



## Correlação entre a magnitude de janelas de transparência em tecidos e a osmolaridade do agente usado

RICARDO MIGUEL SILVA FERREIRA

Outubro de 2022



# Correlação entre a magnitude de janelas de transparência em tecidos e a osmolaridade do agente usado

**Ricardo Miguel Silva Ferreira**

Engenheiro Biomédico pelo Instituto Superior de Engenharia do Porto

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a obtenção  
de grau de Mestre em Engenharia Biomédica”

Orientador: Professor Luís Oliveira, PhD

**Outubro de 2022**



*“O mestre falhou mais vezes do que o aprendiz sequer tentou.”*

Stephen McCranie



## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço ao Professor Luís Oliveira, meu orientador, por me ter guiado ao longo deste trabalho, mostrando-se sempre disponível para esclarecer qualquer dúvida que me surgisse. Agradeço também à minha colega Rosário Pinheiro pela ajuda com as medições experimentais no laboratório, sem as quais a realização deste trabalho não seria possível. Agradeço também ao Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI) por possibilitar a realização das medições experimentais necessárias ao presente trabalho no seu laboratório.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos, sem os quais a minha jornada no ISEP não teria tanto significado. Acredito que as dificuldades que ultrapassámos juntos ao longo deste percurso nos permitiram evoluir tanto a nível pessoal como académico.

Por fim, agradeço à minha família por todo o suporte que me tem dado ao longo da vida, particularmente nos momentos menos bons e em especial aos meus avós paternos que, apesar de já não estarem cá, sempre acreditaram em mim e me incentivaram a dar o meu melhor em tudo que faço.

Para todos eles, o meu sincero obrigado.



## Resumo

A criação de efeitos de transparência em tecidos biológicos tem sido fortemente explorada nos últimos anos, com o objetivo de reduzir o espalhamento da luz, que é uma característica natural destes materiais, e descobrir novos procedimentos clínicos de diagnóstico ou de tratamento com recurso à utilização da luz. Uma descoberta recente mostrou que na zona do ultravioleta se verifica uma eficiência na criação de transparência superior à que é verificada na zona desde o visível até ao infravermelho. Dado que tal descoberta está associada à criação de janelas de transparência localizadas no ultravioleta, para comprimentos de onda entre os 200 e os 400 nm, torna-se importante caracterizar tais janelas, nomeadamente avaliar a sua magnitude em função da concentração do agente de transparência usado em solução para tratar o tecido. Escolhendo músculo esquelético de coelho e soluções aquosas com concentrações volúmicas de sacarose entre os 20 % e 60 %, realizou-se um estudo que permitiu verificar a ocorrência de duas janelas de transparência, uma centrada a 230 nm e outra centrada a 300 nm. Tais comprimentos de onda centrais das janelas de transparência observadas foram associados às bandas de absorção das ligações de aminoácidos nas proteínas, nomeadamente a fenilalanina, e tirosina e triptofano. O estudo realizado mostrou que as magnitudes destas duas janelas crescem com a concentração da sacarose na solução de acordo com uma equação polinomial de segundo grau, que é particular para cada janela. Uma análise de tais dependências mostrou que para concentrações de sacarose entre 20 % e 40 %, as ligações associadas à fenilalanina são as que são dissociadas em maior número e que para concentrações superiores, a dissociação das ligações associadas à tirosina e ao triptofano passam a dominar no tecido muscular. Embora se tenha verificado uma dependência polinomial entre as magnitudes das janelas e a concentração de sacarose na solução, a proporção entre tais magnitudes depende linearmente da concentração da sacarose, o que mostra que os dois mecanismos de dissociação estão diretamente relacionados entre si. Estes resultados são uma mais-valia para se entender o mecanismo de transparência designado por dissociação de proteínas e como tal mecanismo depende da concentração do agente de transparência na solução de tratamento.

**Palavras-chave:** tecido músculo-esquelético, sacarose, transmitância colimada, transparência ótica, janelas de transparência, eficiência de transparência, magnitude de transparência, dissociação de proteínas, ligações de aminoácidos.



## **Abstract**

The creation of transparency effects in biological tissues has been strongly explored in the recent years with the objective of reducing the native light scattering that these materials present, so that new clinical procedures that use light for diagnosis or treatment can be developed. One recent discovery in this field showed that a higher efficiency of transparency is observed in the ultraviolet range of spectrum than in the visible to infrared range. Since such discovery is associated to the creation of transparency windows in the ultraviolet, for wavelengths between 200 and 400 nm, it becomes necessary to characterize such windows, namely by relating their magnitude with the concentration of the transparency agent in the solution used to treat the tissue. By selecting the skeletal muscle from rabbit and aqueous solutions containing volume concentrations of sucrose between 20 % and 60 %, the present study allowed to confirm the creation of two transparency windows, one centered at 230 nm and the other centered at 300 nm. An association between those central wavelengths of the transparency windows with the absorption bands of the amino acid connections in proteins, the one of phenylalanine, and the one of tyrosine and tryptophan, was made. The present study showed that the magnitudes of these two windows grow with the sucrose concentration in the treating solution according to a second-degree polynomial equation, which is different for the two windows. An analysis of such dependencies showed that for sucrose concentrations in the treating solution between 20 % and 40 %, the phenylalanine connections in proteins are the ones that are dissociated in greater numbers and that for higher sucrose concentrations, the dissociation of the connections associated with the tyrosine and tryptophan connections become dominant in the muscle tissue. Although it was verified that a polynomial relation is observed between the magnitude of each of the two windows and the sucrose concentration in the treating solution, the proportion between those magnitudes depends linearly on the sucrose concentration in the treating solution. This shows that the two dissociation mechanisms are directly related. These results are valuable for the explanation of the transparency mechanism designated as protein dissociation and how such mechanism depends on the agent concentration in the treating solution.

**Key words:** muscular-skeletal tissue, sucrose, collimated transmittance, optical transparency, transparency windows, transparency efficiency, transparency magnitude, protein dissociation, amino acid connections.

# Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VII
ÍNDICE.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XV
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO .....	3
1.2. MOTIVAÇÃO .....	5
1.3. OBJETIVOS.....	6
1.4. ESTRUTURA DO DOCUMENTO .....	7
2. ESTADO DA ARTE .....	11
2.1. A CIÊNCIA DA ÓTICA MÉDICA – RETROSPETIVA HISTÓRICA .....	11
2.2. EFEITOS DE TRANSPARÊNCIA EM TECIDOS BIOLÓGICOS .....	13
2.3. MECANISMOS DE TRANSPARÊNCIA ÓTICA .....	16
2.4. AGENTES DE TRANSPARÊNCIA ÓTICA.....	21
2.5. O MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	29
3.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE SACAROSE .....	30
3.3. ESTUDOS EXPERIMENTAIS .....	32
3.4. PROCESSAMENTO DE DADOS E CÁLCULOS.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1. CARACTERÍSTICAS ÓTICAS DAS SOLUÇÕES E DO MÚSCULO .....	37
4.2. RESULTADOS MEDIDOS DURANTE OS TRATAMENTOS DE TRANSPARÊNCIA.....	40
4.3. CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE TRANSPARÊNCIA PARA OS VÁRIOS TRATAMENTOS.....	44
4.4. DEPENDÊNCIA ENTRE A AMPLITUDE DAS JANELAS E A OSMOLARIDADE DA SACAROSE EM SOLUÇÃO..	48
5. CONCLUSÃO.....	57

REFERÊNCIAS.....61

## Lista de Figuras

<b>Figura 2.1</b> - Dispersões de uma solução aquosa que contém uma concentração de 30 % de sacarose (A) [68] e da água (B) [69], ambas a 20 °C.....	23
<b>Figura 3.1</b> - Fragmento de músculo pronto a ser cortado (a) e amostra já cortada, imersa em soro fisiológico (b).....	30
<b>Figura 3.2</b> - Valores de IR para soluções aquosas de sacarose (a 589,6 nm e 20 °C), com concentrações entre 20 % e 60 % e a curva de ajuste descrita pela equação 3.1.....	31
<b>Figura 3.3</b> – Montagem experimental para medir os espectros de $T_c$ das amostras.....	32
<b>Figura 4.1</b> – Espectro de $T_c$ da solução aquosa que contém 60 % de sacarose.....	38
<b>Figura 4.2</b> – Espectro médio de $T_c$ do músculo esquelético de coelho.....	39
<b>Figura 4.3</b> – Variações temporais do espectro médio de $T_c$ do músculo esquelético durante os tratamentos com soluções aquosas contendo sacarose nas concentrações de: 20 % (a), 25 % (b), 30 % (c), 35 % (d), 40 % (e), 45 % (f), 50 % (g), 55 % (h), 60 % (i). .....	41
<b>Figura 4.4</b> – Variações temporais do espectro médio de $T_c$ do músculo esquelético entre 200 e 320 nm durante os tratamentos com soluções aquosas contendo sacarose nas concentrações de: 20 % (a), 25 % (b), 30 % (c), 35 % (d), 40 % (e), 45 % (f), 50 % (g), 55 % (h), 60 % (i). .....	44
<b>Figura 4.5</b> – Variações temporais de $OC_{\text{eff}}(\lambda)$ durante os tratamentos com soluções aquosas contendo sacarose nas concentrações de: 20 % (a), 25 % (b), 30 % (c), 35 % (d), 40 % (e), 45 % (f), 50 % (g), 55 % (h), 60 % (i). .....	46
<b>Figura 4.6</b> – Variações temporais de $OC_{\text{eff}}$ ( $200 \leq \lambda \leq 420$ nm) durante os tratamentos com soluções aquosas contendo sacarose nas concentrações de: 20 % (a), 25 % (b), 30 % (c), 35 % (d), 40 % (e), 45 % (f), 50 % (g), 55 % (h), 60 % (i). .....	49
<b>Figura 4.7</b> – Valores de $OC_{\text{eff}}$ máximos registados para as duas janelas de transparência em função da concentração de sacarose em solução.....	51
<b>Figura 4.8</b> – Proporção entre os máximos de $OC_{\text{eff}}$ em função da concentração de sacarose em solução.....	53



## Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Valores dos IRs para as diferentes soluções de sacarose a utilizar ( $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\lambda=589,6\text{ nm}$ ).....	32
Tabela 4.1 – Magnitudes máximas das janelas de transparência, instantes de tempo onde ocorrem e proporção das magnitudes entre as duas janelas.....	50



## Lista de Abreviaturas

- ADN – Ácido Desoxirribonucleico
- ARN – Ácido Ribonucleico
- ATP – Adenosina Trifosfato
- CFTOOL – do inglês *Curve Fitting Tool*
- CIETI – Centro de Investigação em Engenharia e Tecnologia Industrial
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- IR – Índice de Refração
- OCA – Agente de Transparência Ótica (do inglês *Optical Clearing Agent*)
- $OC_{\text{eff}}$  – Eficiência de Transparência Ótica (do inglês *Optical Clearing Efficiency*)
- PEG – Polietilenoglicol
- PET – Tomografia por Emissão de Positrões
- PG – Propilenoglicol
- $T_c$  – Transmitância Colimada
- THz – Terahertz
- TOC – Transparência por imersão (do inglês *Tissue Optical Clearing*)
- UV – Ultravioleta

## Lista de Símbolos

- $\emptyset$  – Diâmetro
- $\lambda$  – Comprimento de onda
- $\tau$  – Tempo de difusão característico
- $D$  – Coeficiente de difusão
- $n$  – Massa molar
- $R^2$  – Coeficiente de determinação



## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO



## 1. Introdução

No âmbito da unidade curricular Tese, inserida no Mestrado em Engenharia Biomédica do Instituto Superior de Engenharia do Porto, a presente dissertação foi realizada tendo por base medições experimentais realizadas no Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI). O objetivo do presente trabalho foi analisar e caracterizar as janelas de transparência criadas na zona do ultravioleta (UV) em tecidos biológicos durante tratamentos de transparência com soluções de sacarose em diferentes osmolaridades (concentrações).

Nesta introdução será primeiramente apresentada uma contextualização sobre os tratamentos de transparência e a criação de janelas de transparência ótica em tecidos biológicos. Posteriormente serão indicadas quais as motivações para o presente trabalho, assim como os objetivos que se pretenderam atingir.

### 1.1.Contextualização

A criação de transparência em tecidos biológicos consiste num fenómeno com um longo historial, mas que só em finais do século XX passou a merecer um interesse pela comunidade científica, com o objetivo de melhorar e desenvolver técnicas óticas para aplicação em medicina [1]. Os tecidos biológicos apresentam na sua forma natural um forte espalhamento da luz devido à presença de grandes quantidades de água nos seus líquidos intersticiais e no citoplasma das células [2]. A água apresenta um índice de refração (IR) baixo, quando comparada com os restantes componentes dos tecidos e das células, criando assim um desfaseamento significativo de IRs entre os fluídos e os restantes componentes biológicos no interior das células e nos interstícios dos tecidos [3]. Tal desfaseamento de IRs está na origem do forte espalhamento que um feixe de luz sofre ao propagar-se dentro de qualquer tecido biológico, e para que a utilização de luz em procedimentos de diagnóstico e de tratamento seja eficaz é necessário vencer este espalhamento por intermédio de técnicas que consigam diminuir ou eliminar o desfaseamento de IRs que é natural dos tecidos [4].

Na segunda metade do século XX, técnicas mecânicas de compressão e estiramento de tecidos e técnicas de variação de temperatura ou de branqueamento de tecidos com ácido acético foram utilizadas em vários estudos e em certas aplicações

clínicas, com o objetivo de reduzir o espalhamento da luz [1], [3]. Apesar de estas técnicas apresentarem um aumento de transparência nos tecidos estudados, a magnitude da transparência criada era reduzida e efeitos secundários indesejáveis e irreversíveis ou com longos tempos para atingir a reversibilidade foram observados. Em face destas dificuldades, a técnica de criação de transparência ótica em tecidos biológicos por imersão em agentes químicos inócuos, que foi inicialmente reportada pelo anatomista alemão *Werner Spalteholz* em 1911, passou a merecer um novo e crescente interesse na década de 1990 [1], [4].

A técnica de criação de transparência por imersão (vulgarmente conhecida em inglês por *Tissue Optical Clearing*, TOC) consiste essencialmente na substituição parcial ou total da água intersticial e intracelular por um agente inócuo, que apresenta um IR superior ao da água, mais aproximado ao IR dos restantes componentes biológicos que compõe os tecidos e as células biológicas [5]. Ao realizar-se esta substituição da água pelo agente, o IR médio do fluído intersticial ou do citoplasma aproxima-se dos IRs dos restantes componentes, levando a uma diminuição parcial (ou total) do desfaseamento de IRs dentro dos tecidos e das células, o que em última instância leva à diminuição do espalhamento da luz dentro do tecido [6], [7]. Tal redução do espalhamento da luz permite focar um feixe de forma eficiente e sem perdas significativas de intensidade a profundidades claramente superiores dentro de um tecido, relativamente àquelas que se verificam num tecido no seu estado natural. Desta forma, procedimentos de diagnóstico ou terapêuticos com utilização de luz, que num tecido natural estão limitados às camadas mais superficiais, passam a poder ser realizados a profundidades superiores dentro de tecidos espessos, ou mesmo em tecidos localizados abaixo de outros no interior do corpo humano ou animal. É importante referir que o IR de qualquer tecido ou material biológico depende da temperatura e do comprimento de onda. Isto implica que os estudos realizados para caracterizar os tratamentos de transparência em tecidos biológicos têm sido recentemente feitos não só com técnicas de imagem ótica, mas também com medições espectrais numa banda larga [4]. Considerando todo o espectro eletromagnético e em particular a zona espectral entre o UV e o terahertz (THz), onde aplicações de ótica médica têm sido recentemente desenvolvidas [8], é importante avaliar e caracterizar os tratamentos de transparência em zonas espectrais largas dentro destes limites. Dado que até há poucos anos os estudos espectrais realizados com a técnica TOC foram maioritariamente feitos na zona do espectro visível e do infravermelho, ou para comprimentos de onda discretos dentro dessas zonas do espectro, um grupo de

investigadores no Porto tem apostado em estudar os efeitos de transparência na zona do UV [8], [9] e outro grupo em Moscovo tem apostado em estudar esses efeitos na zona do THz [8], [10]. A zona do UV tem grande interesse para o estudo dos tratamentos de transparência, uma vez que as dispersões, quer da água e dos agentes de transparência, quer dos restantes componentes biológicos dos tecidos apresentam um decaimento aproximadamente exponencial com o aumento do comprimento de onda desde o UV até ao infravermelho [11]. O interesse em se estudar os tratamentos pela técnica TOC na zona do THz prende-se com o facto de ser uma zona do espectro onde a absorção da água é muito forte [12]. No caso dos estudos já realizados na zona do UV, verificou-se que ocorrem janelas de transparência nessa zona, com picos de transparência bem localizados para comprimentos de onda abaixo de 350 nm [13] e que é possível identificar e caracterizar um dos três mecanismos associados à criação de transparência nos tecidos – o mecanismo de dissociação de proteínas [9]. Em face destes resultados inovadores, é de especial interesse realizar outros estudos dos tratamentos de transparência, focados na zona espectral do UV, para que novas aplicações clínicas que utilizem luz nestes comprimentos de onda possam vir a ser desenvolvidas.

## **1.2.Motivação**

Tal como foi acima referido, os tratamentos de transparência aplicados com a técnica TOC em tecidos biológicos foram ainda pouco explorados na zona do UV, sendo necessária a realização de novos estudos para compreender como estes tratamentos reduzem o espalhamento da luz nessa zona do espectro e que benefícios se podem recolher desses estudos para a criação de novas aplicações clínicas. Sabe-se que os vários tecidos biológicos que fazem parte do corpo humano apresentam um conjunto de bandas de absorção na zona do UV, bandas estas que correspondem à hemoglobina, às proteínas, ao ADN e a outros componentes biológicos que fazem parte da constituição dos tecidos [14]. A existência destas fortes bandas de absorção na zona do UV dificulta a deteção das alterações induzidas durante a criação dos tratamentos de transparência, mas a estratégia adotada pelos autores das recentes publicações relativas ao estudo da transparência criada em tecidos nesta zona do espectro [9], [13], [15], que consiste em calcular variações temporais relativas dos espectros medidos, parece permitir identificar eficazmente as variações induzidas no UV e retirar informação fisiológica discriminatória de patologias.

Se no artigo da Ref. [9] foi demonstrado que a glicerina é capaz de dissociar proteínas em tecidos e que tal dissociação ocorre de forma diferenciada entre tecidos saudáveis e tecidos com patologias oncológicas, será necessário realizar novos estudos, no sentido de relacionar as taxas de dissociação das proteínas com o estado de desenvolvimento do cancro e para diferentes tipos de cancro. Tal relação poderá eventualmente ser aplicada a medições não invasivas para a deteção precoce do cancro sem recurso a biópsias. Tal trabalho de investigação é complexo e requer a disponibilidade de tecidos relativos às diferentes fases de desenvolvimento do cancro, o que nem sempre é fácil de se conseguir. Tal estudo cai, portanto, fora dos objetivos do presente trabalho.

Em oposição às dificuldades associadas ao estudo da relação entre a taxa de dissociação de proteínas e os diferentes estados de desenvolvimento do cancro em tecidos, a investigação apresentada na Ref. [13] pode ser facilmente sujeita a novos estudos exploratórios para obter informação adicional. Neste artigo, os autores mostraram com dados experimentais de um estudo preliminar que tratando tecido muscular com soluções de glicerina em diferentes osmolaridades conseguiam identificar a criação de janelas de transparência no UV e que a magnitude dessas janelas aumentava com a osmolaridade da glicerina na solução usada para criar transparência. Embora tal artigo apresente a criação de tais janelas com apenas um estudo por solução (tendo apenas usado três soluções com osmolaridades distintas) torna-se necessário realizar novos estudos para fundamentar os resultados publicados e adquirir informação adicional. Por outro lado, realizando tal estudo com um maior número de soluções, em que se consideram mais osmolaridades do agente de transparência, permitirá correlacionar a magnitude das janelas de transparência criadas com a osmolaridade do agente. A utilização de um outro agente de transparência poderá trazer informação complementar aos resultados obtidos com a glicerina que se encontram publicados [13].

### **1.3.Objetivos**

Em face do que foi exposto na secção anterior, os objetivos do presente trabalho consistiram em estudar a magnitude das janelas de transparência criadas na zona do UV em tecido muscular por intermédio de tratamentos de transparência, em que os tecidos são imersos em soluções aquosas de sacarose com diferentes osmolaridades. Pretende-se também estabelecer uma relação entre a magnitude das janelas criadas e a osmolaridade

de sacarose usada nos tratamentos, assim como verificar se este açúcar é capaz de dissociar proteínas.

#### **1.4.Estrutura do documento**

O presente documento é composto por cinco capítulos. No Capítulo 1 é elaborada uma introdução aos principais temas abordados neste documento, apresentando uma contextualização do assunto em estudo, a motivação e os objetivos do presente trabalho. No Capítulo 2 será feita a descrição do estado da arte sobre a aplicação das tecnologias óticas em medicina e da criação de efeitos de transparência em tecidos biológicos, assim como da criação de janelas de transparência na zona do UV durante tais tratamentos. O Capítulo 3 descreve os materiais, métodos e cálculos necessários à realização deste estudo, enquanto o Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos, e as informações que se podem inferir dos mesmos. Por sua vez, o Capítulo 5 encerra o documento com as conclusões referentes ao trabalho realizado, referindo as possíveis perspectivas futuras para investigações que possam ter como base o presente estudo.



## CAPÍTULO 2 – ESTADO DA ARTE



## 2. Estado da Arte

### 2.1.A ciência da ótica médica – retrospectiva histórica

A utilização da luz para efeitos curativos (fototerapia) é um dos ramos primordiais da ótica médica, baseando-se na aplicação da luz solar para o tratamento de diversas doenças, e sabe-se que é praticada desde o ano 2000 antes de Cristo, suspeitando-se até que desde datas muito anteriores, pelas civilizações antigas do Egito, da Grécia, da China e da Índia. Estes povos antigos atribuíam à luz solar a cura de doenças do corpo, da mente e da alma. Apesar de não compreenderem a ciência por detrás dos fenómenos terapêuticos da luz, estes povos construíram templos dedicados à adoração do poder curativo da luz [16], [17], passando este a ser confundido com mitos, com religião ou com o sobrenatural. A utilização da fototerapia manteve-se ao longo de diversos séculos, chegando até aos dias de hoje, sendo já atualmente explicada com fundamentos científicos.

Apesar de o ramo terapêutico da ótica médica existir desde há vários séculos, o ramo de diagnóstico manteve-se praticamente inexistente até ao século XVII, altura em que dois holandeses, *Hans* e *Zacharia Janssen* inventaram o primeiro microscópio ótico. A criação deste equipamento, permitiu que fosse de imediato aplicado para inspecionar a pele, o ouvido e o olho humano, com o objetivo de detetar infeções. Desde então, o microscópio sofreu melhorias sistemáticas, tornando-se uma ferramenta indispensável para as ciências médicas, assim como para o estudo de cortes histológicos de tecidos humanos e animais [18]. Quanto a outros dispositivos óticos de diagnóstico, estes só começaram a ser fortemente desenvolvidos nos finais do século XX, após a introdução dos lasers e das fibras óticas em aplicações na área da saúde, altura em que surgiu uma nova ciência designada por ótica médica [19]. O laser tinha sido inicialmente previsto teoricamente em 1917 por *Albert Einstein*, mas apenas foi criado em 1960 por *Theodore Maiman* nos *Hughes Research Laboratories*, nos Estados Unidos da América [20]. As fibras óticas foram criadas pouco tempo depois, o que levou ao desenvolvimento subsequente de outros equipamentos óticos com potencial aplicação em medicina, como o espectrofotómetro ou versões melhoradas de microscópios e de refratómetros. Em 1991, surge um grande avanço para a ótica médica, com a invenção da técnica de tomografia ótica coerente pelo grupo de *James Fujimoto*, no *Massachusetts Institute of Technology* (MIT), nos Estados Unidos da América [21].

Foi também durante o século XX que surgiram os equipamentos de imagem médica mais comuns e que são utilizados atualmente de forma generalizada para realizar diagnóstico. Estes equipamentos permitem o diagnóstico de patologias por imagem, sendo as técnicas usadas baseadas em Raios-X, como no caso das microrradiografias [22], em campos magnéticos, como é o caso da ressonância magnética [23], em emissão de positrões, como é o caso da tomografia por emissão de positrões (PET) [24], ou nos ultrassons, que são utilizados nas ecografias [25]. Devido aos custos elevados na aquisição destes equipamentos e à utilização de radiação ionizante na sua grande maioria [26], [27], que danifica os tecidos saudáveis circundantes à zona alvo do diagnóstico, torna-se necessário procurar alternativas.

A aplicação de luz em procedimentos de diagnóstico, ou mesmo de tratamento, é uma alternativa viável para superar as desvantagens da aplicação de equipamentos que utilizam radiação ionizante. A luz visível é um tipo de radiação eletromagnética que não cria ionização das células, sendo assim melhor para interagir com os tecidos biológicos. Por outro lado, o desenvolvimento de equipamentos óticos para aplicação clínica fornece outras vantagens, que até recentemente eram inexistentes. São disso exemplo a criação de equipamentos mais compactos e portáteis, que podem facilmente ser transportados de um local para outro, a possibilidade de realizar diagnóstico por endoscopia e custos mais reduzidos na aquisição destes equipamentos, dado o estado de desenvolvimento tecnológico atual [20]. Para além destas vantagens, a aplicação de tecnologias óticas permite a criação de sensores miniaturizados de uso prático, do género de um *smartwatch*, para medir o conteúdo de glucose no sangue, o fluxo de sangue em veias entupidadas ou monitorizar outros parâmetros vitais e fisiológicos. O desenvolvimento de sensores compactos que podem ser fixos no corpo para monitorizar estes parâmetros é uma das áreas da ótica médica em forte crescimento neste momento.

Desde que se implementou no início da década de 1980, a investigação em ótica médica tem produzido resultados a um ritmo crescente de ano para ano, com a maioria das inovações a focar-se na interação da luz com os materiais biológicos e no desenvolvendo novas técnicas com aplicação clínica sem uso de radiação ionizante. Com este paradigma em mente, surgiram novas técnicas de imagem médica de aplicação *in vivo*, nomeadamente a microscopia de *light-sheet* [28], a microscopia de 2 e mais fotões [29], a microscopia confocal [30], a microscopia Raman [31], a já referida tomografia ótica coerente [32], que entretanto tem sofrido melhoramentos sucessivos, a microscopia de THz [33], a microscopia fotoacústica [34] e a microscopia de segundo harmónico [35].

Comparativamente aos equipamentos e técnicas que utilizam radiação ionizante, as técnicas de ótica médica podem ser usadas para monitorização de parâmetros vitais de forma contínua, não danificam os tecidos onde atuam ou os que os circundam, utilizam equipamentos mais baratos e compactos, tornando fácil o seu transporte [26]. Apesar de todas estas vantagens e benefícios na aplicação de técnicas óticas em medicina, existem limitações e a mais significativa tem a ver com a baixa profundidade de penetração da luz nos tecidos, devido ao forte espalhamento que é característico da maioria dos materiais biológicos [3]. Para superar esta dificuldade surgiu o conceito de criar transparência nos tecidos biológicos, um assunto que será detalhado em retrospectiva na secção seguinte.

## 2.2.Efeitos de transparência em tecidos biológicos

A criação de efeitos de transparência em tecidos biológicos começou há vários séculos. Sabe-se que os antigos povos do norte da Europa criavam transparência em peles de animais através da desidratação por secagem para construir as paredes das suas tendas, assim como em intestinos de foca para criar as janelas dessas tendas e deixar entrar a luz para o interior [1]. Este processo foi desenvolvido por esses povos de forma intuitiva, tendo a primeira evidência física do fenómeno sido apenas reportada em 1911 pelo anatomista alemão *Werner Spalteholz* [36]. *Spalteholz* verificou que imergindo sequencialmente amostras de músculo em álcool, em xileno ou óleo de cravo e finalmente em bálsamo do Canadá, tornava essas amostras mais transparentes. Intrigado com este resultado, *Spalteholz*, conduziu novos estudos, tendo deduzido que ocorre uma adaptação de IRs no interior dos tecidos que leva à criação da transparência, tal como descrito na sua publicação de 1914 [37]. Esta dedução de *Spalteholz* consistia na descoberta daquilo que sabemos hoje ser um dos três mecanismos associados à criação da transparência nos tecidos biológicos – a adaptação de IRs entre os fluídos e os restantes componentes biológicos [4]. A descoberta do mecanismo de desidratação dos tecidos foi conseguida mais tarde e a primeira publicação que lhe faz referência surgiu em 1939 [38]. Quanto ao terceiro mecanismo associado aos efeitos de transparência, designado por dissociação de proteínas, este permaneceu sem ser descoberto até 2003, tendo sido reportado nesse ano pelo grupo que o detetou através da utilização de imagiologia de segundo harmónico [39]. Tal como descrito por estes autores, o mecanismo de dissociação de proteínas é reversível, assim como os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs [4]. A reversibilidade desses dois mecanismos tinha sido anteriormente demonstrada por *Valery Tuchin* em

1999 quando estudou a variação temporal da intensidade de um sinal de *speckle* a 633 nm num tecido ocular tratado sequencialmente com uma solução de Trazograph<sup>TM</sup>, com soro fisiológico e novamente com a solução de Trazograph<sup>TM</sup> [40]. Um artigo da nossa autoria, publicado já no presente ano, demonstra que tal reversibilidade é observada numa banda espectral bastante larga, entre os 220 e os 1000 nm [41]. Uma descrição detalhada sobre a sequência de ocorrência dos três mecanismos e da contribuição de cada um para a criação de transparência nos tecidos será feita na secção 2.3.

A descoberta de *Spalteholz* no início do século XX não despertou qualquer interesse de aplicação nessa altura, tendo ficado apenas como uma curiosidade devido à falta de técnicas óticas que pudessem beneficiar da criação de transparência em tecidos biológicos. Apenas no final da década de 1980, quando algumas aplicações das tecnologias óticas em medicina já se encontravam desenvolvidas e em face da identificação de que os tecidos biológicos apresentavam um forte espalhamento da luz, é que a criação de transparência despertou um novo interesse [1]. Novos estudos começaram a ser feitos nessa altura e em 1997, o grupo de *Valery Tuchin* publicou um artigo de referência, onde se descreve todo o formalismo matemático sobre a difusão de agentes de transparência em tecidos biológicos e como a propagação da luz se altera nesses meios com a redução do espalhamento [42]. Desde essa altura, diferentes grupos, localizados nos vários continentes, passaram a desenvolver investigação nesta área, sendo o número de publicações anuais sobre a criação de transparência sempre crescente desde então.

A criação de efeitos de transparência em tecidos biológicos é um ramo da ótica médica em forte crescimento desde o início do presente milénio, tendo a investigação associada produzido resultados de forma galopante. Como a difusão da água intersticial para o exterior dos tecidos e a difusão dos agentes de transparência para o interior são processos dinâmicos, medições feitas ao longo do tempo durante tratamentos de transparência permitiram já determinar os tempos e os coeficientes de difusão característicos destes fluídos em vários tecidos [43], avaliar o conteúdo de água móvel dentro de tecidos biológicos [44], e através deste parâmetro discriminar entre tecidos saudáveis e tecidos com patologia (nos casos do cancro e da diabetes) [45-47]. Como veremos na próxima secção, a determinação experimental dos tempos e coeficientes de difusão da água e dos agentes de transparência num determinado tecido biológico permite caracterizar os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs para o tratamento aplicado [4]. Dado que tal caracterização é particular para cada combinação de agente de

transparência (do inglês, *Optical Clearing Agent* – OCA) com um determinado tecido biológico, vários estudos baseados em medições de variação temporal de espectros foram realizados para determinar os tempos e coeficientes de difusão de vários agentes em diferentes tecidos. Tais parâmetros que foram obtidos experimentalmente, embora fora do âmbito do presente trabalho, podem ser encontrados em alguns artigos e livros de referência [1], [4], [43], [48].

Se a avaliação dos parâmetros que caracterizam os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs é facilmente conseguida de forma experimental, a caracterização do mecanismo de dissociação de proteínas não é tão fácil. A detecção e caracterização deste mecanismo de criação de transparência é mais complexa, até porque nem sempre ocorre. Para que este terceiro mecanismo de criação de transparência ocorra durante o tratamento de um determinado tecido com um OCA é necessário que se conjuguem vários fatores. Em primeiro lugar, o tecido tem de conter proteínas em número suficiente, para que por interação do agente de transparência com as proteínas estas se dissociem. Apesar de a maioria dos tecidos biológicos conter proteínas, existem alguns em que esse conteúdo é pequeno ou mesmo nulo. O tecido adiposo, por exemplo, tem um conteúdo de proteínas muito reduzido, ou mesmo nulo na maioria das vezes. O tecido músculo-esquelético, por outro lado, apresenta um elevado conteúdo de proteínas, conforme veremos na secção 2.5. Para além de ser preferencial trabalhar com um tecido que tenha um grande conteúdo de proteínas para detetar e caracterizar o terceiro mecanismo de transparência, é também necessário que o agente de transparência utilizado seja capaz de dissociar essas proteínas [9]. Até ao presente, sabe-se que tanto açúcares como álcoois são capazes de dissociar proteínas e que a magnitude dessa dissociação aumenta com a osmolaridade do açúcar ou do álcool na solução usada no tratamento aplicado [49], [50]. Uma outra dificuldade na detecção da dissociação de proteínas em tecidos biológicos prende-se com as técnicas de medição que permitem fazer tal detecção. Embora este mecanismo e a sua reversibilidade tenham sido inicialmente identificados por intermédio de imagens de segundo harmónico [39], foram publicados recentemente estudos, em que tal detecção foi feita por medições experimentais de espectroscopia de UV [4], [9]. Embora a espectroscopia de UV em tecidos esteja ainda a ser explorada, ela torna-se necessária para detetar a dissociação de proteínas, uma vez que estas apresentam as suas bandas de absorção entre os 200 e os 300 nm [51], [52]. As proteínas estão ligadas entre si através das chamadas ligações de aminoácidos aromáticos, que essencialmente são três: a fenilalanina, a tirosina e o triptofano [51], [52]. De acordo com os espectros publicados nestas duas referências, a

fenilalanina apresenta uma banda de absorção de magnitude mais elevada, centrada perto dos 215 nm, e uma outra de magnitude mais reduzida, que se encontra centrada aproximadamente nos 280 nm. A tirosina e o triptofano, apresentam espectros de absorção quase coincidentes e de magnitude superior ao da fenilalanina, sendo que a banda de maior magnitude se encontra centrada nos 230 nm e a de menor magnitude se encontra centrada nos 280 nm. Em face dos espectros de absorção das ligações aromáticas das proteínas é necessário utilizar espectroscopia de UV para que se consiga detetar e caracterizar a dissociação das proteínas. A ocorrência da dissociação de proteínas leva à diminuição da absorção da luz pelos tecidos entre os 200 e os 300 nm. Por outro lado, a forte adaptação de IRs nessa mesma zona do espectro leva a uma forte redução do espalhamento. Consequentemente, a combinação destes dois mecanismos está na origem da criação de janelas de transparência na zona do UV, conforme mostrado pelos autores da Ref. [13].

Para além de todos os progressos e resultados acima descritos, a aplicação da técnica TOC permitiu já outros benefícios, como o melhoramento da profundidade de penetração de feixes sensores de luz em tecidos biológicos, o melhoramento do contraste de imagens de tomografia ótica coerente ou de microscopia nas suas diferentes vertentes e também obter informação fisiológica que permite a discriminação de patologias. Tais avanços, que foram conseguidos tanto em tecidos *ex vivo* como em tecidos *in vivo*, não fazem parte dos objetivos do presente trabalho, mas encontram-se disponíveis para consulta num livro recente [4].

Uma vez que se pretende no presente trabalho estudar e caracterizar as janelas de transparência criadas na zona do UV por soluções aquosas com diferentes osmolaridades de um determinado OCA e como já vimos que tais janelas resultam particularmente da combinação dos mecanismos de adaptação de IRs e de dissociação de proteínas, na próxima secção será descrito como se podem detetar e caracterizar experimentalmente tais mecanismos.

### **2.3.Mecanismos de transparência ótica**

Para podermos descrever de forma simples a ocorrência dos três mecanismos que levam à criação da transparência nos tecidos biológicos quando a técnica TOC é usada, vamos considerar uma situação ideal, em que se mergulha uma amostra de tecido numa solução que contém o OCA. Esta descrição aqui apresentada foi já explicada em várias

publicações, como por exemplo na Ref. [1]. Desta forma, vamos considerar uma amostra de um determinado tecido que contém proteínas, e que foi preparada em forma de fatia aproximadamente circular e com uma espessura bem definida e de dimensão pequena quando comparada com a área das suas faces laterais. Um exemplo habitualmente usado, consiste numa amostra com espessura uniforme de 0,5 mm e diâmetro de ~1 cm. A solução usada para criar a transparência consiste numa solução aquosa, que contém um determinado OCA, como por exemplo a glicerina, numa determinada concentração. A preparação deste tipo de soluções é feita misturando água destilada com o OCA, ou diluindo este na água destilada, caso se encontre em estado sólido. A mistura, ou diluição vai sendo feita, até se atingir a concentração de OCA pretendida. Tal feito é conseguido controlando o IR da solução, pois existem valores tabelados, ou forma de os calcular, para as diferentes concentrações de vários OCAs em solução aquosa [1].

Quando a solução estiver preparada com a concentração de OCA pretendida, dá-se início ao tratamento. Tal é feito mergulhando a amostra de tecido na solução, que se encontra dentro de uma montagem experimental apta para medir a transmitância colimada ( $T_c$ ) da amostra segundo a direção da espessura desta. O volume da solução deve ser da ordem de dez vezes superior ao volume da amostra, para garantir a difusão de água para o exterior e/ou a difusão do OCA para o interior durante a imersão. Espectros de  $T_c$  da amostra são medidos ao longo do tempo para se poderem detetar as variações criadas pelo tratamento. Assim que a amostra é mergulhada na solução, a pressão osmótica do OCA na solução sobre a amostra, induz o fluxo de água intersticial para o exterior. Assim, o mecanismo de desidratação ocorre logo no início do tratamento e consiste num fluxo da água móvel do tecido para o exterior através das faces da amostra, fluxo esse que fica sempre contido nos primeiros 2 a 3 minutos do tratamento. Deve notar-se que os tecidos biológicos contêm quatro estados de água no seu interior, cujas designações tem origem na força de ligação existente em cada estado entre a água e os restantes componentes biológicos do tecido [1], [4]. Os quatro estados de ligação conhecidos são designados por: água livre, água fracamente ligada, água firmemente ligada e água fortemente ligada [53], [54]. A água móvel que flui para o exterior dos tecidos, devido à estimulação criada pela pressão osmótica do OCA na solução de tratamento, consiste na combinação da água livre e da água fracamente ligada [4]. Os restantes dois estados de água tomam neste contexto a designação de água ligada, pois apresentam uma força de ligação superior aos restantes componentes biológicos do tecido, mantendo a sua hidratação e não participam no processo de desidratação do tecido [1]. Se a concentração do OCA for significativamente

elevada, tomando valores na ordem de 60 % do volume total da solução, ou superiores, não ocorre qualquer difusão das moléculas do agente para o interior do tecido, pelo menos nos primeiros 10 min de tratamento [48]. Considerando os espectros medidos durante um tratamento destes, e em particular a variação temporal de  $T_c$  para comprimentos de onda discretos dentro de uma zona espectral onde não ocorrem bandas de absorção do tecido, verifica-se um comportamento exponencial crescente nos primeiros minutos, que é semelhante ao descrito pela equação de carga de um condensador [1], [4], [48]. Processando tais variações temporais de forma a que variem entre 0 e 1, podem ajustar-se os dados experimentais processados com uma curva como a descrita pela equação 2.1 [48]:

$$T_c(\lambda_i, t) \cong 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (\text{Eq. 2.1})$$

em que  $\lambda_i$  representa o comprimento de onda discreto a que respeitam os dados da variação de  $T_c$  considerados e  $t$  representa o tempo de tratamento dentro do intervalo onde ocorre o crescimento exponencial. Ao fazer-se o ajuste dos dados com uma curva deste tipo, o tempo de difusão característico,  $\tau$ , do tratamento aplicado é obtido. Como apenas ocorreu a difusão de água para o exterior, esse tempo é o tempo de difusão característico para a água no tecido em estudo.

Para estimar este valor de  $\tau$  com maior precisão, repete-se o procedimento de ajuste para dados obtidos nos restantes comprimentos de onda considerados, permitindo assim obter a média e o desvio padrão para este parâmetro. Após este cálculo e se estiveram disponíveis medições da espessura de uma amostra tratada com a mesma solução, pode calcular-se o coeficiente de difusão da água ( $D_{H_2O}$ ) [48]. Na realidade, é conveniente realizar medições de espessura em várias amostras durante o tratamento com a solução correspondente, para se obter uma variação temporal de espessura média e minimizar erros experimentais [48]. Retirando dessa variação temporal média de espessura, o valor que corresponde ao instante de tempo de tratamento que coincide com  $\tau$ ,  $d(\tau)$ , calcula-se  $D_{H_2O}$  segundo a equação 2.2 [48]:

$$D_{H_2O} = \frac{[d(\tau)]^2}{\pi^2 \times \tau}. \quad (\text{Eq. 2.2})$$

O procedimento acima descrito para obter os parâmetros característicos do mecanismo de desidratação, é também adotado para obter os parâmetros análogos que

caracterizam o mecanismo de adaptação de IRs. No entanto, para que tal procedimento possa ser adotado corretamente, o processamento de dados e cálculos tem de ser feito com dados experimentais obtidos de um outro tratamento onde ocorre apenas a difusão do OCA para o interior do tecido. Tal tratamento é possível quando o conteúdo volúmico de água na solução usada para realizar o tratamento iguala o conteúdo de água móvel no tecido em tratamento [48]. Após a realização de variados estudos deste tipo, sabe-se atualmente que o conteúdo de água móvel nos tecidos saudáveis é de  $60 \pm 1 \%$  e nos tecidos com cancro, pelo menos nos estudados até agora, é de  $65 \pm 1 \%$  [43]. Assim, e para um tecido saudável que seja tratado com uma solução que contém 60 % de água e 40 % de OCA, consegue-se o fluxo único do OCA para o interior do tecido, devido ao equilíbrio entre a água móvel no tecido e a água na solução [1], [4], [48]. Realizando tratamentos com soluções contendo várias concentrações do OCA, consegue-se aumentar a precisão na estimação dos valores de  $\tau$  e de  $D$  para a água e para o OCA, como descrito na Ref. [43]. Com a obtenção destes 4 parâmetros ficam caracterizados não só os fluxos únicos de água para o exterior e do OCA para o interior do tecido, como os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs.

Conforme foi já referido anteriormente, a caracterização do mecanismo de dissociação de proteínas depende de vários fatores. Para que essa caracterização seja possível, pode usar-se também a espectroscopia, mas focando a análise e o processamento dos dados na zona do UV, entre os 200 e os 350 nm [9], conforme será detalhado de seguida. Dado que os tecidos biológicos apresentam forte absorção e forte espalhamento para comprimentos de onda abaixo de 350 nm, a avaliação direta da evolução temporal do espectro de  $T_c$  não mostra com detalhe suficiente as alterações induzidas pelo tratamento no tecido [9]. Em face desta dificuldade, torna-se necessário calcular as variações relativas de  $T_c$  ao longo do tempo, para que tais alterações se tornem perceptíveis e possam ser quantificadas. Os autores da Ref. [13], definiram tal cálculo de acordo com a equação 2.3:

$$OC_{\text{eff}}(\lambda, t) = \frac{|T_c(\lambda, t) - T_c(\lambda, t=0)|}{T_c(\lambda, t=0)} \times 100 \%, \quad (\text{Eq. 2.3})$$

em que designaram  $OC_{\text{eff}}(\lambda, t)$  como a eficiência espectral de transparência, e em que  $T_c(\lambda, t)$  representa o espectro do tecido medido no instante  $t$  do tratamento e  $T_c(\lambda, t=0)$  representa o espectro do tecido no seu estado inicial, antes de iniciar o tratamento [9].

Nos estudos da Ref. [9] e da Ref [13], que dizem respeito ao músculo e à mucosa da parede colorretal humana, esta última nas versões saudável e com cancro, fazendo uma representação 3D da  $OC_{\text{eff}}(\lambda, t)$ , verifica-se que surgem janelas de transparência bem evidentes com comprimentos de onda centrais localizados sensivelmente a 230 e a 280-300 nm. Estes comprimentos de onda centrais correspondem às bandas de absorção das ligações de aminoácidos aromáticos nas proteínas, conforme já referimos, mostrando que o OCA dissolve as proteínas, quebrando estas ligações. No estudo da Ref. [13], verificou-se a ocorrência de apenas uma janela de transparência no músculo, centrada a 230 nm, quando tratado com uma solução que continha 20 % de glicerina. Este comprimento de onda corresponde às bandas de absorção de maior magnitude da tirosina e do triptofano, mas pode ter também uma contribuição da banda da fenilalanina que está centrada a 215 nm. Aumentando a concentração de glicerina para 40 % na solução, a janela centrada a 280-300 nm, que corresponde às bandas de menor magnitude da tirosina e do triptofano, começa a observar-se, tornando-se bem evidente e de magnitude elevada para o tratamento com a solução que contém 60 % de glicerina [13]. Verificou-se nestes dois estudos [9], [13], que a janela de transparência centrada a 280-300 nm apresenta um comportamento exponencial suave e crescente, que a partir de dado instante do tratamento estabiliza, mantendo a partir daí um comportamento praticamente invariável. A janela centrada a 230 nm, por outro lado, apresenta para todos os casos estudados um comportamento com regimes distintos e sucessivos ao longo do tempo de tratamento. Se no início do tratamento se verifica para esta janela um comportamento suave e exponencialmente crescente, como o observado para a outra janela, a partir dos 3 a 4 min, o regime passa a linear crescente. Este comportamento linear mantém-se até ao fim do tratamento ou pode passar a outro regime linear com menor crescimento, como se verificou para os dois tipos de mucosa colorretal no estudo da Ref. [9]. Este tipo de comportamento dual entre as duas janelas mostra que a dissociação ocorre não só nas ligações da fenilalanina, mas também nas ligações da tirosina e do triptofano, cuja quebra passa a ser mais visível nos regimes lineares a partir de um determinado tempo de tratamento, quando as ligações da fenilalanina passam a ocorrer num número muito reduzido, ou inexistente.

É importante salientar que no estudo apresentado na Ref. [9], as duas janelas que foram criadas por imersão dos tecidos em glicerina 99 % pura apresentam maior magnitude na mucosa patológica, o que mostra uma acumulação crescente de proteínas ao longo do desenvolvimento do cancro, conforme descrito na literatura [55].

Considerando o regime linear intermédio, que ocorre na janela a 230 nm entre os 3 e os 10 min de tratamento e que foi observado para os dois tipos de mucosa no estudo da Ref. [9], os autores calcularam o declive desse regime para cada caso, verificando que para a mucosa patológica tal declive era cerca de três vezes superior ao observado para a mucosa saudável. Com a determinação deste declive, que os autores da Ref. [9] designaram por taxa de dissociação das proteínas, fica caracterizado este mecanismo de transparência e verifica-se que pode ser usado para discriminar entre tecidos saudáveis e com cancro.

Na próxima secção serão descritas as características desejáveis que os OCAs devem apresentar para produzir transparência nos tecidos biológicos, agrupando os diferentes OCAs em três classes distintas, justificando também a escolha da sacarose para o presente estudo.

## **2.4. Agentes de transparência ótica**

Para que um determinado produto possa ser considerado um OCA, tem de apresentar várias características, conforme descrito na literatura [1], [4]. Em primeira análise, tal produto tem de ser inofensivo para o tecido a tratar e para os seus componentes biológicos [48], [56]. Por outro lado, deve ser capaz de criar uma pressão osmótica sobre o tecido biológico para induzir a desidratação do mesmo e ser capaz de se difundir para o seu interior [1], [3].

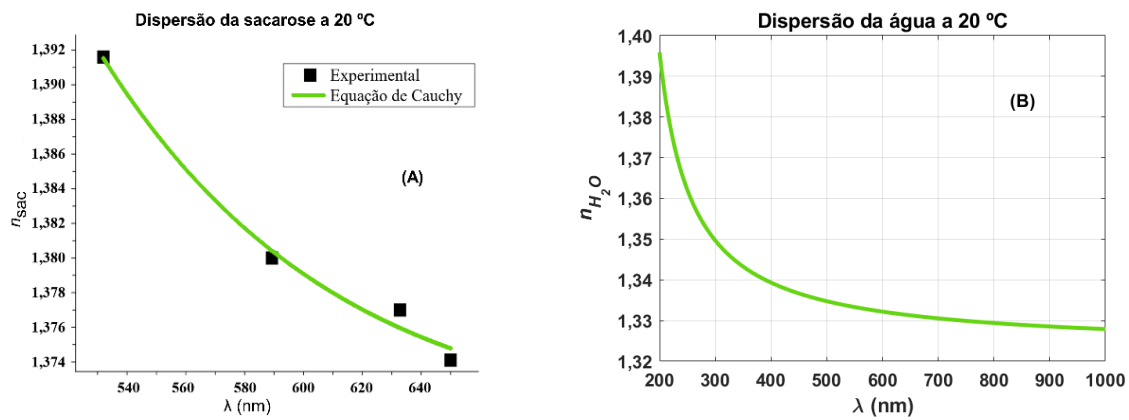
Foi também já referido que a dispersão dos tecidos e dos seus componentes biológicos é decrescente com o aumento do comprimento de onda entre o UV e o infravermelho. Os potenciais OCAs devem apresentar também uma dispersão deste tipo, com valores superiores aos da dispersão da água na mesma zona do espectro, para que ocorra uma adaptação eficiente de IRs entre o líquido intersticial e os restantes componentes do tecido durante o tratamento [48], [56]. Os OCAs podem ser líquidos, ou se forem produtos sólidos devem ser diluídos em água para preparar soluções aquosas, de forma a que fluam facilmente para os espaços intersticiais e se misturem com os fluídos do tecido. Tais líquidos ou soluções aquosas devem ser transparentes numa banda espectral o mais larga possível, sem apresentarem bandas de absorção na zona onde se pretende criar transparência no tecido. Caso tais bandas de absorção existam, devem ser de baixa magnitude e estar preferencialmente localizadas nas zonas onde a sua dispersão é significativamente crescente, ou seja, no UV, para que a forma do espectro do tecido não se altere durante o tratamento [56], [57].

Exemplos de agentes que apresentam estas características e que já foram usados como OCAs, tendo apresentado bons resultados, são a glicerina e o dimetilsulfóxido (DMSO) [1]. Estes agentes são habitualmente usados em outras aplicações, pelo que a sua dispersão foi já avaliada e encontra-se disponível numa base de dados online [58]. Esta base de dados contém também os espectros de transmitância destes e de outros OCAs, como o etilenoglicol ou o propilenoglicol, mostrando que as bandas de absorção que apresentam têm baixa magnitude e encontram-se localizadas no UV profundo, onde a dispersão é fortemente crescente.

Existem já vários OCAs, sendo em alguns casos preferível diluí-los em água ou criar misturas de dois ou mais OCAs, para obter diferentes efeitos de transparência em tecidos biológicos daqueles que seriam obtidos ao aplicar estes OCAs individualmente [4]. Para além das misturas de diferentes agentes de transparência, foi feita uma classificação dos diferentes agentes, que está relacionada com a natureza ou com a utilização desses agentes ou produtos. Assim, dentro dos OCAs elementares, existem os açúcares, os álcoois e as soluções eletrolíticas de contraste [1], [3], [59-61]. Exemplos de açúcares são a glucose, a frutose, a sacarose e a maltose, enquanto que no grupo dos álcoois podemos encontrar OCAs como a glicerina, o etilenoglicol ou o propilenoglicol [1]. No grupo das soluções eletrolíticas de contraste, que são produtos comerciais usados em diversos tipos de exames de imagem médica, encontramos por exemplo o Gadovist<sup>TM</sup>, o Trazograph<sup>TM</sup>, ou o Verographin<sup>TM</sup> [62], [63]. Todos estes produtos já foram testados em diversos estudos de transparência, tendo produzido resultados bastante bons. Outros que não são aqui mencionamos têm sido também testados e utilizados, assim como misturas ou soluções aquosas dos OCAs mais comuns. Alguns resultados obtidos nesses estudos podem ser encontrados na Ref. [4].

Para a realização do presente trabalho escolheu-se a sacarose, visto ser um açúcar com boas características e que não foi ainda muito utilizado para criar transparência em tecidos biológicos. Este açúcar é um dissacarídeo com a fórmula molecular  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , que apresenta uma massa molar de 342,30 g/mol [64] e uma viscosidade para uma solução aquosa na concentração de 60 % de 0,057 Pa.s a 20 °C [65], que é um valor baixo quando comparado por exemplo com a viscosidade da glicerina pura, que vale 1,412 Pa.s à mesma temperatura [66]. Este açúcar é abundantemente usado na indústria alimentar, sendo o adoçante mais consumido pela sociedade [67]. Como já foi mostrado anteriormente, soluções aquosas de sacarose podem também servir para criar transparência [1], [4], uma vez que apresentam todas as características necessárias, nomeadamente uma dispersão

decrecente com o crescimento do comprimento de onda, tal como mostra a Figura 2.1(A) para uma solução aquosa que contém 30 % de sacarose [68].



**Figura 2.1** - Dispersões de uma solução aquosa que contém uma concentração de 30 % de sacarose (A) [68] e da água (B) [69], ambas a 20 °C.

A dispersão da sacarose ( $n_{sac}$ ) representada na Figura 2.1(A) é descrita pela seguinte equação de *Cauchy* [68]:

$$n_{sac}(\lambda) = 1,3839 - \frac{16,11 \times 10^{-3}}{\lambda^2} + \frac{5,16 \times 10^{-3}}{\lambda^4}, \quad (\text{Eq. 2.4})$$

enquanto que a dispersão da água ( $n_{H_2O}$ ) representada na Figura 2.1(B) é descrita pela equação de *Cornu* seguinte [69]:

$$n_{H_2O}(\lambda) = 1,323 + \frac{4,206}{(\lambda - 142,3)}. \quad (\text{Eq. 2.5})$$

Comparando entre os dois gráficos da Figura 2.1, ou por cálculos com as equações 2.4 e 2.5, verifica-se que a sacarose apresenta uma dispersão superior à da água, podendo assim realizar a adaptação de IRs nos tecidos biológicos. De forma a consolidar a viabilidade da sacarose enquanto OCA, descrevemos agora alguns estudos em que a sacarose foi usada para criar transparência em tecidos biológicos.

Num ensaio realizado por *Berezin et al.*, no qual se estudou a interação entre uma série de dissacarídeos (sacarose, maltose, lactose, entre outros) e fibras de colagénio com o objetivo de estimar a  $OC_{eff}$  desses açúcares na pele humana, chegou-se à conclusão que a sacarose apenas era superada em termos de eficiência pela celobiose [70]. Ainda

relativamente à pele, um estudo realizado por *Feng et al.*, onde se compararam os potenciais de criação de transparência da sacarose, da maltose e da frutose enquanto OCAs, através da sua aplicação em tecidos *ex vivo* e *in vivo*, verificou-se que a  $OC_{eff}$  de todos eles aumenta linearmente com o aumento da concentração dos açúcares na solução de tratamento, para além de que é a sacarose que permite obter imagens a maior profundidade quando se utiliza a técnica de tomografia ótica coerente [71].

Por sua vez, *Zaytsev et al.* usaram um modelo de tecido híbrido de dupla camada, uma delas composta por pele humana ou de rato *ex vivo* e outra por um gel fluorescente, com o objetivo de investigar quais os efeitos de transparência ótica gerados na pele por tratamento com misturas de dois ou mais OCAs. A primeira dessas misturas continha polietilenoglicol 400 (PEG-400), propilenoglicol (PG) e sacarose (representando esta 50% do volume da mistura). A segunda mistura era composta por PEG-400, DMSO e glicerina (novamente numa concentração volúmica de 50%). Observou-se neste estudo que a segunda mistura produziu os melhores resultados de transparência ótica, principalmente devido à presença de DMSO, que é um composto comumente usado para aumentar a permeabilidade da pele a alguns medicamentos, através da dissolução de camadas de lípidos presentes na pele [72].

Considerando o que foi referido até agora, diversos açúcares demonstram ter potencial para serem aplicados como OCA, sendo que a sacarose se destaca pela positiva, dando uma importância maior ao seu estudo. Para além da sua eficiência, a utilização deste açúcar em estudos de investigação é também facilitada devido ao facto de a sacarose ser de fácil aquisição, podendo ser comprada em qualquer supermercado.

Para terminarmos a descrição do estado da arte, irá agora ser feita uma breve descrição da fisiologia do tecido escolhido para realizarmos o presente estudo, o músculo-esquelético.

### **2.5.O músculo esquelético**

O músculo esquelético representa aproximadamente 40% da massa corporal de uma pessoa, e consome cerca de 25% do débito cardíaco [73], permitindo a locomoção, suporte da postura, respiração [74], controlo da temperatura corporal, nivelção dos níveis de glucose e suporte para o desenvolvimento do esqueleto [75]. À formação do tecido muscular dá-se o nome de miogénese, sendo este um processo que se inicia ainda na fase embrionária da gestação, com a formação das fibras musculares primárias, mantendo-se

durante a idade adulta, através da regeneração e substituição de fibras musculares danificadas [76].

Em termos anatômicos, a composição do músculo esquelético pode ser analisada em três escalas distintas, designadas por escalas macroscópica, mesoscópica e microscópica [77]:

1. Na escala macroscópica é possível observar que o músculo é envolvido pelo epimísio, que é composto por tecido nervoso e vasos sanguíneos, que ao envolver porções mais pequenas do músculo se passa a designar de perimísio, formando os fascículos musculares, constituídos por fibras musculares paralelas entre si, rodeadas por endomísio [77], [78].
2. A escala mesoscópica divide estas fibras musculares em miofibrilas, cada uma envolvida por retículo sarcoplasmático e composta por sequências de sarcómeros, rodeados individualmente por dois túbulos-T [77], [78].
3. A escala microscópica analisa a estrutura do sarcómero, relativamente aos filamentos grossos e finos. Os filamentos grossos, também designados como filamentos de miosina, iniciam-se na linha-M e estendem-se até ambos os extremos do sarcómero, enquanto os filamentos finos, também designados de filamentos de actina, iniciam-se na linha-Z e estendem-se até à linha-M, fazendo com que estes filamentos se sobreponham. Os filamentos finos são formados principalmente por actinas em forma de dupla hélice- $\alpha$ , onde se entrelaçam troponina e tropomiosina de forma periódica. Através do consumo de adenosina trifosfato (ATP), as cabeças da miosina ligam-se a locais específicos da cadeia de actina, o que faz a aproximação da linha-Z com a linha-M, contraindo o sarcómero e possibilitando o movimento [77], [78].

Sendo um tecido vivo, o músculo esquelético não se encontra imune ao aparecimento de doenças associadas ao mesmo, designadas de miopatias, cujos sintomas podem variar desde o enfraquecimento muscular, devido a disfunções nas fibras musculares, até à ocorrência de câibras, rigidez e espasmos [75]. As miopatias podem ser amplamente categorizadas como hereditárias ou adquiridas, estando as primeiras associadas a mutações genéticas hereditárias e as segundas a inflamações, problemas endócrinos e exposição a agentes tóxicos [79]. Ambas as categorias podem levar a alterações na composição do músculo esquelético, nomeadamente reduzindo o número de proteínas presentes e aumentando o stress oxidativo [80]. Porém, os métodos comumente

utilizados para analisar tecidos musculares patológicos são dispendiosos [81], demorados e envolvem abordagens invasivas, como biópsias [82].

Para tornar os diagnósticos de patologias musculares mais rápidos e menos invasivos, surgiram nas últimas duas décadas algumas técnicas de imagem ótica, como a imagem de fluorescência e a microscopia de espalhamento Raman que podem ser aplicadas no caso específico do tecido muscular [83], [84]. Tal como descrito anteriormente, a aplicação de luz para produzir diagnóstico através destas técnicas encontra-se limitada a profundidades de penetração reduzidas, o que no caso do músculo, que é um tecido espesso, se torna um forte inconveniente. No sentido de aumentar a profundidade de penetração da luz e de captação de imagem em tecidos biológicos, com especial ênfase no tecido muscular, através da redução do espalhamento, podem aplicar-se tratamentos temporários e reversíveis de transparência [6], [85-87]. Tal criação de efeitos de transparência temporários para aumentar a profundidade de penetração da luz é de vital importância no caso do tecido muscular. Uma vantagem direta para este tipo de tecido consiste na criação de janelas de transparência ótica que foram descobertas na zona do UV [9], [13], que podem ser usadas para permitir diagnósticos a profundidades significativas. É sabido que a luz UV é citotóxica, mas poderão desenvolver-se protocolos em que se utilizem pequenas doses num curto intervalo de tempo após a criação das janelas de transparência para minimizar o efeito.

No sentido de estudar como a amplitude das janelas de transparência varia com a osmolaridade de sacarose na solução usada para criar efeitos de transparência, encontram-se descritos no próximo capítulo os materiais, métodos e cálculos utilizados no presente trabalho.

## CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS



### 3. Materiais e Métodos

O presente trabalho encontra-se estruturado em fases distintas, começando pela recolha e preparação dos tecidos a usar nos estudos experimentais. Os dados experimentais foram posteriormente usados em cálculos que permitiram caracterizar as janelas de transparência e relacionar a sua magnitude com a osmolaridade da sacarose nas soluções usadas para criar transparência.

Dada a diversidade de tarefas que levaram à realização deste trabalho, o presente capítulo encontra-se dividido em 4 secções. Na primeira serão descritos os procedimentos adotados para a recolha e preparação das amostras de tecidos a estudar. Na segunda secção serão descritos os procedimentos adotados para a preparação das soluções necessárias à criação de transparência nos tecidos, enquanto que a descrição dos estudos experimentais para a recolha de dados é feita na terceira secção. Por fim, na quarta secção descreve-se o procedimento de cálculos adotado que permitiu avaliar e caracterizar as janelas de transparência produzidas por cada tratamento, assim como o estabelecimento da relação entre a amplitude dessas janelas e a osmolaridade da sacarose na solução.

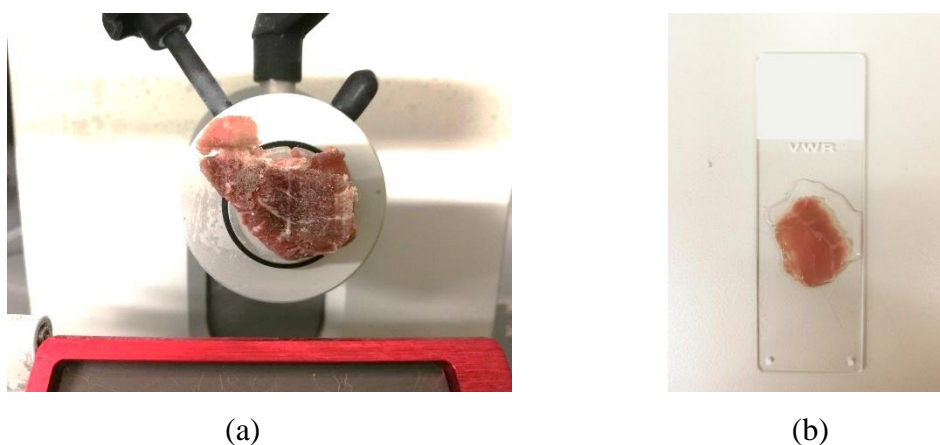
#### 3.1.Recolha e preparação das amostras de músculo esquelético

Foi já referido no capítulo 2 que o tipo de tecido escolhido para o presente trabalho de investigação foi o músculo esquelético. Dado que se pretendia conseguir este tipo de tecido em quantidades abundantes e com facilidade de aquisição, escolheu-se estudar o músculo de coelho.

Um coelho cinzento, em idade adulta de cerca de 36 meses, foi adquirido de um criador destes animais. O coelho foi fornecido já sacrificado e limpo, tendo-se retirado uma perna para usar nos estudos do presente trabalho e o restante do animal foi aproveitado para consumo. A perna do coelho foi de imediato congelada a uma temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  no laboratório do CIETI. Fragmentos de músculo foram dissecados da perna de coelho, consoante as necessidades para cada dia em que se realizaram os estudos.

Em cada dia que se realizaram estudos experimentais, o fragmento retirado da perna com um bisturi tinha dimensões aproximadamente circulares de 1 cm de diâmetro e espessura considerável. Tal fragmento foi colocado num crióstato (modelo CM1860 UV da Leica, Alemanha) para preparar as amostras a usar nos estudos com uma espessura

de 0,5 mm. Tal preparação das amostras é feita dentro do crióstato, a temperaturas negativas de cerca de  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para que ao cortar com a lâmina, se consiga a espessura pretendida com precisão. Na generalidade, começam por fazer-se uns cortes iniciais de desbaste na parte superior do fragmento para se obter uma superfície plana, cortando-se a primeira amostra apenas depois desse desbaste feito. Durante este processo de preparação das amostras, o fragmento de músculo era colocado sobre uma base metálica dentro do crióstato, entre os quais se inseria soro fisiológico, que ao congelar funciona como elemento de fixação. Apenas depois de verificada a fixação forte do fragmento se procedia aos cortes. O avanço entre cortes sucessivos foi calibrado para que a lâmina do crióstato se deslocasse de  $500\text{ }\mu\text{m}$ . As amostras já cortadas eram retiradas da câmara do crióstato com ajuda de uma pinça cirúrgica e colocadas sobre lâminas de microscópio e imersas em soro fisiológico para que durante pelo menos 10 min voltassem a ter a hidratação natural do músculo. Durante este processo de imersão, as amostras descongelavam à temperatura ambiente do laboratório, que era de  $20\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Foram preparadas 45 amostras de musculo no total para serem usadas no presente estudo. A Figura 3.1 mostra um fragmento de músculo dentro da câmara do crióstato, pronta para se proceder com os cortes e uma amostra já preparada, imersa em soro fisiológico, durante o processo de descongelamento.



**Figura 3.1** - Fragmento de músculo pronto a ser cortado (a) e amostra já cortada, imersa em soro fisiológico (b).

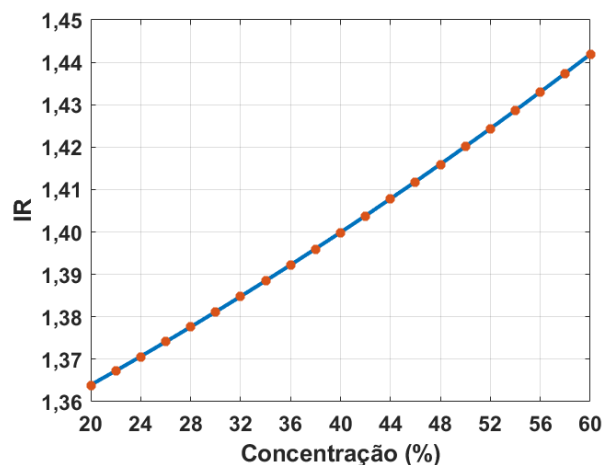
### **3.2.Preparação das soluções de sacarose**

Dado que este estudo se baseia em medições espectrais a realizar durante o tratamento de amostras de músculo com soluções aquosas que contenham diferentes

concentrações de sacarose, foi necessário preparar tais soluções. Este processo consistiu em dissolver sacarose em grão, que se comprou em saquetas num supermercado, em água destilada. Como as soluções pretendidas para realizar os tratamentos deviam ter concentrações de sacarose a cada 5 % entre 20 % e 60 %, procurou-se na literatura os valores de IR destas soluções. De acordo com a Ref. [88], o IR de soluções aquosas de sacarose a 589,6 nm e à temperatura de 20 °C cresce de forma não linear com a concentração deste açúcar. Nesta referência estão disponíveis os valores de IR para tais soluções, com concentrações de sacarose crescentes a incrementos de 2 % entre os 0 % e os 84 %. Assim, recolhendo os valores de IR para as soluções com concentrações entre 20 % e 60 %, usou-se a ferramenta *Curve Fitting Tool* (CFTOOL) do MATLAB<sup>TM</sup>, para ajustar uma curva a esses pontos. A curva obtida (com  $R^2=1$ ) está descrita pela seguinte relação, que é a mesma que foi anteriormente apresentada na Ref. [1]:

$$n_{sac-H_2O} = 7,52 \times 10^{-6} \times C^2 + 0,1347 \times 10^{-2} \times C + 1,334, \quad (\text{Eq. 3.1})$$

em que  $n_{sac-H_2O}$  representa o IR da solução de sacarose e  $C$  a concentração de sacarose na respetiva solução, em percentagem. A Figura 3.2 apresenta os valores de IR para o intervalo de concentrações entre 20 % e 60 % que estão publicados na Ref. [88], e a curva de ajuste descrita pela equação 3.1.



**Figura 3.2** - Valores de IR para soluções aquosas de sacarose (a 589,6 nm e 20 °C), com concentrações entre 20 % e 60 % e a curva de ajuste descrita pela equação 3.1.

Depois de feito o ajuste da curva aos pontos retirados da Ref. [88], foram retirados os valores de IR para as soluções de sacarose a usar no presente estudo. Tais valores encontram-se representados na Tabela 3.1.

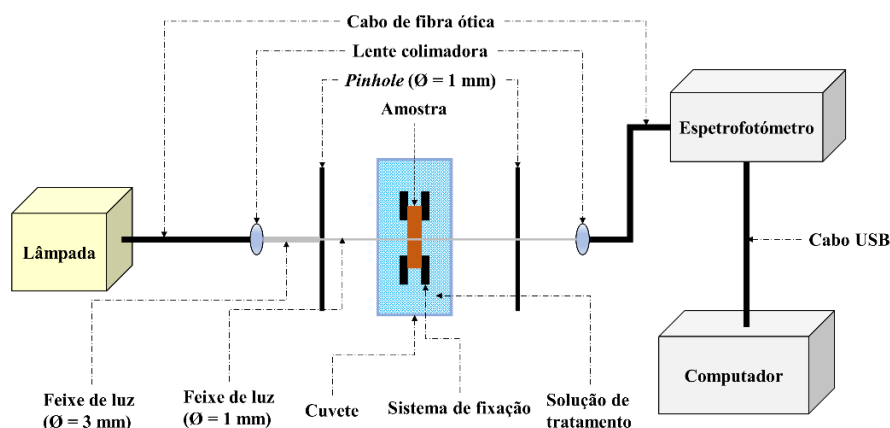
**Tabela 3.1** – Valores dos IRs para as diferentes soluções de sacarose a utilizar ( $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\lambda=589,6\text{ nm}$ ).

Concentração de sacarose na solução (%)	20	25	30	35	40	45	50	55	60
IR	1,3639	1,3724	1,3812	1,3904	1,3999	1,4098	1,4202	1,4308	1,4419

Para preparar estas soluções, a temperatura do laboratório foi mantida a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Fez-se a dissolução do açúcar em água destilada até que cada solução, depois de homogeneizada, apresentava no refratômetro de Abbe (ORT-1, Kern, Alemanha) o valor de IR correspondente que aparece na Tabela 3.1. Estas medições de controlo com o refratômetro foram também realizadas à temperatura de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para ajudar a dissolver a sacarose e a homogeneizar as soluções, foi utilizado um banho de ultrassons (Sonorex rk 100, Bandelin, Alemanha), onde se colocaram os frascos que continham as soluções. Caso o valor medido com o refratômetro estivesse abaixo do pretendido, adicionava-se mais açúcar e caso estivesse elevado, adicionava-se mais água, até obter o IR desejado.

### 3.3. Estudos experimentais

Após se terem preparado as amostras de músculo e as soluções para realizar os tratamentos, pôde dar-se início aos estudos experimentais. Tais estudos consistiram em medir os espectros de  $T_c$  das amostras em estado natural e durante os vários tratamentos aplicados, para que depois de processados, fosse possível estudar e caracterizar as janelas de transparência criadas na zona espectral do UV. Todos estes espectros foram medidos entre 200 e 1000 nm, com uma resolução de 1 nm. Para realizar estas medições foi utilizada uma montagem experimental como a representada na Figura 3.3.



**Figura 3.3** – Montagem experimental para medir os espectros de  $T_c$  das amostras.

Conforme mostra a Figura 3.3, a amostra de tecido, representada por um retângulo laranja, é colocada dentro de uma cuvete, sendo fixa numa posição central por um sistema mecânico (representado na Figura 3.3 por quatro retângulos pretos). A amostra é iluminada por um feixe proveniente de uma lâmpada de espectro largo, com emissão entre 175 e 2500 nm (modelo AvaLight-D(H)-S da Avantes<sup>TM</sup>, Holanda). O feixe proveniente desta lâmpada de deutério-halogénio é inserido para o interior da cuvete por intermédio de um cabo de fibra ótica, uma lente colimadora e um *pinhole* de 1 mm. A cuvete, que é construída em plástico preto, tem dois vidros com transmitância de 100 % entre 175 e 2500 nm, para permitir a entrada do feixe colimado e a sua saída após ser transmitido através da amostra. Do lado da deteção, o feixe transmitido é coletado por um sistema semelhante ao usado para iluminar a amostra, contendo um *pinhole* de 1 mm, uma lente colimadora e um cabo de fibra ótica, que entrega o feixe transmitido ao espectrofotómetro (modelo AVS-USB2000 da Avantes<sup>TM</sup>, Holanda) para registo. O software do espectrofotómetro calcula automaticamente o espectro de  $T_c$  da amostra, de acordo com a seguinte relação:

$$T_c(\lambda) = \frac{S_c(\lambda) - N_c(\lambda)}{L_c(\lambda) - N_c(\lambda)} \times 100 \%, \quad (\text{Eq. 3.2})$$

onde  $S_c(\lambda)$  representa o espectro do feixe de luz transmitido pela amostra,  $N_c(\lambda)$  representa o espectro de ruído da montagem experimental que foi medido sem a amostra e com a lâmpada desligada e  $L_c(\lambda)$  é o espectro registado com a montagem e com a lâmpada ligada, mas sem a amostra colocada no interior da cuvete.

A descrição de medição feita até aqui foi a adotada para registar os espectros de  $T_c$  das amostras em estado natural. Para realizar as medições durante os tratamentos de transparência por imersão, a solução é colocada dentro da cuvete, conforme representado pelos pontos azuis dentro da cuvete da amostra na Figura 3.3. Preenchendo na totalidade a cuvete com a solução, garante-se a imersão da amostra, pelo que as medições feitas serão sensíveis às alterações induzidas no tecido pelo tratamento aplicado. Estas medições realizadas durante os tratamentos foram feitas a cada 5 s num intervalo de tempo de 30 min. Este tipo de medições foi feito cinco vezes para cada tratamento estudado, permitindo assim obter resultados médios para cada solução usada para criar transparência nas amostras. Tais resultados médios serão apresentados no capítulo seguinte.

Após recolher todas as medições experimentais durante todos os tratamentos a estudar, foi necessário realizar processamento e cálculos para se poder detetar e caracterizar as janelas de transparência criadas. Tal procedimento está descrito na próxima secção.

### **3.4.Processamento de dados e cálculos**

Uma vez que na zona espectral do UV, o tecido muscular apresenta forte absorção para além de um elevado espalhamento [62], os espectros de  $T_c$  medidos de uma amostra ao longo de um tratamento não mostram a criação de janelas de transparência nessa zona do espectro. Considerando esse aspeto, uma representação 3D dos espectros medidos ao longo do tempo apenas mostrará o aumento de transparência criado na zona espectral do visível até ao infravermelho. Para ser possível identificar e caracterizar as janelas de transparência na zona do UV, torna-se necessário criar representações das variações relativas dos espectros medidos, tal como foi explicado na secção 2.3.

Assim, com o objetivo de visualizar e estudar as janelas de transparência criadas nas amostras de músculo esquelético quando sujeitas a cada tratamento estudado, foram calculadas as  $OC_{\text{eff}}(\lambda, t)$ , usando a equação 2.3. Este cálculo foi feito uma única vez para cada tratamento, usando os espectros médios para cada instante de tempo do tratamento, que foram obtidos de 5 estudos experimentais realizados. A representação da evolução de  $OC_{\text{eff}}(\lambda, t)$  ao longo do tempo para cada tratamento, permite de imediato identificar e caracterizar as janelas de transparência criadas na zona do UV. Estes e outros resultados obtidos no presente trabalho encontra-se representados no capítulo 4.

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO



## 4. Resultados e Discussão

Dado que o presente trabalho consistiu na realização de diferentes etapas, vamos começar por apresentar na secção 4.1 uma descrição das propriedades óticas das soluções aquosas de sacarose e do espectro de  $T_c$  característico do músculo esquelético, com o objetivo de identificar se foi feita uma boa escolha de materiais. Uma vez que foram realizados 5 estudos com cada solução de sacarose, serão apresentadas na secção 4.2 as evoluções temporais dos espectros médios de  $T_c$  obtidos nos diferentes tratamentos. Como o objetivo do presente trabalho consiste em caracterizar as janelas de transparência criadas pelos vários tratamentos nas amostras de tecido muscular, a secção 4.3 será usada para apresentar as variações temporais da  $OC_{eff}$  em cada tratamento, tal como calculadas pela equação 2.3. Por fim, na secção 4.4 será feita uma análise sobre a dependência entre a magnitude das janelas criadas e a osmolaridade da sacarose nas soluções de tratamento.

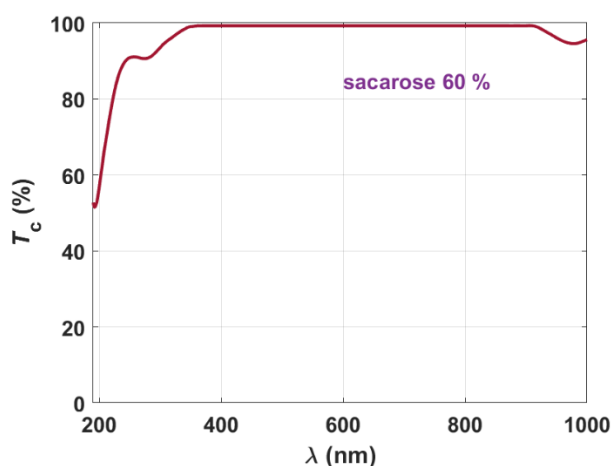
### 4.1. Características óticas das soluções e do músculo

No sentido de verificar se a sacarose apresenta alguma característica que impeça a criação de transparência no tecido muscular entre 200 e 1000 nm, deu-se início ao presente trabalho com a análise de algumas propriedades deste açúcar. De acordo com a literatura [1], para que um determinado líquido ou solução possa servir como OCA e criar transparência em tecidos biológicos, tem de apresentar uma dispersão fortemente crescente para comprimentos dentro do UV e, caso apresente bandas de absorção, estas não devem ser de magnitude muito elevada e tem de estar localizadas numa zona espectral onde o IR é fortemente elevado. Isto significa que se uma solução de sacarose tiver bandas de absorção, é necessário verificar a sua magnitude, a sua largura e em que zona do espectro ocorrem.

Começando por analisar a dispersão da sacarose, e apesar de apenas existirem dados publicados para a zona do espectro visível [68], vemos pela Figura 2.1(A) que uma solução que contém 30 % de sacarose apresenta um IR decrescente com o aumento do comprimento de onda. Mediante estes dados e considerando a lei de *Gladstone e Dale* para determinar o IR de misturas [2], [3], podemos concluir que qualquer solução aquosa de sacarose apresenta uma curva de dispersão do mesmo tipo e que essa curva se pode estender para comprimentos de onda maiores ou menores do que os representados na Figura 2.1(A). À semelhança de outros açúcares e álcoois, para os quais se conhecem as

curvas de dispersão para zonas espectrais mais alargadas [57], será de esperar que as curvas de dispersão das soluções de sacarose apresentem uma dependência suave no comprimento de onda entre os 200 e os 1000 nm.

Considerando agora o espectro de absorção das soluções de sacarose, torna-se necessário verificar experimentalmente se a sacarose apresenta bandas na zona espectral de interesse para o presente estudo, qual a sua largura e a sua magnitude. Para fazer tal análise, utilizou-se a montagem experimental apresentada na Figura 3.3 para se medir o espectro de  $T_c$  de uma solução que continha 60 % de sacarose entre 190 e 1000 nm. Tal espectro encontra-se representado na Figura 4.1.

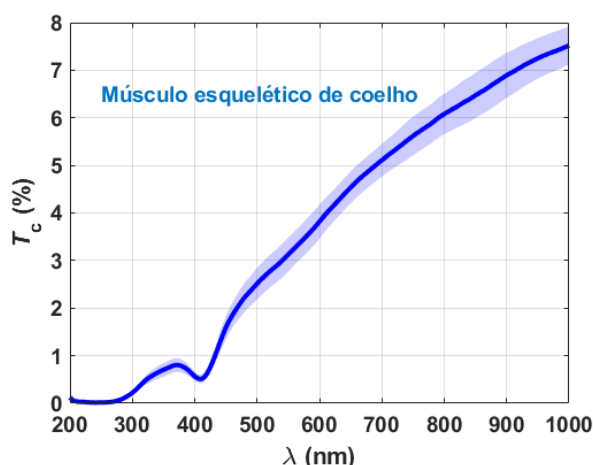


**Figura 4.1** – Espectro de  $T_c$  da solução aquosa que contém 60 % de sacarose.

O espectro representado na Figura 4.1 mostra que a solução com 60 % de sacarose tem uma transmitância de 100 % entre sensivelmente 350 e 900 nm, apresentando apenas bandas de absorção no UV e no infravermelho. A primeira dessas bandas está centrada a 195 nm, o que mostra que esta solução pode conter algumas proteínas, uma vez que estas apresentam bandas de absorção entre os 190 e os 230 nm [51], [52]. Tal inclusão de proteínas pode ter ocorrido acidentalmente durante a preparação da solução, uma vez que é sabido que proteínas e células mortas caem constantemente da camada mais exterior da pele, das mãos por exemplo. No entanto, esta banda é estreita e tem uma amplitude máxima na ordem de 50 %, ocorrendo numa zona do espectro onde se estima que o IR da solução é mais elevado e fortemente crescente. A segunda banda de absorção, que apresenta uma amplitude na ordem de 10 %, está centrada a sensivelmente aos 275 nm e por não se conhecerem bandas de absorção centradas neste comprimento de onda, a não ser a da hemoglobina do sangue a 274 nm [14], estima-se que seja uma banda de absorção

característica deste açúcar. Mais uma vez, considerando a baixa amplitude desta banda, o facto de ser estreita e o local onde ocorre, não será um obstáculo à criação de transparência nesta zona do espectro [4]. Já na zona do infravermelho, a solução apresenta uma terceira banda de absorção, centrada sensivelmente nos 980 nm. Esta banda de absorção é característica da água [14], e como 40 % do volume da solução testada é água, é de esperar que esta banda esteja presente no espectro medido.

Após uma análise das características óticas da solução mais concentrada de sacarose, tanto para a sua dispersão como para o seu espectro de absorção, verificamos que tais soluções, com diferentes osmolaridades, podem ser usadas para criar efeitos de transparência em tecidos biológicos. No âmbito da análise preliminar dos materiais a estudar, foram também medidos vários espectros de  $T_c$  do músculo esquelético de coelho, com o objetivo de avaliar qual a sua dependência no comprimento de onda e localizar as bandas de absorção características deste tecido. A Figura 4.2 apresenta o espectro médio de  $T_c$  do músculo, calculado a partir de 10 medições individuais.



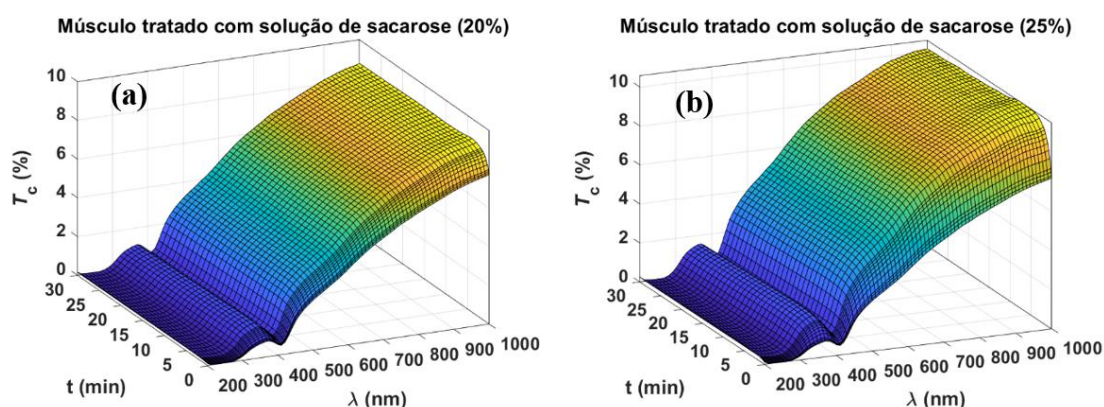
**Figura 4.2** – Espectro médio de  $T_c$  do músculo esquelético de coelho.

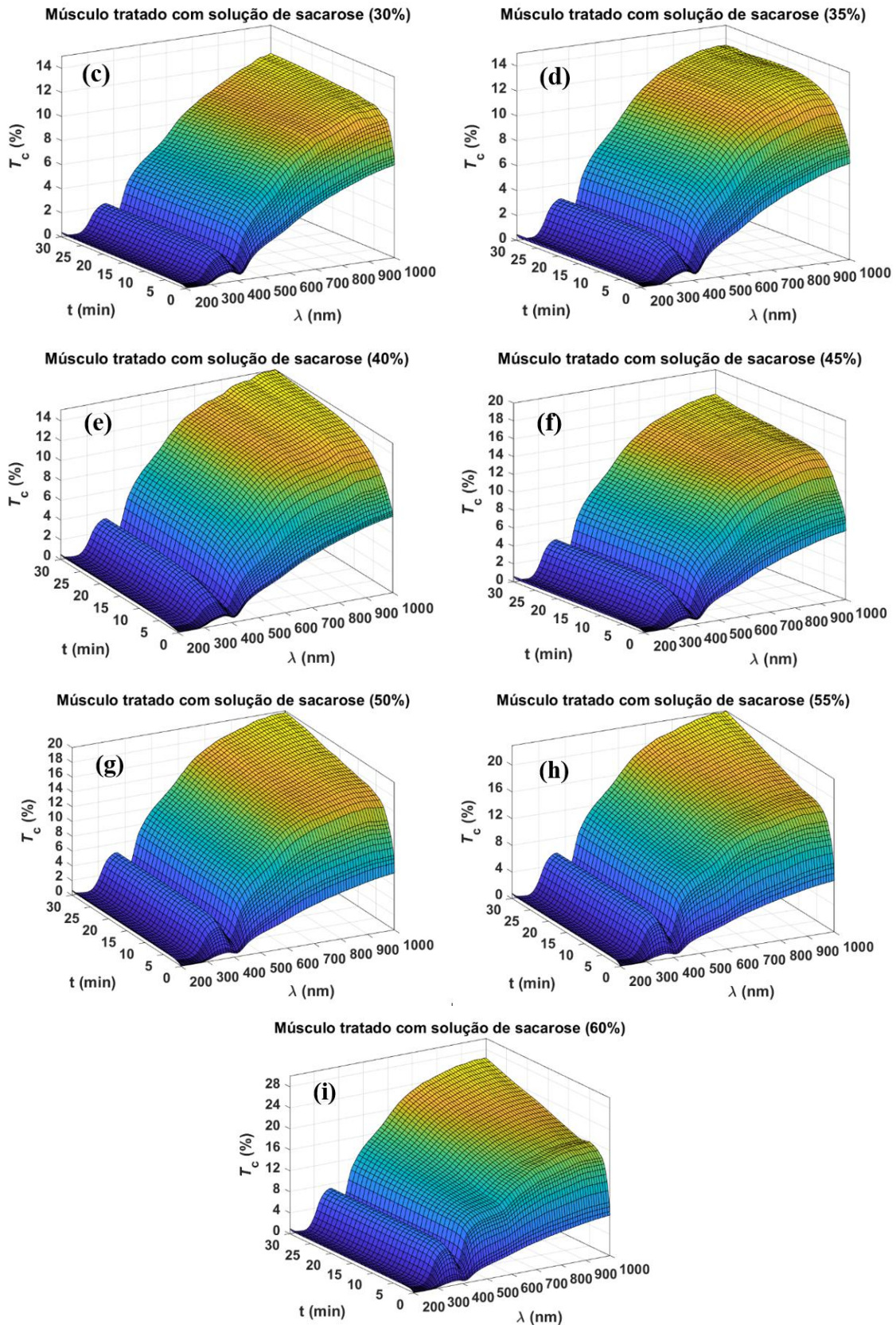
De forma geral, a Figura 4.2 mostra um espectro que cresce com o aumento do comprimento de onda, como é típico da maioria dos tecidos biológicos [2]. Na zona do UV, entre 200 e 300 nm, o músculo apresenta valores de  $T_c$  praticamente nulos, como resultado da combinação de forte espalhamento com a sobreposição de várias bandas de absorção que ocorrem nessa zona [1]. Tal como foi já referido, as proteínas apresentam algumas bandas de absorção entre os 190 e os 230 nm e uma outra a 280 nm [51], [52]. A 260 nm existe uma banda de absorção forte para o ADN/ARN [14] e a hemoglobina apresenta também a sua banda de absorção mais forte a 210 nm e uma outra a 274 nm

[14], [89]. Já na zona espectral do visível, e devido ao conteúdo de hemoglobina do sangue nas micro veias das amostras de músculo estudadas, surge a banda de Soret a 415 nm, e uma pequena depressão entre os 500 e os 600 nm, que evidência a presença das bandas Q (a 540 e a 570 nm) da hemoglobina, neste caso muito dissimuladas [14]. No espectro médio do músculo apresentado na Figura 4.2 não se verifica a ocorrência da banda de absorção da água a 980 nm. Isto acontece em alguns tecidos que tenham um espectro fortemente crescente nesta zona, como é o caso apresentado na Figura 4.2. Em face do espectro característico de  $T_c$  do músculo, verifica-se que este apresenta todas as características para se estudarem os efeitos de transparência, nomeadamente a criação de janelas de transparência no UV, quando imerso em soluções aquosas que contenham diferentes osmolaridades de um determinado OCA.

#### 4.2. Resultados medidos durante os tratamentos de transparência

Depois de se ter verificado que as características óticas das soluções de sacarose e do músculo eram de boa qualidade para o estudo a realizar, deu-se início aos tratamentos de transparência. Começaram por preparar-se as várias soluções de tratamento, conforme indicado na secção 3.2, e deu-se início aos tratamentos, tendo-se feito as medições experimentais como indicado na secção 3.3. Para cada tratamento realizado, foi calculada a variação temporal do espectro médio de  $T_c$  do músculo a partir dos 5 estudos realizados. A Figura 4.3 apresenta tais variações temporais do espectro médio de  $T_c$  para cada tratamento, entre 200 e 1000 nm.



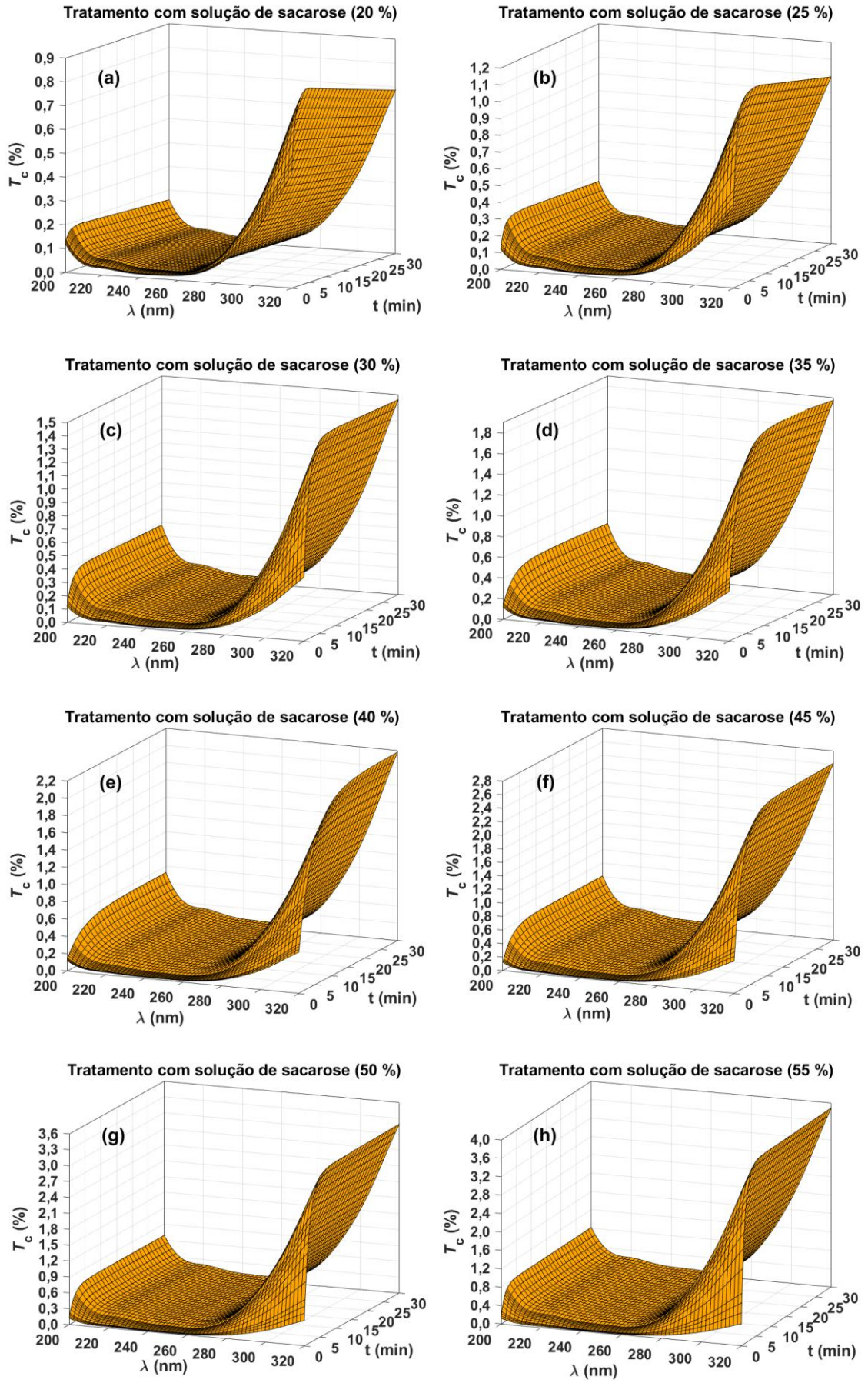


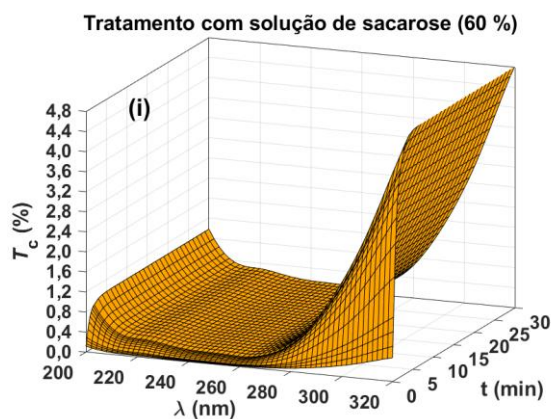
**Figura 4.3** – Variações temporais do espectro médio de  $T_c$  do músculo esquelético durante os tratamentos com soluções aquosas contendo sacarose nas concentrações de: 20 % (a), 25 % (b), 30 % (c), 35 % (d), 40 % (e), 45 % (f), 50 % (g), 55 % (h), 60 % (i).

Ao analisarmos os vários gráficos apresentados na Figura 4.3, verificamos que com o aumento da concentração na solução usada para fazer o tratamento, o valor de transparência atingido no visível e no infravermelho ao fim de 30 min, aumenta. Ao considerarmos a zona espectral entre os 415 e os 1000 nm, verificamos comportamentos distintos de  $T_c$  para os vários tratamentos. Em particular para o tratamento com a solução que contém 40 % de glucose, tal comportamento é suave e crescente ao longo de todo o tratamento. Tal comportamento, para este tratamento em particular, deve-se à difusão única da sacarose para o interior do tecido, uma vez que a água na solução se encontra em equilíbrio com a água móvel nos interstícios do tecido [4]. Os comportamentos distintos observados ao longo do tempo nos vários tratamentos aplicados estão relacionados com os fluxos de água para o exterior e de sacarose para o interior do músculo, que por sua vez condicionam a ocorrência dos mecanismos de transparência, nomeadamente o mecanismo de desidratação do tecido e de adaptação de IRs no tecido. O estudo destes dois mecanismos cai fora do âmbito do presente trabalho, mas encontra-se amplamente descrito na literatura [4].

O objetivo do presente trabalho consistiu em estudar e caracterizar as janelas de transparência criadas no tecido muscular em função da osmolaridade de sacarose na solução. Sendo esse o objetivo e considerando os gráficos apresentados na Figura 4.3, verificamos que todos os tratamentos aplicados criam uma janela de transparência para comprimentos de onda acima de 415 nm e que a amplitude dessa janela aumenta com a concentração de sacarose na solução de tratamento. Os gráficos da Figura 4.3 mostram a criação de uma outra janela de transparência, entre aproximadamente 260 e 415 nm, em que a amplitude dessa janela também aumenta com a concentração de sacarose na solução.

Numa primeira análise aos gráficos resultantes das medições experimentais diretas, observamos já a criação de duas janelas de transparência que os tratamentos com soluções de sacarose induzem no tecido muscular. Por outro lado, considerando a zona do UV profundo em cada um desses gráficos, parece que ocorre também um aumento de transparência, muito modesto, perto dos 200 nm. Para podermos visualizar melhor esse comportamento e identificar se há crescimento de transparência nessa zona do espectro, a Figura 4.4 apresenta ampliações dos gráficos da Figura 4.3, entre 200 e 320 nm.





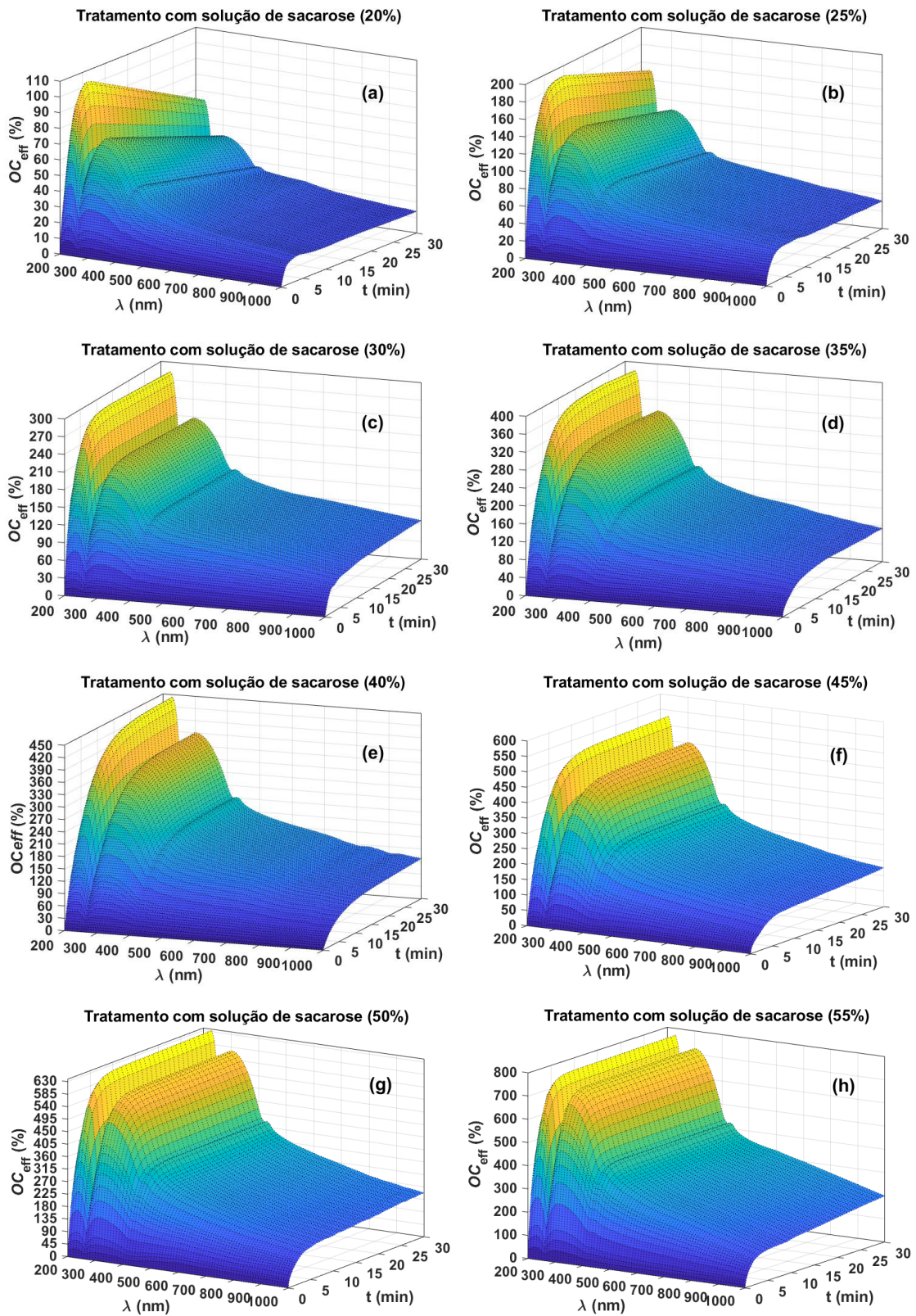
**Figura 4.4** – Variações temporais do espectro médio de  $T_c$  do músculo esquelético entre 200 e 320 nm durante os tratamentos com soluções aquosas contendo sacarose nas concentrações de: 20 % (a), 25 % (b), 30 % (c), 35 % (d), 40 % (e), 45 % (f), 50 % (g), 55 % (h), 60 % (i).

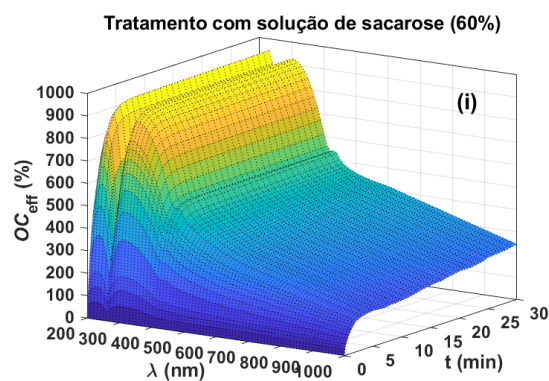
Pelos gráficos representados na Figura 4.4, observamos que ocorre também criação de transparência para comprimentos de onda inferiores a 260 nm. Verifica-se também que pelo menos uma outra janela de transparência, centrada a 200 nm ou a comprimentos de onda inferiores que não podemos ver por limitação da instrumentação, é criada. Com o aumento da concentração da sacarose na solução, esta nova janela de transparência apresenta um aumento da sua amplitude, tal como se verificou para as duas janelas observadas nos gráficos da Figura 4.3.

Dado que, devido à forte atenuação da luz que ocorre no UV, não se consegue retirar informação mensurável para caracterizar a terceira janela de transparência, torna-se necessário realizar alguns cálculos, para que os resultados desses cálculos permitam fazer tal caracterização. Para tal, será usado o conceito de eficiência de transparência, tal como introduzido pelos autores da Ref. [9]. Este cálculo, que é descrito pela equação 2.3, é definido pelas variações relativas do espectro de  $T_c$ . Os resultados deste cálculo para todos os tratamentos estudados encontram-se na secção seguinte, para avaliar e caracterizar todas as janelas e transparência com maior precisão.

### 4.3. Cálculo da eficiência de transparência para os vários tratamentos

Usando a equação 2.3 procedeu-se ao cálculo das variações temporais da eficiência de transparência para cada tratamento. Este cálculo foi feito usando os espectros médios de cada tratamento, tal como os representados na Figura 4.3. A Figura 4.5 apresenta os resultados deste cálculo para todos os tratamentos.





**Figura 4.5** – Variações temporais de  $OC_{\text{eff}}(\lambda)$  durante os tratamentos com soluções aquosas contendo sacarose nas concentrações de: 20 % (a), 25 % (b), 30 % (c), 35 % (d), 40 % (e), 45 % (f), 50 % (g), 55 % (h), 60 % (i).

Uma primeira informação que todos os gráficos representados na Figura 4.5 mostram é que existem efetivamente três janelas de transparência que são criadas pelos tratamentos. Estas janelas estão separadas na escala de comprimentos de onda pelas bandas de absorção do ADN/ARN (a 260 nm) e da hemoglobina no sangue – a banda de Soret (a 415 nm) [14], e que na ausência de tais bandas de absorção, as três janelas seriam uma só. A informação nova que os gráficos da Figura 4.5 apresentam é que a janela de transparência que ocorre para comprimentos de onda acima dos 415 nm é de todas a que na realidade apresenta menor eficiência e que apresenta um decréscimo de amplitude com o aumento do comprimento de onda. Quanto às outras duas janelas de transparência, localizadas ambas no UV, verifica-se que apresentam uma amplitude significativamente superior, o que mostra que a zona do espectro localizada no UV apresenta maior potencial de aplicação das tecnologias óticas para procedimentos de diagnóstico e de tratamento, quando combinados com a criação de transparência. Esta informação foi inicialmente reportada pelos autores da Ref. [9], após terem tratado tecidos gengivais e colorretais humanos com soluções de glicerina de elevada pureza.

Considerando os vários tratamentos, a que correspondem os gráficos apresentados na Figura 4.5, verifica-se que as duas janelas de transparência que ocorrem na zona do UV estão sempre centradas a 230 e a 300 nm, informação que não foi possível identificar com clareza nos gráficos das Figuras anteriores. O comprimento de onda central da primeira janela de transparência, a 230 nm, corresponde à banda de absorção mais forte das ligações de aminoácidos aromáticos, a tirosina e o triptofano, nas proteínas [51], [52]. Por outro lado, a fenilalanina apresenta uma banda de absorção mais fraca centrada a 215 nm [52]. Ao observarmos um máximo de transparência a este comprimento de onda para

todos os tratamentos estudados, verificamos que a sacarose em baixas concentrações na solução induz a dissociação das ligações de fenilalanina e com o aumento de concentração da sacarose passa também a ocorrer a dissociação das ligações da tirosina e do triptofano. Este processo é o mecanismo de transparência designado por dissociação de proteínas, que com este estudo se esclarece que ocorre em dois passos com o aumento de concentração da sacarose na solução de tratamento.

Relativamente à segunda janela, que está centrada a 300 nm, verificamos que na realidade ela deveria estar centrada a 280 nm, que corresponde à banda menos intensa das ligações da tirosina e do triptofano [51], [52]. No entanto, dada a proximidade à banda de absorção da hemoglobina a 274 nm e à do ADN/ARN a 260 nm [14], sendo esta última muito forte, o máximo de transparência aparece deslocado para os 300 nm, uma vez que a sacarose não consegue dissociar estes componentes.

Quanto à avaliação das duas janelas que são criadas na zona do UV, elas apresentam magnitudes crescentes com o aumento da concentração da sacarose na solução usada para o tratamento. Para os tratamentos realizados com soluções de 20 % e 25 % de sacarose, verifica-se em ambas as janelas um crescimento rápido inicial, que depois passa a um decréscimo linear. Este comportamento ao longo do tempo mostra que a difusão de moléculas de sacarose para o interior do tecido está limitada pelo baixo conteúdo deste açúcar na solução de tratamento. Assim, como apenas poucas moléculas de sacarose se difundem para o interior do tecido, a dissociação de ligações de fenilalanina é feita em número reduzido e num curto intervalo de tempo. Por outro lado, o decréscimo linear observado na fase final desses tratamentos com baixas osmolaridades de sacarose, mostra que por falta de moléculas de sacarose no interior do tecido, as ligações de proteínas que foram quebradas, começam a voltar a formar-se. Uma forma de acelerar esse processo de reversão da dissociação das proteínas seria mergulhar os tecidos tratados em soro fisiológico, como demonstrado no artigo da Ref. [41]. Para os tratamentos com soluções mais concentradas de sacarose, o decréscimo de  $OC_{eff}$  já não se verifica numa fase tardia dos tratamentos. Isto acontece porque ocorreu uma difusão de um elevado número de moléculas de sacarose para o interior, que se agregam junto das proteínas impedindo que estas voltem a formar as ligações de tirosina e triptofano após a sua dissociação inicial.

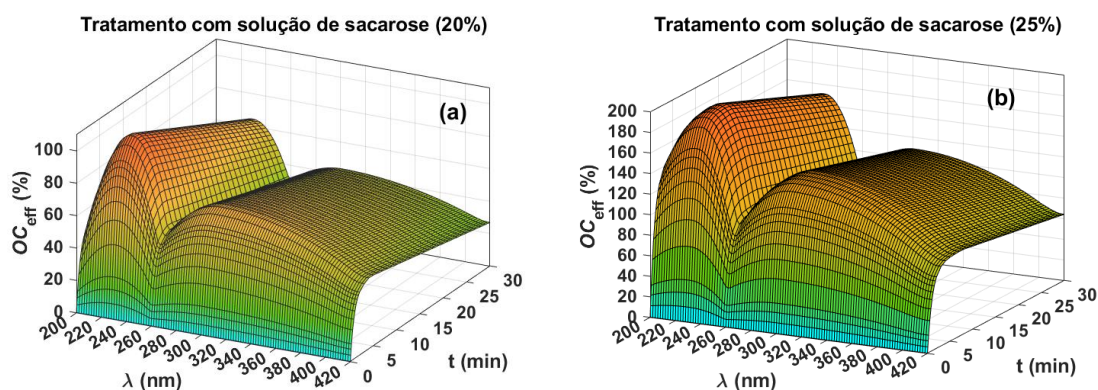
Deve notar-se que o crescimento elevado da  $OC_{eff}$  na zona do UV que leva à criação destas duas janelas de transparência tem também origem no mecanismo de adaptação de IRs, conforme descrito na literatura [1], [4]. Isto acontece devido ao facto

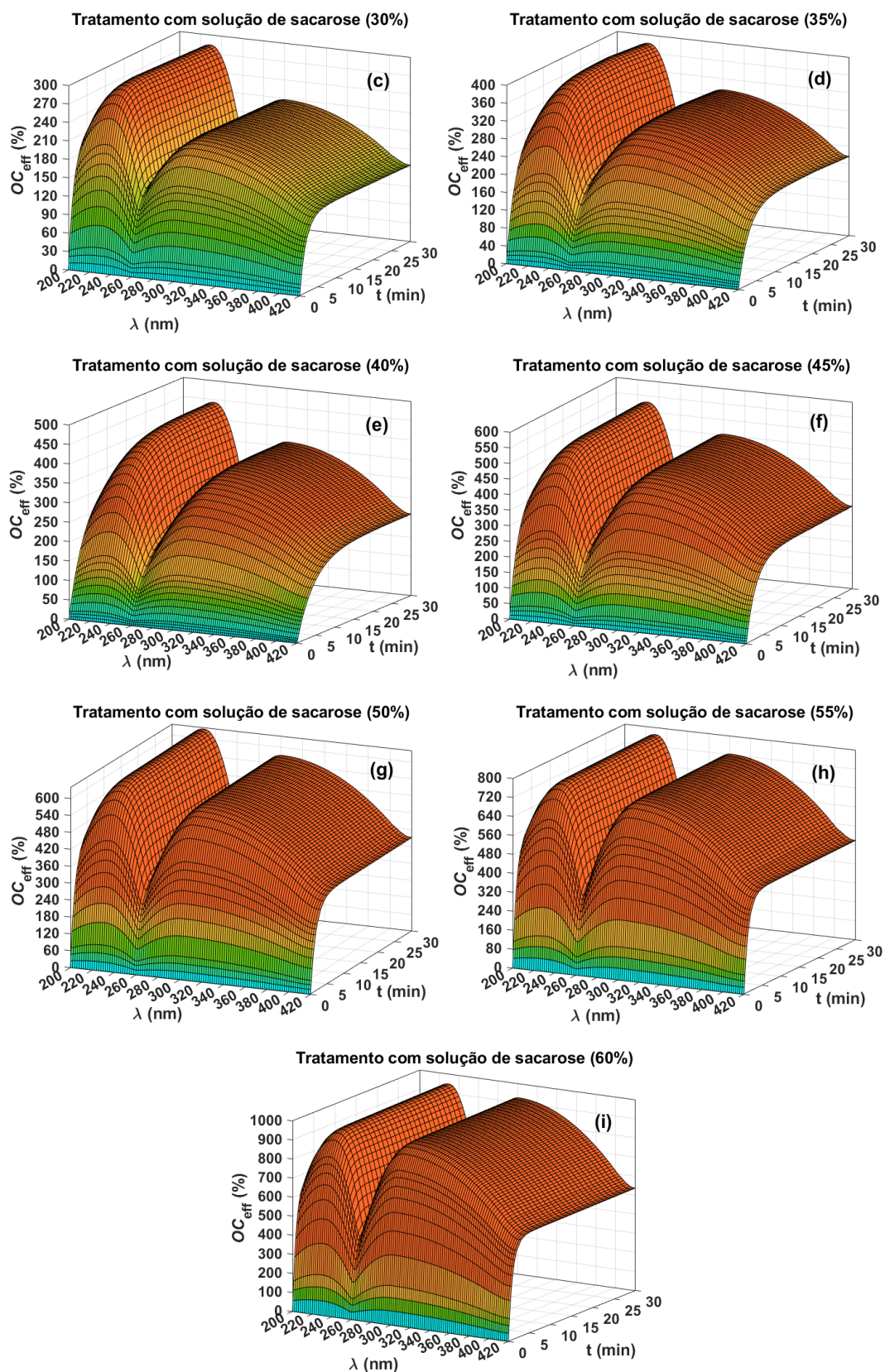
de que nesta zona do espectro, não só existe um conjunto significativo de fortes bandas de absorção, como também ocorre um elevado espalhamento da luz, que decresce exponencialmente com o aumento do comprimento de onda, conforme foi já referido. Com a introdução de um elevado número de moléculas de sacarose no espaço intersticial do tecido, o IR do líquido intersticial aumenta, aproximando-se dos valores de IR dos restantes componentes. Esta adaptação dos IRs dentro do tecido, combinada com a dissociação de proteínas leva à ocorrência de um efeito de transparência que na zona do UV é mais eficiente do que na zona do visível e do infravermelho.

Após a observação da criação de duas janelas de elevada eficiência na zona do UV, vamos terminar o presente estudo fazendo uma análise sobre a dependência entre a amplitude dessas janelas com a osmolaridade da sacarose nas soluções de tratamento.

#### 4.4. Dependência entre a amplitude das janelas e a osmolaridade da sacarose em solução

De forma a podermos estudar a relação entre a osmolaridade da sacarose na solução de tratamento e a amplitude das janelas criadas na zona do UV, torna-se necessário fazer uma análise mais cuidada dos gráficos da  $OC_{eff}$  representados na Figura 4.5. Serão agora considerados os gráficos representados na Figura 4.6, que são os mesmos da Figura 4.5, mas em que se considera apenas a zona do espectro entre 200 e 420 nm, o intervalo de comprimentos de onda onde estão contidas as duas janelas de transparência de interesse.





**Figura 4.6** – Variações temporais de  $OC_{eff}$  ( $200 \leq \lambda \leq 420$  nm) durante os tratamentos com soluções aquosas contendo sacarose nas concentrações de: 20 % (a), 25 % (b), 30 % (c), 35 % (d), 40 % (e), 45 % (f), 50 % (g), 55 % (h), 60 % (i).

Dos vários tratamentos representados nos gráficos da Figura 4.6, podemos retirar os valores máximos de  $OC_{eff}$  que se verificam em cada janela de transparência e o instante de tempo em que ocorrem, para obter informação adicional. Em primeiro lugar, tal recolha de valores dá informação sobre a magnitude máxima de cada uma das duas janelas que são criadas por cada tratamento e ao fim de quanto tempo esses máximos são atingidos. Por outro lado, fazendo a razão entre os valores máximos observados para a  $OC_{eff}$  da janela centrada a 300 nm e da janela centrada a 230 nm, podemos recolher informação sobre a proporção da dissociação de cada uma das ligações proteicas em cada tratamento. A Tabela 4.1 apresenta para cada tratamento os valores máximos da  $OC_{eff}$  obtidos a 230 e a 300 nm, o instante de tempo do tratamento onde ocorrem e a proporção entre esses valores para as duas janelas.

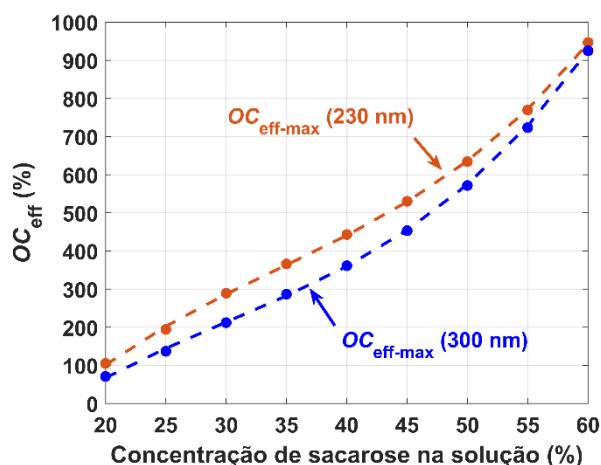
**Tabela 4.1** – Magnitudes máximas das janelas de transparência, instantes de tempo onde ocorrem e proporção das magnitudes entre as duas janelas.

Concentração de sacarose na solução (%)	Instante em que ocorre a $OC_{eff}$ máxima (min)	Máximo de $OC_{eff}$ ( $\lambda = 230$ nm) (%)	Máximo de $OC_{eff}$ ( $\lambda = 300$ nm) (%)	Proporção
				$\frac{OC_{eff}(\lambda = 300 \text{ nm})}{OC_{eff}(\lambda = 230 \text{ nm})}$ (%)
20	4	105,41	71,19	67,54
25	7	194,42	137,02	72,03
30	11	289,07	212,19	73,40
35	21	366,19	286,74	78,30
40	30	443,30	361,28	81,50
45	30	530,39	453,18	85,44
50	30	634,43	571,78	90,12
55	30	769,64	723,62	94,02
60	30	947,02	925,28	97,70

Analisando os valores apresentados na Tabela 4.1, verificamos que para tratamentos com soluções de sacarose com concentrações inferiores a 40 %, o tempo necessário para se atingir o máximo de  $OC_{eff}$  vai crescendo com a concentração. Para concentrações superiores, o tempo necessário para se atingir o máximo mantém-se constante nos 30 min. Os valores máximos de  $OC_{eff}$  observados em cada uma das janelas também aumentam com a concentração de sacarose em solução, sendo que a janela centrada a 230 nm apresenta os valores mais elevados. Na última coluna da Tabela 4.1 verifica-se também que a proporção entre os valores máximos de  $OC_{eff}$  obtidos para as duas janelas tem também um crescimento com a osmolaridade de sacarose em solução. No entanto, tais valores são sempre inferiores a 100 %, o que mostra que, para os

tratamentos estudados, a magnitude da janela de transparência centrada a 300 nm nunca ultrapassa a magnitude obtida para a janela centrada a 230 nm.

Para melhor compreensão da relação entre os valores de  $OC_{\text{eff}}$  máximos obtidos para as duas janelas e a concentração de sacarose na solução de tratamento foi criado o gráfico apresentado na Figura 4.7.



**Figura 4.7** – Valores de  $OC_{\text{eff}}$  máximos registados para as duas janelas de transparência em função da concentração de sacarose em solução.

Pela representação feita na Figura 4.7, observamos que as duas janelas de transparência apresentam valores de  $OC_{\text{eff}}$  máximos próximos entre si para concentrações de sacarose baixas e elevadas na solução de tratamento. Considerando os dois conjuntos de dados na Figura 4.7, verificamos que os valores máximos de  $OC_{\text{eff}}$  obtidos para as duas janelas se vão afastando entre si com o aumento da concentração entre 20 % e 40 %. Em oposição, para concentrações superiores, tais valores vão-se aproximando entre si até à concentração máxima de 60 %. Verificando que a maior diferença entre os valores máximos de  $OC_{\text{eff}}$  ocorre para a concentração de 40 %, podemos dizer que tal solução, que tem o mesmo conteúdo de água que a água móvel no tecido [90], [91], representa um ponto de transição entre o tipo de ligações nas proteínas que são quebradas pelas moléculas de sacarose. De acordo com os espectros de absorção da fenilalanina, da tirosina e do triptofano apresentados na literatura [51], [52], nas proximidades dos 230 nm, a fenilalanina tem uma banda de absorção com uma magnitude algo inferior às das bandas da tirosina e do triptofano, enquanto que na zona dos 280 nm, tal magnitude para a fenilalanina é muito reduzida, assumindo valores insignificantes quando se compara com as magnitudes observadas para os outros dois aminoácidos. Considerando estas

relações entre as bandas de absorção destes aminoácidos aromáticos e os resultados apresentados na Figura 4.7, podemos dizer que para concentrações de sacarose até 40 % a ligação que a sacarose dissocia nas proteínas de forma dominante é a da fenilalanina. Para concentrações superiores, em que mais moléculas de sacarose se concentram nas proximidades das proteínas, as quebras de ligações que passam a dominar são as da tirosina e do triptofano. Para essas concentrações de sacarose superiores a 40 %, embora a ligação da fenilalanina continue a ser dissociada, a dissociação das ligações de tirosina e de triptofano passa a ser dominante devido ao suprimento de um maior número de moléculas de sacarose que é necessário para quebrar tais ligações mais fortes.

Para descrever as dependências entre os valores máximos de  $OC_{\text{eff}}$  e a concentração da sacarose na solução, que estão representadas pelas curvas a tracejado na Figura 4.7, recorreu-se à ferramenta CFTOOL do MATLAB<sup>TM</sup>. Para cada conjunto de dados, referente a cada janela de transparência, foi conseguido um ajuste com um polinómio de terceiro grau, com valores de  $R^2$  de 0,9998 nos dois casos. Para o conjunto de dados referentes à janela centrada nos 230 nm, o ajuste foi conseguido com a curva descrita pela relação seguinte:

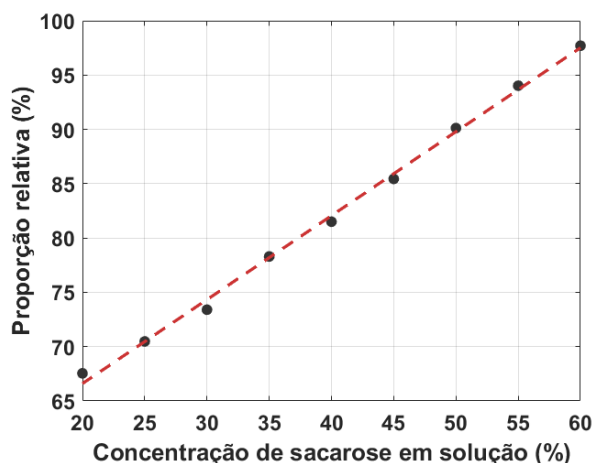
$$y_1 = 0,01204 \times C^3 - 1,241 \times C^2 + 57,73 \times C - 653,2, \quad (\text{Eq. 4.1})$$

enquanto que para os dados referentes à janela centrada a 300 nm, o ajuste foi obtido com a curva descrita por:

$$y_2 = 0,01130 \times C^3 - 1,016 \times C^2 + 43,94 \times C - 495,4. \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Um último resultado que se pode retirar da Figura 4.7 é que para o tratamento com a solução que contém 60 % de sacarose, se verifica que os valores máximos de  $OC_{\text{eff}}$  são quase iguais. Isto significa que devido à elevada concentração de moléculas que se difundiu para o interior dos tecidos musculares, a dissociação dos dois tipos de ligações passa a ocorrer quase na mesma proporção. A quase igualdade dos valores de  $OC_{\text{eff}}$  para as duas janelas leva-nos a concluir que caso não existissem as bandas de absorção do ADN/ARN a 260 nm e da hemoglobina do sangue a 274 nm, as duas janelas que são criadas no UV seriam uma só, com o seu máximo de eficiência a ocorrer próximo dos 270 nm.

Representando agora na Figura 4.8 a dependência da proporção entre valores máximos de  $OC_{\text{eff}}$  e a concentração de sacarose na solução, como representado na última coluna da Tabela 4.1, verificamos que estes parâmetros apresentam uma dependência linear.



**Figura 4.8** – Proporção entre os máximos de  $OC_{\text{eff}}$  em função da concentração de sacarose em solução.

Para as concentrações de sacarose usadas em solução verifica-se uma proporção mínima de 67,5 % entre os valores máximos de  $OC_{\text{eff}}$  observados a 300 e a 230 nm para o tratamento com 20 % de sacarose. O valor máximo de 97,7 % obtido para a concentração de 60 % de sacarose mostra que os máximos de  $OC_{\text{eff}}$  obtidos nas duas janelas tem quase a mesma magnitude para este tratamento. A curva apresentada na Figura 4.8 é descrita pela seguinte relação,

$$y_3 = 0,7573 \times C + 51,94 \quad (\text{Eq. 4.3})$$

que mais uma vez foi obtida usando o CF TOOL do MATLAB<sup>TM</sup>. O valor de  $R^2$  obtido neste ajuste foi de 0,9949. Fazendo um pequeno cálculo com a equação 4.3 podemos verificar que a magnitude da janela de transparência centrada a 300 nm poderá assumir valores iguais ou mais elevados aos obtidos para a janela centrada a 230 nm, quando a concentração de sacarose na solução for igual ou superior a 63,5 %.

Tendo terminado o presente trabalho, vamos agora apresentar as conclusões que são consequência dos resultados obtidos e apresentar algumas perspectivas para futuros trabalhos de investigação.



## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO



## 5. Conclusão

O presente trabalho consistiu em realizar medições de espectros de tecidos musculares durante a sua imersão em soluções aquosas que continham diferentes osmolaridades de sacarose, no sentido de identificar e caracterizar as janelas de transparência que ocorrem nos tecidos na zona do UV em resultado dos tratamentos aplicados. Pretendia-se também estabelecer uma relação entre a magnitude das janelas de transparências criadas e a concentração de sacarose usada nas soluções de tratamento.

Dado que os tratamentos de transparência que são aplicados a tecidos biológicos são processos dinâmicos, a representação da evolução temporal do espectro de  $T_c$  do tecido durante o tratamento permitiu de imediato identificar que é criada uma janela de transparência na zona do espectro correspondente ao visível e ao infravermelho, para comprimentos de onda acima de 415 nm. Tais representações permitiram também identificar uma outra janela de transparência localizada entre sensivelmente 280 e 415 nm, uma zona do espectro onde se desconhecem bandas de absorção significativas para os tecidos biológicos. Dado que a comprimentos de onda abaixo dos 280 nm os tecidos apresentam forte espalhamento da luz que é combinado com um conjunto considerável de bandas de absorção, tal zona do espectro não apresentou variações significativas durante os tratamentos estudados. No entanto, para comprimentos de onda entre os 200 e os 230 nm, tal representação dinâmica dos espectros medidos durante os tratamentos aparentava mostrar um pequeno crescimento.

Para melhor perceber se ocorre realmente um crescimento da transparência do tecido nessa zona de baixos comprimentos de onda, os espectros médios dos vários tratamentos foram processados de forma a obter as suas variações relativas, tendo por referência o espectro de  $T_c$  do tecido no seu estado natural. Com o cálculo da chamada eficiência de tratamento, foi possível verificar que na realidade ocorrem três janelas de transparência entre 200 e 1000 nm. Tais janelas estão limitadas entre si pelas bandas de absorção do ADN/ARN e da hemoglobina, a 260 e a 415 nm, respetivamente. Considerando a escala crescente do comprimento de onda, a primeira janela de transparência observada nesta nova representação encontra-se centrada a 230 nm e a segunda encontra-se centrada a 300 nm. A terceira janela de transparência, que apresenta magnitude decrescente com o crescimento do comprimento de onda, apresenta o seu máximo nas proximidades de 420 nm.

Foi feita uma análise da magnitude das duas janelas localizadas no UV, verificando-se que a sua dependência na concentração de sacarose na solução de tratamento não é linear. Observou-se que para concentrações de sacarose inferiores a 40 %, tal magnitude máxima ocorria a instantes de tempo intermédios do tratamento, enquanto que para concentrações acima de 40 % tal máximo de magnitude apenas ocorria no final do tratamento. Um outro resultado obtido desta análise foi que a janela centrada a 230 nm apresentava sempre magnitudes superiores à da janela centrada a 300 nm, embora para concentrações mais elevadas, esta última janela apresentasse magnitudes muito próximas das observadas para a janela centrada a 230 nm. Foi estabelecida uma relação de proporção entre as magnitudes das duas janelas, que permitiu concluir que para uma concentração de sacarose igual a 63,5 %, as duas janelas teriam a mesma magnitude. Da relação estimada, conclui-se que para concentrações superiores, a magnitude da janela centrada a 300 nm superará a magnitude da janela centrada a 230 nm, o que foi interpretado como resultado de uma dissociação de proteínas pela ligação da tirosina e do triptofano mais acentuada do que a dissociação da fenilalanina. Retirou-se também da análise feita que, para concentrações inferiores a 40 %, a ligação da fenilalanina nas proteínas é que sofre uma dissociação mais intensa por parte das moléculas de sacarose. Para soluções com concentrações de sacarose superiores a 40 %, como ocorre uma difusão de moléculas deste açúcar em maior número para o interior do tecido, tal conjunto de moléculas consegue dissociar as ligações da tirosina e do triptofano, que apresentam bandas de absorção mais fortes a 280 nm.

Os resultados que foram obtidos no presente trabalho permitem compreender melhor o mecanismo de transparência designado por dissociação de proteínas, uma vez que foi possível identificar que ligações dos diferentes aminoácidos são dissociadas em função da concentração da sacarose na solução. Por outro lado, com a dissociação das proteínas o mecanismo de adaptação de IRs sai também beneficiado, permitindo obter magnitudes mais elevadas para os picos centrais das janelas criadas.

Em consequência dos resultados obtidos no presente trabalho, será de interesse realizar o mesmo tipo de estudo com outros tecidos e com outros OCAs, no sentido de caracterizar as magnitudes das janelas de transparência criadas no UV em função da osmolaridade do OCA em solução e identificar as soluções ótimas para se poder combinar os efeitos de transparência no UV com procedimentos clínicos de diagnóstico ou de tratamento. Um exemplo de particular interesse consiste em repetir este estudo com versões saudáveis e com cancro do mesmo tipo de tecido. Isto porque se sabe que os

tecidos com cancro apresentam maior conteúdo de proteínas e os resultados de tal estudo poderão ser diferenciados entre as duas versões dos tecidos. Por outro lado, sabe-se que as células cancerígenas consomem açúcar para se multiplicarem e os resultados a obter em tal estudo poderão permitir avaliar a taxa de consumo de sacarose em tecidos com cancro. A realização de estudos deste tipo com outros tipos de tecido permitirá, por exemplo, identificar a ocorrência de máximos das janelas de transparência para outros comprimentos de onda distintos. Adicionalmente, com a utilização de OCAs diferentes, como por exemplo a frutose ou a glicerina, podem obter-se magnitudes distintas das obtidas no presente trabalho para as janelas de transparência.



## Referências

- [1] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, *The Optical Clearing Method - A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*, vol. 20, no. 5. Springer International Publishing, 2019.
- [2] V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*, 2nd ed. SPIE Press, 2007.
- [3] V. V. Tuchin, *Optical Clearing of Tissues and Blood*. SPIE Press, 2006.
- [4] V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, *Handbook of tissue optical clearing: new prospects in optical imaging*. CRC Press, 2022.
- [5] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, "Tissue optical immersion clearing," *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 7, no. 6, pp. 825–842, 2010, doi: 10.1586/erd.10.50.
- [6] T. Yu, J. Zhu, D. Li, and D. Zhu, "Physical and chemical mechanisms of tissue optical clearing," *iScience*, vol. 24, no. 3, pp. 1–21, 2021, doi: 10.1016/j.isci.2021.102178.
- [7] D. S. Richardson and J. W. Lichtman, "Clarifying Tissue Clearing," *Cell*, vol. 162, no. 2, pp. 246–257, Jul. 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.06.067.
- [8] L. M. Oliveira, K. I. Zaytsev, and V. V. Tuchin, "Improved biomedical imaging over a wide spectral range from UV to THz towards multimodality," *Proc. SPIE*, vol. 11585, pp. 12–26, Oct. 2020, doi: 10.1117/12.2584999.
- [9] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, A. Selifonov, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, "Enhanced Ultraviolet Spectroscopy by Optical Clearing for Biomedical Applications," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 27, no. 4, pp. 1–5, 2021, doi: 10.1109/JSTQE.2020.3012350.
- [10] O. A. Smolyanskaya *et al.*, "Tissue optical clearing in the terahertz range," in *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*, Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2022, pp. 445–458.
- [11] N. M. Gomes, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, "Refractive Index Matching Efficiency in Colorectal Mucosa Treated With Glycerol," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 27, no. 4, pp. 1–8, 2021, doi: 10.1109/JSTQE.2021.3050208.
- [12] A. A. Gavdush *et al.*, "Terahertz dielectric spectroscopy of human brain gliomas and intact tissues ex vivo: double-Debye and double-overdamped-oscillator models of dielectric response," *Biomed. Opt. Express*, vol. 12, no. 1, pp. 69–83, Jan. 2021, doi: 10.1364/BOE.411025.
- [13] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. Tuchin, "Moving tissue spectral window to the deep-ultraviolet via optical clearing," *J. Biophotonics*, vol. 12, no. 12, pp. 1–6, 2019, doi: 10.1002/jbio.201900181.
- [14] Y. Zhou, J. Yao, and L. V. Wang, "Tutorial on photoacoustic tomography," *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 6, p. 061007, Apr. 2016, doi: 10.1117/1.JBO.21.6.061007.

- [15] V. V Tuchin and L. M. Oliveira, “Recent progress in tissue enhanced spectroscopy for cancer detection,” *Asian J. Phys.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–18, 2021, doi: 10.26537/R20019.
- [16] G. Nestler, “Traditional Chinese medicine,” *Med. Clin.*, vol. 86, no. 1, pp. 63–73, 2015, doi: 10.1016/S0025-7125(03)00072-5.
- [17] S. T. Yousuf Azeemi and S. M. Raza, “A critical analysis of chromotherapy and its scientific evolution,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2, no. 4, pp. 481–488, 2005, doi: 10.1093/ecam/neh137.
- [18] J. Popp, V. Tuchin, A. Chiou, and S. Heinemann, *Handbook of Biophotonics*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.
- [19] B. Splinter and R. Hooper, *An Introduction to Biomedical Optics*. Taylor & Francis, 2006.
- [20] T. Vo-Dinh, *Biomedical Photonics Handbook : Biomedical Diagnostics.*, 2nd ed., vol. 2. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2015.
- [21] D. Huang *et al.*, “Optical Coherence Tomography,” *Science (80-. )*, vol. 254, no. 5035, pp. 1178–1181, Nov. 1991, doi: 10.1126/SCIENCE.1957169.
- [22] P. J. Withers *et al.*, “X-ray computed tomography,” *Nat. Rev. Methods Prim.* 2021 11, vol. 1, no. 1, pp. 1–21, Feb. 2021, doi: 10.1038/s43586-021-00015-4.
- [23] L. S. Politi, E. Salsano, and M. Grimaldi, “Magnetic Resonance Imaging Alteration of the Brain in a Patient With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Anosmia,” *JAMA Neurol.*, vol. 77, no. 8, pp. 1028–1029, 2020, doi: 10.1001/jamaneurol.2020.2125.
- [24] W. Jiang, Y. Chalich, and M. J. Deen, “Sensors for Positron Emission Tomography Applications,” *Sensors*, vol. 19, no. 22, 2019, doi: 10.3390/s19225019.
- [25] K. Christensen-Jeffries *et al.*, “Super-resolution Ultrasound Imaging,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 46, no. 4, pp. 865–891, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.11.013>.
- [26] L. Arms *et al.*, “Considerations for using optical clearing techniques for 3D imaging of nanoparticle biodistribution,” *Int. J. Pharm.*, vol. 588, p. 119739, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119739>.
- [27] P. A. Oakley and D. E. Harrison, “Death of the ALARA Radiation Protection Principle as Used in the Medical Sector,” *Dose-Response*, vol. 18, no. 2, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1177/1559325820921641.
- [28] B. Yang *et al.*, “DaXi—high-resolution, large imaging volume and multi-view single-objective light-sheet microscopy,” *Nat. Methods*, vol. 19, no. 4, pp. 461–469, 2022, doi: 10.1038/s41592-022-01417-2.
- [29] N. Akbari, M. R. Rebec, F. Xia, and C. Xu, “Imaging deeper than the transport mean free path with multiphoton microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 13, no. 1, p. 452, 2022, doi: 10.1364/boe.444696.
- [30] I. M. Bakken *et al.*, “The use of in vivo confocal microscopy in fungal keratitis – Progress and challenges,” *Ocul. Surf.*, vol. 24, pp. 103–118, 2022, doi:

- <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2022.03.002>.
- [31] X.-Y. Liu, S. Guo, T. Bocklitz, P. Rösch, J. Popp, and H.-Q. Yu, “Nondestructive 3D imaging and quantification of hydrated biofilm matrix by confocal Raman microscopy coupled with non-negative matrix factorization,” *Water Res.*, vol. 210, p. 117973, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117973>.
- [32] C. Wang *et al.*, “Epidural anesthesia needle guidance by forward-view endoscopic optical coherence tomography and deep learning,” *Sci. Reports 2022 121*, vol. 12, no. 1, pp. 1–13, May 2022, doi: [10.1038/s41598-022-12950-7](https://doi.org/10.1038/s41598-022-12950-7).
- [33] X. ke Wang, J. sheng Ye, W. feng Sun, P. Han, L. Hou, and Y. Zhang, “Terahertz near-field microscopy based on an air-plasma dynamic aperture,” *Light Sci. Appl. 2022 111*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2022, doi: [10.1038/s41377-022-00822-8](https://doi.org/10.1038/s41377-022-00822-8).
- [34] C. Liu and L. Wang, “Functional photoacoustic microscopy of hemodynamics: a review,” *Biomed. Eng. Lett.*, vol. 12, no. 2, pp. 97–124, 2022, doi: [10.1007/s13534-022-00220-4](https://doi.org/10.1007/s13534-022-00220-4).
- [35] K. Brittain, M. Harvey, R. Cisek, S. Pillai, S. D. Christie, and D. Tokarz, “Second harmonic generation microscopy of otoconia,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 13, no. 6, p. 3593, 2022, doi: [10.1364/boe.457967](https://doi.org/10.1364/boe.457967).
- [36] W. Spalteholz, *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang: Über Knochenfärbung*. S. Hirzel, 1911.
- [37] W. Spalteholz, *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang: Über Knochenfärbung*. S. Hirzel, 1914.
- [38] R. W. Cumley, J. F. Crow, and A. B. Griffen, “Clearing specimens for the demonstration of bone,” *Biotech. Histochem.*, vol. 14, no. 1, pp. 7–11, 1939, doi: [10.3109/10520293909110285](https://doi.org/10.3109/10520293909110285).
- [39] A. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, and B. J. Tromberg, “Reversible Dissociation of Collagen in Tissues,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 121, no. 6, pp. 1332–1335, 2003, doi: [10.1046/j.1523-1747.2003.12634.x](https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12634.x).
- [40] V. V. Tuchin, “Coherent optical techniques for the analysis of tissue structure and dynamics,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 4, no. 1, pp. 106–124, Jan. 1999, doi: [10.1117/1.429926](https://doi.org/10.1117/1.429926).
- [41] L. R. Oliveira, R. M. Ferreira, M. R. Pinheiro, H. F. Silva, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, “Broadband spectral verification of optical clearing reversibility in lung tissue,” *J. Biophotonics*, p. e202200185, Aug. 2022, doi: [10.1002/JBIO.202200185](https://doi.org/10.1002/JBIO.202200185).
- [42] V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov, I. L. Kon, A. K. Mavlutov, and A. A. Mishin, “Light propagation in tissues with controlled optical properties,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 2, no. 4, pp. 401–417, Oct. 1997, doi: [10.1117/12.281502](https://doi.org/10.1117/12.281502).
- [43] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. M. Oliveira, and V. V. Tuchin, “A robust ex vivo method to evaluate the diffusion properties of agents in biological

- tissues,” *J. Biophotonics*, vol. 12, no. 4, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1002/jbio.201800333.
- [44] E. A. Genina, L. M. C. Oliveira, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Optical Clearing of Biological Tissues: Prospects of Application for Multimodal Malignancy Diagnostics,” *Multimodal Opt. Diagnostics Cancer*, pp. 107–131, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-44594-2\_2.
- [45] S. V Carvalho Nuno Gueiral Elisabete Nogueira Rui Henrique Luís Oliveira Valery Tuchin Sónia Carvalho *et al.*, “Glucose diffusion in colorectal mucosa—a comparative study between normal and cancer tissues,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, no. 9, p. 091506, Feb. 2017, doi: 10.1117/1.JBO.22.9.091506.
- [46] D. K. Tuchina *et al.*, “Ex vivo optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin,” *J. Biophotonics*, vol. 8, no. 4, pp. 332–346, Apr. 2015, doi: 10.1002/JBIO.201400138.
- [47] D. K. Tuchina *et al.*, “Study of glycerol diffusion in skin and myocardium ex vivo under the conditions of developing alloxan-induced diabetes,” *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 3, no. 2, p. 020302, Apr. 2017, doi: 10.18287/JBPE17.03.020302.
- [48] L. Oliveira, M. I. Carvalho, E. Nogueira, and V. V. Tuchin, “Optical clearing mechanisms characterization in muscle,” *J. Innov. Opt. Health Sci.*, vol. 9, no. 5, pp. 1–19, 2016, doi: 10.1142/S1793545816500358.
- [49] J. Hirshburg, B. Choi, J. S. Nelson, and A. T. Yeh, “Correlation between collagen solubility and skin optical clearing using sugars,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 39, no. 2, pp. 140–144, Feb. 2007, doi: 10.1002/LSM.20417.
- [50] J. Hirshburg, B. Choi, J. S. Nelson, A. T. Yeh, B. Beckman, and J. Letters, “Collagen solubility correlates with skin optical clearing,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 11, no. 4, p. 040501, Jul. 2006, doi: 10.1117/1.2220527.
- [51] G. D. Fasman, “Handbook of Biochemistry : Section A Proteins, Volume I,” in *Handbook of Biochemistry*, 1st ed., vol. 1, Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1976.
- [52] D. B. Wetlaufer, “Ultraviolet spectra Of Proteins and Amino Acids,” vol. 17, C. B. Anfinsen, K. Bailey, M. L. Anson, and J. T. Edsall, Eds. Academic Press, 1963, pp. 303–390.
- [53] A. Y. Sdobnov, M. E. Darvin, J. Schleusener, J. Lademann, and V. V Tuchin, “Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents—Quantitative analysis using confocal Raman microscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 12, no. 5, p. e201800283, 2019, doi: 10.1002/JBIO.201800283.
- [54] C. Choe, J. Lademann, and M. E. Darvin, “Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum in vivo,” *Analyst*, vol. 141, no. 22, pp. 6329–6337, 2016, doi: 10.1039/C6AN01717G.
- [55] S. Peña-Llopis and J. Brugarolas, “Simultaneous isolation of high-quality DNA, RNA, miRNA and proteins from tissues for genomic applications,” *Nat. Protoc.*,

- vol. 8, no. 11, pp. 2240–2255, 2013, doi: 10.1038/NPROT.2013.141.
- [56] E. N. Lazareva *et al.*, “Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range,” *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*. CRC Press, pp. 141–166, 2021, doi: 10.1201/9781003025252-8.
- [57] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, “Typical Optical Clearing Agents,” *The Optical Clearing Method – A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*, vol. 3. Springer, pp. 35–48, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-33055-2.
- [58] “Refractive index database.” <https://refractiveindex.info/> (accessed Jul. 27, 2022).
- [59] Z. Mao, D. Zhu, Y. Hu, X. Wen, and Z. Han, “Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin in vitro,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 2, p. 21104, 2008, doi: 10.1117/1.2892684.
- [60] J. Wang, N. Ma, R. Shi, Y. Zhang, T. Yu, and D. Zhu, “Sugar-induced skin optical clearing: From Molecular dynamics simulation to experimental demonstration,” *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 20, no. 2, p. 7101007, 2014, doi: 10.1109/JSTQE.2013.2289966.
- [61] A. V Liopo, R. Su, D. A. Tsyboulski, and A. A. Oraevsky, “Optical clearing of skin enhanced with hyaluronic acid for increased contrast of optoacoustic imaging,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 8, p. 81208, 2016, doi: 10.1117/1.JBO.21.8.081208.
- [62] H. F. Silva, I. S. Martins, A. A. Bogdanov, V. V Tuchin, and L. M. Oliveira, “Characterization of optical clearing mechanisms in muscle during treatment with glycerol and gadobutrol solutions,” *J. Biophotonics*, p. e202200205, 2022, doi: 10.1002/JBIO.202200205.
- [63] D. K. Tuchina *et al.*, “Magnetic resonance contrast agents in optical clearing: Prospects for multimodal tissue imaging,” *J. Biophotonics*, vol. 13, no. 11, p. e201960249, 2020, doi: 10.1002/JBIO.201960249.
- [64] “Sucrose,” *Pubchem*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sucrose> (accessed Jun. 17, 2022).
- [65] “Sugar Water Solutions - Viscosities,” *Engineering ToolBox*, 2014. [https://www.engineeringtoolbox.com/sugar-solutions-dynamic-viscosity-d\\_1895.html](https://www.engineeringtoolbox.com/sugar-solutions-dynamic-viscosity-d_1895.html) (accessed Sep. 15, 2022).
- [66] M. F. N. Abowei, A. Okewale, F. Agbogun, and F. Omoruwo, “Mathematical modeling of reversible bimolecular catalyzed transesterification reaction kinetics for PKO and methanol synthesis,” *Pet. Chem. Ind. Int.*, vol. 3, no. 1, pp. 28–36, 2020, [Online]. Available: [www.opastonline.com](http://www.opastonline.com).
- [67] Y. Tian, Y. Deng, W. Zhang, and W. Mu, “Sucrose isomers as alternative sweeteners: properties, production, and applications,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 103, no. 21–22, pp. 8677–8687, 2019, doi: 10.1007/s00253-019-10132-6.
- [68] A. Belay and G. Assefa, “Concentration, Wavelength and Temperature Dependent Refractive Index of Sugar Solutions and Methods of Determination Contents of Sugar in Soft Drink Beverages using Laser Lights,” *J. Lasers, Opt.*

- Photonics*, vol. 5, no. 2, pp. 1–5, 2018, doi: 10.4172/2469-410X.1000187.
- [69] M. Daimon and A. Masumura, “Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region,” *Appl. Opt.*, vol. 46, no. 18, pp. 3811–3820, 2007, doi: 10.1364/AO.46.003811.
- [70] K. V. Berezin *et al.*, “Optical Clearing of Biological Tissues with a Number of Disaccharides,” *Opt. Spectrosc.*, vol. 129, no. 7, pp. 763–769, 2021, doi: 10.1134/S0030400X21060035.
- [71] W. Feng, R. Shi, N. Ma, D. K. Tuchina, V. V. Tuchin, and D. Zhu, “Skin optical clearing potential of disaccharides,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 8, 2016, doi: 10.1117/1.JBO.21.8.081207.
- [72] S. M. Zaytsev *et al.*, “Impact of optical clearing on ex vivo human skin optical properties characterized by spatially resolved multimodal spectroscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 15, no. 1, p. e202100202, 2022, doi: 10.1002/JBIO.202100202.
- [73] K. Mukund and S. Subramaniam, “Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease,” *WIREs Syst. Biol. Med.*, vol. 12, no. 1, p. e1462, 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>.
- [74] A. Mayeuf-Louchart, B. Staels, and H. Duez, “Skeletal muscle functions around the clock,” *Diabetes, Obes. Metab.*, vol. 17, no. S1, pp. 39–46, 2015, doi: <https://doi.org/10.1111/dom.12517>.
- [75] K. Ahmad, S. Shaikh, S. S. Ahmad, E. J. Lee, and I. Choi, “Cross-Talk Between Extracellular Matrix and Skeletal Muscle: Implications for Myopathies,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00142.
- [76] X. Yan, M.-J. Zhu, M. V. Dodson, and M. Du, “Developmental Programming of Fetal Skeletal Muscle and Adipose Tissue Development,” *J Genomics*, vol. 1, pp. 29–38, 2013, doi: 10.7150/jgen.3930.
- [77] Y. Yin, “Biomechanical Principles on Force Generation and Control of Skeletal Muscle and Their Applications in Robotic Exoskeleton,” *CRC Press*, pp. 1–4, 2019.
- [78] J. E. Muscolino, “The muscular system manual: the skeletal muscles of the human body,” *Elsevier Heal. Sci.*, pp. 150–152, 2016.
- [79] W. Stenzel and B. Schoser, “Inherited and Acquired Muscle Weakness: A Moving Target for Diagnostic Muscle Biopsy,” *Neuropediatrics*, vol. 48, no. 4, pp. 226–232, 2017, doi: 10.1055/s-0037-1601859.
- [80] L. Simon, S. E. Jolley, and P. E. Molina, “Alcoholic Myopathy: Pathophysiologic Mechanisms and Clinical Implications,” *Alcohol Res.*, vol. 38, no. 2, pp. 208–213, 2017.
- [81] S. Walrand, “Nutrition and skeletal muscle,” *Acad. Press*, p. 6, 2018.
- [82] C. J. Davey, E. R. Vasiljevski, A. K. O’Donohue, S. C. Fleming, and A. Schindeler, “Analysis of muscle tissue in vivo using fiber-optic autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 26, no. 12, pp. 1–2, 2021, doi: 10.1117/1.jbo.26.12.125001.

- [83] Y. Jiang and K. Pu, “Molecular Probes for Autofluorescence-Free Optical Imaging,” *Chem. Rev.*, vol. 121, no. 21, pp. 13086–13088, 2021, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00506.
- [84] A. H. Hill and D. Fu, “Cellular Imaging Using Stimulated Raman Scattering Microscopy,” *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 15, pp. 9333–9342, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02095.
- [85] I. Costantini, R. Cicchi, L. Silvestri, F. Vanzi, and F. S. Pavone, “In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: review,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 10, no. 10, pp. 5251–5257, 2019, doi: 10.1364/boe.10.005251.
- [86] E. C. Costa, D. N. Silva, A. F. Moreira, and I. J. Correia, “Optical clearing methods: An overview of the techniques used for the imaging of 3D spheroids,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 116, no. 10, pp. 2742–2763, 2019, doi: 10.1002/bit.27105.
- [87] P. Wan, J. Zhu, J. Xu, Y. Li, T. Yu, and D. Zhu, “Evaluation of seven optical clearing methods in mouse brain,” *Neurophotonics*, vol. 5, no. 3, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1117/1.nph.5.3.035007.
- [88] “Refractive index of sucrose solutions,” *ChemBuddy*, 2011. <http://www.refractometer.pl/refraction-datasheet-sucrose> (accessed Jun. 15, 2022).
- [89] M. A. Y. Eid, G. E. L. Bahy, and A. Shabaka, “Spectroscopic Study of the Effect of Alpha Tocopherol on Erythrocytes Irradiated With Neutrons,” *Rom. J. Biophys.*, vol. 21, no. 4, pp. 303–316, 2011.
- [90] L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, and V. V. Tuchin, “Diffusion characteristics of ethylene glycol in skeletal muscle,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 20, no. 5, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1117/1.JBO.20.5.051019.
- [91] L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, and V. V. Tuchin, “The characteristic time of glucose diffusion measured for muscle tissue at optical clearing,” *Laser Phys.*, vol. 23, no. 7, pp. 1–5, 2013, doi: 10.1088/1054-660x/23/7/075606.