimentos de onda da 1ª ordem. Para obter esse resultado foram utilizados quatro sistemas Laser: um Laser de gás de He-Cd emitindo em 442 nm, um Laser de estado sólido de Nd:YAG³ dobrado emitindo em 532 nm e dois Laser de diodo emitindo em 660 nm e 780 nm.

Composição da imagem espectral

Após coletar imagens hiperespectrais da amostra inteira, o passo seguinte é a composição das imagens espectrais em diferentes comprimentos de onda. Esta tarefa é puramente computacional e para isso foi desenvolvida uma rotina computacional em MATLAB® (The MathWorks, Natick, EUA). A rotina utiliza os parâmetros da calibração espacial e espectral do SIH para compor as imagens, porém permite a livre escolha do comprimento de onda de interesse.

A tarefa da rotina computacional é organizar as imagens hiperespectrais em sequência, selecionar a ROI referente a um comprimento de onda previamente escolhido em cada imagem hiperespectral e construir uma imagem espectral concatenando as regiões selecionadas.

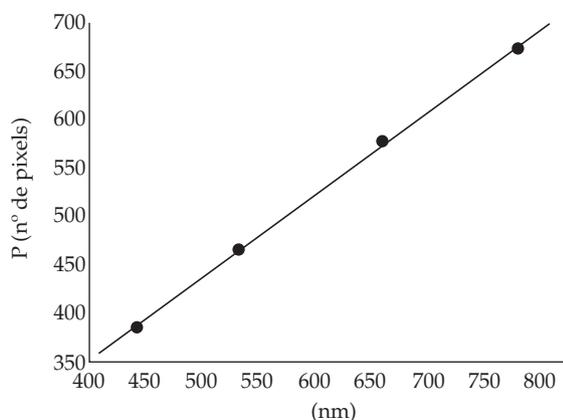


Figura 5. Gráfico da calibração espectral do SIH mostrando a relação linear entre o parâmetro ΔP e os comprimentos de onda da primeira ordem de difração de uma imagem hiperespectral. **Figure 5.** Graph of the spectral calibration of HIS. It shows the linear dependence of ΔP parameter and the wavelengths of the first order of diffraction on a hyperspectral image.

Uma dificuldade encontrada na concatenação da ROI é o efeito das bordas da fenda na formação das imagens; devido ao perfil da fenda, as variações de intensidades detectadas nas regiões mais próximas da borda da ROI não dependem unicamente das características da amostra. Para resolver esse problema, apenas a região central da ROI foi selecionada para a concatenação; conseqüentemente, o passo do *scanner* teve de ser reduzido pela metade para que a imagem espectral formada seja espacialmente semelhante à da amostra.

Aplicações do SIH

São apresentadas duas aplicações da técnica de imagens hiperespectrais em sistemas biológicos, uma para agricultura e outra odontologia, com o objetivo de ilustrar a habilidade do sistema proposto em prover imagens com resolução espectral e espacial, sem investigar em detalhes as causas biológicas ou o procedimento de diagnóstico responsável por tais observações. Por isso, em ambas as aplicações foram analisadas imagens digitais dos sintomas visuais observados nas amostras além das imagens espectrais da fluorescência emitida pelas amostras em comprimentos de onda específicos.

O primeiro exemplo envolve imagens de fluorescência de folhas de laranjeiras com sintomas de cancro cítrico. O principal componente da fluorescência de folhas é a clorofila *a*, que apresenta picos de emissão em 690 e 740 nm, e está relacionada com a eficiência fotossintética da folha (Cerovic *et al.*, 1999). As imagens foram obtidas com uma iluminação de aproximadamente 20 mW/cm² em 470 nm e com um tempo de exposição de 20 s. A Figura 6a mostra uma imagem digital obtida com luz branca de uma folha típica com cancro (as lesões estão evidenciadas nos círculos). Nas Figuras 6b e 6c são mostradas as imagens espectrais obtidas pelo sistema em 690 e 740 nm respectivamente. Nestas imagens observa-se claramente o efeito da fenda. Devido à difração na fenda, o padrão de intensidade na câmara CCD é quase gaussiano, mesmo com a iluminação da folha sendo uniforme. Esta é uma propriedade intrínseca da difração, fazendo com que a intensidade detectada próxima das bordas seja menor que na região central da fenda. Isto leva a uma imagem em secções distintas, mas que mesmo assim se assemelha em muito à imagem obtida com luz branca. Em relação aos sintomas do cancro observa-se que a lesão quase não emite fluorescência, e acredita-se que isso deva à baixa concentração de clorofila.

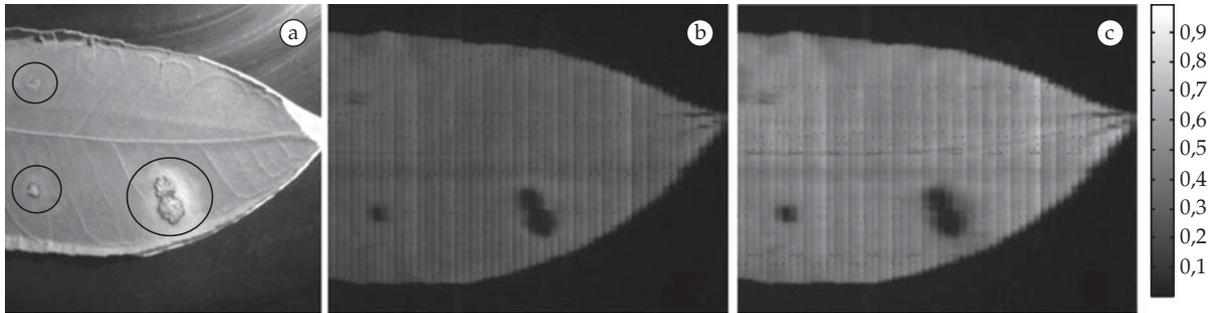


Figura 6. Imagens de cancro cítrico em folha de laranjeira obtidas pelo SHI. a) Imagem digital da folha sob iluminação por luz branca. Nesta imagem, as lesões do cancro cítrico foram destacadas por círculos. b) Imagem espectral da fluorescência emitida pela folha em 690 nm. c) Imagem espectral da fluorescência emitida pela folha em 740 nm. **Figure 6.** Images of citrus canker in orange leaves obtained by HIS. A) Digital image of the leaf under white light illumination. In this image the lesions of citrus canker are marked by circles. b) Spectral image of fluorescence emitted by leaf at 690 nm. c) Spectral image of fluorescence emitted by leaf at 740 nm.

O segundo é uma aplicação na odontologia, onde se utilizou um dente humano pré-molar superior com cáries na região da coroa e na porção da raiz, e desmineralização na raiz do dente. As imagens foram obtidas com uma iluminação de aproximadamente 20 mW/cm² em 405 nm e com um tempo de exposição de 30 s. A Figura 7a apresenta uma imagem digital do dente mostrando as lesões descritas (I-cárie na coroa, II-cárie na raiz, III-desmineralização). Nas Figuras 7b e 7c são mostradas as imagens espectrais da autofluorescência

dental em 520 nm e 612 nm respectivamente. A ausência de fluorescência nestes comprimentos de onda tem sido utilizada para comprovação do desgaste da estrutura dental original e associada aos processos de desmineralização dental ou formação das cáries (Vo-Dinh, 2003). As figuras obtidas corroboram estas observações, pois se nota uma diminuição das respectivas fluorescências nas mesmas regiões da amostra que apresentam os sintomas visuais da cárie e da desmineralização.

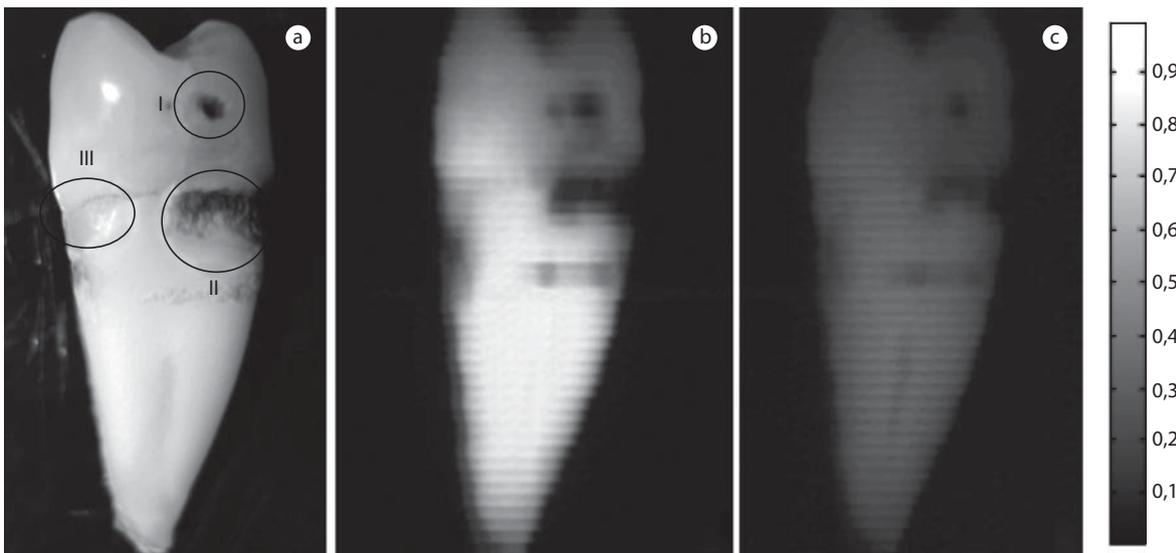


Figura 7. Imagens de cárie e desmineralização dental obtidas pelo SHI a) Imagem digital do dente sob iluminação por luz branca. Nesta imagem as cáries são destacadas (I e II) assim como a desmineralização (III). b) Imagem espectral da autofluorescência dental emitida em 520 nm. c) Imagem espectral da autofluorescência dental emitida em 612 nm. **Figure 7.** Images of dental decay and demineralization in tooth obtained by HIS. a) Digital image of the tooth under white light illumination. In this image the dental decay was marked (region I and II) as well as demineralization (region III). b) Spectral image of tooth autofluorescence emitted at 520 nm. c) Spectral image of tooth autofluorescence emitted at 612 nm.

É importante ressaltar que tanto nas imagens da folha quanto nas do dente não é possível observar a fluorescência a olho nu, visto que o sinal de refletância em 470 nm é muito maior. Contudo, o equipamento construído não só é capaz de detectar a fluorescência, mas também separar suas diferentes componentes espectrais, além de prover resolução espacial. Desta forma, o sistema está em plenas condições de ser utilizado em aplicações que requerem resolução espacial e espectral.

Conclusão

São descritos detalhes técnicos da montagem de um sistema de imagens hiperespectrais e sua calibração. Em seguida este sistema foi utilizado para obter imagens hiperespectrais em folhas contaminadas com cancro cítrico e dentes cariados. A partir dos resultados obtidos é possível concluir que o sistema é eficaz para os estudos experimentais que envolvam a análise de sinais ópticos de fluorescência e refletância das amostras biológicas. As características do SIH permitem uma análise do sinal óptico com precisão espacial e espectral e isso torna a análise das imagens hiperespectrais uma ferramenta mais rica em informação que a espectroscopia pontual, por exemplo. O uso deste sistema será intensificado em nosso laboratório nos campos de agricultura, medicina e odontologia.

Agradecimentos

Agradecemos o suporte financeiro da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e ao CNPq. Agradecemos a José Belasque Jr. do Fundecitrus-SP pelas amostras de folhas contaminadas por cancro cítrico. Agradecemos a Maristela Dutra-Corrêa da UNESP-SP, campus São José dos Campos, pelo empréstimo do dente usado como amostra.

Referências

- BARONTI, S.; CASINI, A.; LOTTI, F.; PORCINAI, S. Multispectral imaging system for the mapping of pigments in works of art by use of principal-component analysis. *Applied Optics*, v. 37, n. 8, p. 1299-1309, 1998.
- CEROVIC, Z. G.; SAMSON, G.; MORALES, F.; TREMBLAY, N.; MOYA, I. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie*, v. 19, p. 543-578, 1999.
- CHANG, C. I. *Hyperspectral Imaging: spectral detection and classification*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
- FLETCHER-HOLMES, D. W.; HARVEY, A. R. Real-time imaging with a hyperspectral fovea. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, v. 7, n. 6, p. S298-S302, 2005.
- JUDD, D. B.; MACADAM, D. L.; WYSZECKI, G. Spectral distribution of typical daylight as a function of correlated color temperature. *Journal of the Optical Society of America*, v. 54, n. 8, p. 1031-1040, 1964.
- KIM, M. S.; CHEN, Y. R.; MEHL, P. M. Hyperspectral reflectance and fluorescence imaging system for food quality and safety. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, v. 44, n. 3, p. 721-729, 2001.
- MARTIN, M. E.; WABUYELE, M.; PANJEHPOUR, M.; OVERHOLT, B.; DENOVO, R.; KENNEL, S.; CUNNINGHAM, G.; VO-DINH, T. An AOTF-based dual-modality hyperspectral imaging system (DMHSI) capable of simultaneous fluorescence and reflectance imaging. *Medical Engineering and Physics*, v. 28, n. 2, p. 149-155, 2006.
- SCHULTZ, R. A.; NIELSEN, T.; ZAVALITA, J. R.; RUCH, R.; WYATT, R.; GARNER, H. R. Hyperspectral imaging: a novel approach for microscopic analysis. *Cytometry*, v. 43, p. 239-247, 2001.
- VO-DINH, T. *Biomedical Photonics Handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2003.
- YANG, V. X. D.; MULLER, P. J.; HERMAN, P.; WILSON, B. C. A multispectral fluorescence imaging system: design and initial clinical tests in intra-operative photofrin-photodynamic therapy of brain tumors. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 32, p. 224-232, 2003.