



# Caracterização das propriedades óticas do pâncreas e estudo da difusão da glicerina no seu interior

**INÊS SORAIA DIAS MARTINS**

Junho de 2021

# **Caracterização das propriedades óticas do pâncreas e estudo da difusão da glicerina no seu interior**

**Inês Soraia Dias Martins**

Engenheira Biomédica pelo Instituto Superior de Engenharia do Porto

“Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Engenharia do Porto para a obtenção  
de grau de Mestre em Engenharia Biomédica”

Orientador: Professor Luís Oliveira

Jun.2021

*“Não é o trabalho, mas o saber trabalhar, que é o segredo do êxito no trabalho. Saber trabalhar quer dizer: não fazer um esforço inútil, persistir no esforço até ao fim, e saber reconstruir uma orientação quando se verificou que ela era, ou se tornou, errada.”*

Fernando Pessoa

## **Agradecimentos**

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio incondicional que prestaram durante todo o meu percurso académico, sem eles nada disto seria possível.

Ao meu namorado, por ter estado sempre do meu lado, nos melhores e nos piores momentos, e por me encorajar sempre a dar mais e melhor.

Aos meus colegas de investigação, Hugo Silva e Ana Botelho, por todos os momentos e auxílios que me proporcionaram no decorrer deste projeto.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto, pelo acolhimento durante o meu percurso académico e por todas as memórias que nele vivi e que para sempre guardarei.

A todos os investigadores que integram o Centro de Investigação em Engenharia e Tecnologia Industrial, por toda a ajuda prestada.

Ao meu orientador, o professor Luís Oliveira, por todo o apoio, dedicação, empenho e confiança que envolveu e depositou em mim, durante todo o projeto de investigação. Estarei eternamente grata pelo ensinamento e motivação que me deu e pelo facto de me ter feito enveredar pela investigação em ótica médica, uma área pela qual tenho um gosto enorme.

A todos aqueles que, de uma forma direta ou indireta, marcaram todo o meu percurso académico, fazendo com que sejam muitas as vivências que dele levo.

Muito Obrigado.

## Resumo

O pâncreas é um órgão de elevada importância no organismo, uma vez que é ele que produz a insulina e impede assim o aparecimento da diabetes. O pâncreas tem variadas patologias associadas, sendo algumas de foro oncológico. Embora raros, os cânceros do pâncreas estão comumente associados a elevadas taxas de mortalidade, uma vez que são detetados tardiamente e não se conhecem terapêuticas eficazes na atualidade. No campo da ótica médica, os estudos com o pâncreas são também escassos, o que mostra a necessidade de se intensificar a investigação para se poderem desenvolver procedimentos óticos para o diagnóstico e o tratamento de patologias. Neste sentido, e utilizando pâncreas de coelho, o presente trabalho consistiu na realização de medições óticas, nomeadamente pela técnica de espectrofotometria, para a determinação das propriedades óticas dos tecidos do pâncreas e para avaliar as propriedades de difusão da glicerina no seu interior. O desenvolvimento de futuros procedimentos que usem a luz para diagnosticar e/ou tratar doenças do pâncreas apenas será possível com o conhecimento das propriedades óticas numa banda espectral larga, como a que estudamos, desde o ultravioleta até ao infravermelho (200 – 1000 nm). Neste estudo, o coeficiente de absorção permitiu identificar a presença de dois pigmentos nos tecidos estudados – a melanina e a lipofuscina, pigmentos que estão associados ao envelhecimento dos tecidos. O objetivo do estudo das propriedades de difusão da glicerina (e da água) no pâncreas foi de recolher dados para se otimizarem futuros tratamentos de transparência a aplicar ao pâncreas para otimizar procedimentos óticos de diagnóstico e de tratamento no seu interior. As propriedades estudadas caracterizam os mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração que criam os efeitos de transparência. Este estudo permitiu também avaliar o conteúdo de água móvel do pâncreas, até agora desconhecido, que se verificou semelhante ao de outros tecidos já estudados. Dado que os resultados obtidos são inovadores, espera-se que outros estudos, nomeadamente com tecidos patológicos do pâncreas, venham a seguir-se para que as tecnologias óticas possam ajudar no diagnóstico e no tratamento dessas doenças.

**Palavras-chave:** Tecido do pâncreas, índice de refração, reflexão interna total, dispersão do tecido, propriedades óticas, espectroscopia, transmitância total, transmitância colimada,

refletância total, coeficiente de espalhamento, coeficiente de absorção, detecção de pigmentos, transparência ótica, coeficiente de difusão, desidratação de tecidos, adaptação de índices de refração.



## **Abstract**

Pancreas is a highly important organ in human and animal physiology, due to the fact that it produces insulin and prevents the occurrence of diabetes. There are several pathologies associated with pancreas, some of them being oncologic. Although rare, the pancreas cancers are commonly associated with high death rates, since they are diagnosed at a later stage of development and also because no effective treatments are known today. Regarding biophotonics, the research with pancreas tissues is also scarce, meaning that new studies must be performed with the objective of developing new optical procedures to diagnose and treat pancreas pathologies. Bearing this in mind, and using rabbit pancreas, the present study consisted in performing optical measurements, namely with spectroscopy techniques, to determine the optical properties of the pancreas tissues and evaluate the diffusion properties of glycerol inside it. The development of future diagnostic/treatment procedures that use light will only be possible with the knowledge of pancreas' optical properties in a wide spectral range, like the one used in our studies, from the ultraviolet to the infrared (200 – 1000 nm). This study also allowed to identify the presence of two pigments in the pancreas – melanin and lipofuscin, pigments that are associated with the tissue ageing process. The objective of studying the diffusion properties of glycerol (and water) in pancreas was to retrieve data to optimize future optical clearing treatments that can be applied to enhance optical diagnostic/treatment procedures inside. The diffusion properties that were collected in our study characterize the dehydration and refractive index matching mechanisms of optical clearing. This study also allowed to evaluate the mobile water content in the pancreas, a value that was previously unknown and which was verified to be very similar to others already known for other tissues. Due to the innovative results obtained in the present work, we expect that further studies with pancreas, namely with pathological tissues, can be performed in the near future. Only that way, the optical technologies can be used in the development of noninvasive diagnostic or treatment procedures for pancreas diseases.

**Key words:** Pancreas tissue, refractive index, total internal reflection, tissue dispersion, optical properties, spectroscopy, total transmittance, collimated transmittance, total

reflectance, scattering coefficient, absorption coefficient, pigment detection, optical clearing, diffusion coefficient, tissue dehydration, refractive index matching.

# Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO .....	IV
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. PROBLEMÁTICA.....	3
1.2. MOTIVAÇÕES .....	4
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.4. ESTRUTURA DO DOCUMENTO .....	5
2. ESTADO DA ARTE .....	9
2.1. ÍNDICE DE REFRAÇÃO DE TECIDOS BIOLÓGICOS.....	9
2.2. PROPRIEDADES ÓTICAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS .....	10
2.3. DIFUSÃO DE AGENTES DE TRANSPARÊNCIA EM TECIDOS BIOLÓGICOS .....	12
3. MÉTODOS .....	15
3.1. ESTIMAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO .....	15
3.1.1. <i>Amostras de tecido</i> .....	15
3.1.2. <i>Lasers utilizados</i> .....	16
3.1.3. <i>Procedimento de medição</i> .....	16
3.1.4. <i>Cálculos para a obtenção do índice de refração</i> .....	18
3.2. ESTIMAÇÃO DAS PROPRIEDADES ÓTICAS.....	20
3.2.1. <i>Preparação das amostras</i> .....	20
3.2.2. <i>Procedimento de medição de espectros</i> .....	21
3.2.3. <i>Cálculos para a obtenção das propriedades óticas</i> .....	23
3.3. ESTIMAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE DIFUSÃO .....	26
3.3.1. <i>Procedimento experimental</i> .....	27
3.3.2. <i>Cálculos necessários</i> .....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31

4.1.	ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	31
4.2.	PROPRIEDADES ÓTICAS.....	35
4.3.	DIFUSÃO.....	45
5.	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	59

## Lista de Figuras

Figura 1: Pâncreas de coelho durante o processo de descongelamento.....	15
Figura 2: Configuração da montagem de reflexão interna total para medição do IR. ....	16
Figura 3: IR em função de $\lambda$ para o prisma de dispersão SCHOTT N-SF11. ....	17
Figura 4: Preparação do tecido do pâncreas para corte (a) e o corte já feito (b). 21	
Figura 5: Montagens experimentais para a medição dos espectros de: $T_t$ (a), $R_t$ (b) e $T_c$ (c).....	22
Figura 6: Fluxograma de cálculo para obtenção das propriedades óticas. ....	26
Figura 7: Curvas de refletância obtidas com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f).....	32
Figura 8: Curvas da primeira derivada da refletância para os estudos com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f). ....	33
Figura 9: Valores experimentais do IR do pâncreas: do estudo presente, do pâncreas suíno e do pâncreas humano. ....	34
Figura 10: Média e desvio padrão dos espectros de $T_t$ (a) e $R_t$ (b). ....	36
Figura 11: Média e desvio padrão de $\mu_a$ para o pâncreas.....	37
Figura 12: Dispersão do pâncreas calculada pelas relações K-K (azul escuro) e calculada pela equação de Cauchy (rosa) e medições de IR experimentais discretas (vermelho).....	38
Figura 13: Média e desvio padrão dos espectros de $T_c$ .....	39
Figura 14: Média e desvio padrão de $\mu_s$ (azul) e de $\mu'_s$ (roxo). ....	40
Figura 15: Média e desvio padrão de $g$ . ....	41
Figura 16: Média e desvio padrão da profundidade de penetração de luz no pâncreas. ....	42
Figura 17: Espectro de $\mu_a$ para a melanina (azul) e para a lipofuscina (laranja). 43	
Figura 18: Coeficientes de absorção do pâncreas (azul), dos pigmentos (rosa) e dos restantes componentes do pâncreas (vermelho). ....	44
Figura 19: Dependências temporais de $T_c$ para diferentes $\lambda$ s obtidos nos tratamentos de tecidos do pâncreas com soluções de glicerina nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f), 50% (g), 55% (h) e 60% (i).....	47

Figura 20: Dependências temporais de $T_c$ deslocadas para zero a $t=0s$ e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes $\lambda$ s obtidos nos tratamentos de tecidos do pâncreas com soluções de glicerina nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f), 50% (g), 55% (h) e 60% (i).....	50
Figura 21: Tempos de difusão da glicerina com diferentes osmolaridades.....	52
Figura 22: Variação da espessura das amostras de tecido do pâncreas em função do tempo para soluções de glicerina com concentrações de 40% e de 60%. ....	53

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores de $\theta_c$ obtidos a partir dos gráficos da Fig. 8. ....	33
Tabela 2: Valores de $n_{\text{tecido}}$ obtidos.....	33
Tabela 3: IR das soluções aquosas de glicerina preparadas. ....	45
Tabela 4: Valores experimentais do tempo de difusão para cada tratamento.....	51



## Lista de Abreviaturas

- $g$  – Anisotropia
- IR – Índice de refração
- IV – Infravermelho
- $R_t$  – Refletância total
- THz – Terahertz
- $T_c$  – Transmitância colimada
- $T_t$  – Transmitância total
- UV – Ultravioleta
- UA – Unidades arbitrárias

## Lista de símbolos

- $\mu_a$  – Coeficiente de absorção
- $D$  – Coeficiente de difusão
- $\mu_s$  – Coeficiente de espalhamento
- $\mu'_s$  – Coeficiente de espalhamento reduzido
- $\lambda$  – Comprimento de onda
- $\delta$  – Profundidade de penetração da luz
- $\tau$  – Tempo de difusão



## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO



---

# 1. Introdução

No âmbito da unidade curricular Tese, presente no Mestrado de Engenharia Biomédica do Instituto Superior de Engenharia do Porto, o presente trabalho de investigação foi realizado no Centro de Investigação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI) e teve como objetivo estudar as propriedades óticas de tecidos do pâncreas, bem como as propriedades de difusão da glicerina e da água nesses tecidos para caracterizar os mecanismos que criam efeitos de transparência.

O presente capítulo pretende fazer uma breve descrição da problemática associada ao estudo realizado, as principais motivações que levaram à sua realização, bem como os seus objetivos.

## 1.1. Problemática

O pâncreas é um órgão que desempenha um papel de extrema importância nas fisiologias humana e animal, uma vez que é responsável pela produção de insulina, que previne a ocorrência da diabetes [1]. O cancro do pâncreas, embora raro, tem vindo a apresentar um número crescente de casos ao longo dos anos [2]. Uma vez que existe uma falta significativa de procedimentos de diagnóstico e de tratamento, este tipo de cancro torna-se altamente letal. Apesar do esforço de inúmeros investigadores e cientistas em volta de novos métodos de tratamento desta patologia, os resultados têm sido decepcionantes [3].

O adenocarcinoma ductal pancreático, é o tipo de cancro que apresenta as neoplasias malignas mais letais, nos seres humanos, onde se observa uma elevada percentagem de doentes em fase avançada da doença e, conseqüentemente, uma esperança média de vida inferior a um ano, após diagnóstico [4]. No entanto, existem diversos tipos de cancro associados ao pâncreas, como os carcinomas de células acinares do pâncreas, o pancreatoblastoma, a neoplasia sólida pseudopapilar, o tumor neuroendócrino, o insulinoma, o gastrinoma, o vipoma, o glucagonoma, o somatostatina e o tumor neuroendócrino produtor de serotonina [5].

Assim, torna-se extremamente importante identificar possíveis fatores de risco, bem como a realização de um diagnóstico mais precoce, de forma a melhorar a sobrevivência global. Alguns destes fatores de risco já têm vindo a ser relatados, como o

caso da dilatação do canal pancreático, da pancreatite crônica, do cisto pancreático, da neoplasia intraductal da mucosa papilar e da deterioração da diabetes mellitus [6].

## **1.2.Motivações**

No campo da ótica médica, o pâncreas é um dos órgãos biológicos menos estudados, tendo sido este o principal fator motivacional que levou à realização da presente investigação. Dos poucos estudos óticos existentes sobre o pâncreas, existe um relativo a tratamentos de transparência ótica, que utiliza agulhas para uma aquisição de imagem em profundidade [7]. Um segundo estudo sugere o potencial da espectroscopia ótica de tecidos, de forma a caracterizar as neoplasias pré-cancerígenas humanas nos tecidos pancreáticos [8]. Por fim, um terceiro estudo mostrou espectros visíveis para a fluorescência medida e para coeficientes de absorção e de espalhamento reduzido estimados entre os 400 e 700 nm para tecidos pancreáticos humanos, normal, com adenocarcinoma e com pancreatite, para comparação [9]. O aperfeiçoamento de tais técnicas, bem como o desenvolvimento de novas abordagens óticas, seja por imagem ou por espectroscopia do pâncreas, com um particular interesse na detecção precoce do cancro, pode ser alcançado com a ajuda de tratamentos com transparência. No sentido de se desenvolverem tais abordagens é necessário começar por avaliar as propriedades óticas deste tecido para uma vasta gama espectral. Um outro estudo de interesse consiste na avaliação de parâmetros de difusão da água e de agentes de transparência no pâncreas, de forma a se poder caracterizar os mecanismos que regem os efeitos de transparência aplicados.

## **1.3.Objetivos**

A investigação descrita nesta dissertação, encontra-se relacionada com a área da ótica médica, visando estudar as propriedades óticas espectrais de tecidos do pâncreas e os mecanismos de criação de transparência neles criados com soluções de diferentes osmolaridades de glicerina. Desta forma, o presente trabalho consistiu em três partes:

1. Estimação das curvas de dispersão do pâncreas, através da medição do índice de refração deste tecido a diferentes comprimentos de onda (entre os 400 e os 850 nm);
2. Avaliação das propriedades óticas do tecido, numa gama espectral entre os 200 e os 1000 nm;

3. Estudo dos mecanismos de transparência, nomeadamente os mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração, em tecidos deste órgão, durante tratamentos com glicerina, de diferentes osmolaridades, através da determinação dos tempos e coeficientes de difusão da glicerina e da água.

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

O presente documento encontra-se dividido em 5 capítulos, sendo que o primeiro diz respeito a um enquadramento da problemática associada ao tema da investigação, bem como às motivações que levaram ao presente estudo, finalizando com os objetivos propostos para o mesmo. O segundo capítulo, designado por estado da arte, faz uma revisão dos métodos e de estudos anteriormente desenvolvidos, que estão relacionados com o trabalho realizado, nomeadamente para a obtenção do índice de refração, das propriedades óticas e das propriedades de difusão de químicos em tecidos. No capítulo 3 encontra-se descrita a metodologia utilizada na presente investigação, estando esta dividida por subtópicos relativos a cada fase da investigação realizada. Os resultados obtidos neste trabalho de investigação e respetiva discussão são apresentados no capítulo quarto, enquanto que no capítulo 5 se apresentam as conclusões, evidenciando a relevância dos resultados obtidos e fazendo perspetivas sobre futuros trabalhos a realizar.



## CAPÍTULO 2 – ESTADO DA ARTE



## 2. Estado da arte

### 2.1. Índice de refração de tecidos biológicos

De todas as propriedades óticas dos tecidos biológicos, o índice de refração (IR) é uma das mais importantes, uma vez que quantifica a velocidade de propagação da luz nos tecidos e variações locais do seu valor condicionam o espalhamento [10,11]. Dado que os tecidos biológicos tem uma constituição interna heterogénea, o conhecimento das distribuições espaciais do IR no interior é essencial para descrever o espalhamento [10,11] e para descrever a forma como a luz se propaga e interage com os componentes dos tecidos [12,13]. Este conhecimento é importante devido ao facto de existirem inúmeros métodos óticos que são utilizados para o diagnóstico e tratamento de patologias [14,15]. A determinação do IR não é realizada de igual forma para os diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético. Na gama dos terahertz (THz) o IR é medido diretamente dos tecidos e fluidos biológicos e dos agentes de transparência [16,17]. No entanto, na gama do ultravioleta (UV) ao infravermelho (IV), devem ser realizadas medições discretas para calcular a dispersão [18-21], ou em alternativa a dispersão do tecido pode ser calculada pelas relações de Kramers-Kronig a partir do coeficiente de absorção espectral ( $\mu_a(\lambda)$ ) [18,22,23].

No estudo de Dirckx et al. [24], foi criado um método baseado num microscópio confocal, que medindo o caminho ótico numa amostra de espessura conhecida permite calcular o IR. No entanto, este método não é adequado para a medição não invasiva de tecidos espessos, devido à necessidade de se medir a espessura física por métodos alternativos. A microscopia de interferência de luz espacial (SLIM) também foi proposta como método para medir o IR de tecidos biológicos [25]. Foram também introduzidas técnicas de tomografia ótica coerente (TOC) para medir os índices de refração [26,27]. Contudo, estes métodos utilizam sistemas bastante complexos e dispendiosos, tornando-os complicados, e a sua base teórica não é totalmente exata, tornando o valor medido sempre superior ao valor real [12].

Para comprimentos de onda discretos existem métodos, como os baseados em configurações de interferómetro ou de elipsómetro [28], que permitem a medição do IR de amostras biológicas. No entanto, os métodos mais comuns hoje em dia para medir o IR são os que utilizam refratómetros de vários comprimentos de onda, que fornecem melhor precisão [20], ou os que utilizam a reflexão interna total, que pode ser

implementada em qualquer laboratório de ótica e com um baixo custo [29]. Este último método apresenta uma configuração experimental simples e permite utilizar lasers com qualquer comprimento de onda desde o UV até ao IV.

O método da reflexão interna total foi apresentado por Li e Xie em 1996, como forma de medir o IR de tecidos biológicos [29] e, desde então, tem sido utilizado para este efeito, com o objetivo de estimar a dispersão de vários tecidos biológicos, tais como tecidos colorretais humanos [18,30,31], tecidos hepáticos humanos [21,32], tanto normais como patológicos, pele suína [33] e pele humana [34].

Em 2015, Deng *et al.* [35] apresentaram uma nova versão do método de reflexão interna total, que em vez de lasers e detetores óticos simples, utilizava uma lâmpada de xénon e um espectrofotómetro. A utilização destes equipamentos na montagem permite a aquisição do sinal ótico de forma contínua e imediata numa banda espectral larga desde o UV até ao IV [36]. Apesar da utilização de equipamentos algo mais dispendiosos e da necessidade de automatizar o processo de cálculo do IR, esta versão da técnica de reflexão interna total consiste numa forma mais rápida para a obtenção da dispersão de materiais biológicos.

No que diz respeito aos tecidos do pâncreas existem apenas dois estudos publicados relativos à medição do IR. O primeiro apresenta o valor deste parâmetro a 632,8 nm para o pâncreas suíno, a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  [37] e o segundo apresenta a dispersão, sendo que esta foi calculada para tecido pancreático humano, a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , entre os 450 e os 1550 nm [38].

## **2.2. Propriedades óticas de tecidos biológicos**

Apesar de o IR ter a sua importância e até permitir identificar patologias, é igualmente importante estimar as restantes propriedades óticas que caracterizam um determinado tecido, sendo que as fundamentais, além do IR, são o coeficiente de absorção ( $\mu_a$ ), o coeficiente de espalhamento ( $\mu_s$ ) e a anisotropia ( $g$ ) [25,39,40]. Considerando um feixe a propagar-se dentro de um tecido,  $\mu_a$  quantifica o número de fótons absorvidos por unidade de comprimento,  $\mu_s$  quantifica o número de fótons espalhados por unidade de comprimento e  $g$  representa uma média da direccionalidade dos fótons após um evento de espalhamento [11,14]. Estas propriedades são também dependentes do comprimento de onda ( $\lambda$ ), sabendo-se que  $\mu_s$  apresenta um comportamento exponencial decrescente com o aumento de  $\lambda$ , enquanto que  $g$  tem uma tendência exponencial crescente com o

aumento de  $\lambda$  [41]. No caso de  $\mu_a$  e devido a que contém várias bandas de absorção entre o UV e o IV, não existe uma dependência uniforme e suave com  $\lambda$ .

A estimação destas propriedades pode ser realizada através de simulações inversas [18], ou de medições por TOC ou por microscopia [42-44]. Obtendo-se essas propriedades em função de  $\lambda$  é possível caracterizar e quantificar as interações existentes nos tecidos, o que permite otimizar procedimentos de diagnóstico e tratamento [45,46]. A aplicação de luz, nestes procedimentos clínicos, tem vindo a ser altamente estudada ao longo dos anos e tem-se mostrado vantajosa [11,47,48], podendo ser feita a diferentes  $\lambda$ s, dentro de uma vasta gama espectral, que vai desde o UV ao THz [49].

Para estimar as propriedades óticas de um tecido por simulações inversas, é necessária a realização de certas medições experimentais a partir de amostras do tecido, de forma a serem usadas como entrada nas simulações. Habitualmente e para simulações inversas de Monte Carlo (IMC) ou para simulações inversas de Adding-Doubling (IAD) [14], são necessários o IR, a transmitância total ( $T_t$ ), a transmitância colimada ( $T_c$ ) e a refletância total ( $R_t$ ) do tecido em estudo [18]. Embora estas medições possam ser feitas para uma banda larga de  $\lambda$ s, as simulações pelos métodos de IMC e IAD são executadas para valores individuais de  $\lambda$ . Para cada  $\lambda$  dentro da banda que pretendemos realizar tais simulações, é necessário preparar um ficheiro de simulação com os valores das grandezas medidas experimentalmente, o que torna o processo moroso. No entanto, dada a grande fiabilidade dos códigos de IMC e de IAD disponíveis, nos últimos 30 anos foram realizados vários estudos para determinar as propriedades óticas de diferentes tecidos biológicos. Exemplos disto são os estudos apresentados para tecidos biológicos peritoneais [50], do cólon humano [51], de pele humana e tecidos da mucosa [52], tecido adiposo [53], ossos cranianos [54], mucosa do estômago [55], esclerótica humana [56], da mucosa colorretal normal e patológica [57], do músculo colorretal [58] e de fígado humano [19]. Todos estes estudos foram realizados considerando uma banda larga do espectro eletromagnético, tendo-se obtido a dependência em  $\lambda$  das propriedades óticas dos tecidos. O conhecimento dessas dependências em  $\lambda$  para as propriedades óticas é importante para se poderem criar modelos de propagação da luz a serem utilizados no desenvolvimento de procedimentos de diagnóstico e tratamento, não invasivos.

### **2.3. Difusão de agentes de transparência em tecidos biológicos**

A aplicação de tratamentos de transparência em cooperação com procedimentos óticos de diagnóstico e de tratamento permite por exemplo obter imagens de diagnóstico com maior contraste e resolução e realizar cirurgia laser a maior profundidade dentro dos tecidos [11]. Por outro lado, tais tratamentos podem ser também usados para adquirir nova informação de diagnóstico, como se verificou em certos trabalhos publicados recentemente para o cancro coloretal [59,60]. As mesmas metodologias podem também ser aplicadas para diagnóstico do cancro do pâncreas, permitindo a sua deteção numa fase precoce através de exames de rastreio. Para se poderem aplicar tais tratamentos nos tecidos do pâncreas de forma otimizada, é necessário conhecer as propriedades de difusão da água e dos agentes de transparência nesses tecidos, pois são essas propriedades que caracterizam os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs que governam a transparência criada [61].

Os tratamentos de transparência em tecidos biológicos têm sido aplicados de forma intuitiva pelo Homem desde a antiguidade. São disso exemplo, a desidratação e o branqueamento de peles de animais e de intestinos de foca por parte dos povos do norte da Europa para construir as paredes e janelas dos seus tipis [11]. No entanto, as primeiras publicações científicas sobre tratamentos de transparência foram feitas por um anatomista Alemão, de nome Werner Spalteholz, em 1911 e 1914 [62,63]. Nestas publicações, Spalteholz indicou pela primeira vez o mecanismo de adaptação de IRs entre os fluídos intersticiais e os restantes componentes de tecido muscular para justificar o aumento de transparência observado. O mecanismo de desidratação foi apenas apresentado em 1939 como um mecanismo de transparência [64]. Na altura em que estas publicações surgiram (1911 a 1939), o interesse clínico da aplicação de tratamentos de transparência não era relevante, pois não existia tecnologia de ótica médica desenvolvida que deles pudesse beneficiar.

Com o surgimento no final do séc. XX, de novos equipamentos óticos com potencial aplicação em procedimentos clínicos, como os lasers e as fibras óticas, o interesse nos tratamentos de transparência voltou a surgir. Novos estudos dos tratamentos de transparência em tecidos começaram a ser realizados na década de 1990 e em 1997 surge um artigo de Valery Tuchin [65], em que se descreve a física do controlo das propriedades óticas de tecidos com a aplicação destes tratamentos. Esta publicação foi a precursora para uma nova área de investigação que se tem difundido a nível mundial.

Novos estudos têm sido realizados com estes tratamentos em diferentes tecidos [11], onde se mostra como ocorre a adaptação de IRs dentro dos tecidos [66], o mecanismo de desidratação [61], ou a variação das propriedades do tecido ao longo dos tratamentos [67,68]. Para que esta técnica tivesse uma aplicação clínica mais eficaz, de forma a realizar diagnósticos e tratamentos não invasivos, com recurso à luz, foi necessário proceder a uma reformulação do mecanismo de adaptação de IRs no interior dos tecidos, tendo-se verificado uma melhoria na profundidade de penetração da luz nestes e, também, uma redução do espalhamento [11,69-71]. O recorrente estudo nesta área permitiu descobrir um novo mecanismo de transparência, a dissociação de proteínas [72], bem como um fator de grande importância, comum entre os três mecanismos de transparência, a reversibilidade, que pode ocorrer de forma natural ou assistida, *in vivo* e *in vitro*, respetivamente [11].

Um fator com grande interesse para a aplicação de tratamentos de transparência, é a determinação e avaliação da dispersão de um tecido e dos seus componentes. Para criar a transparência dos tecidos biológicos, é necessário a utilização dos chamados agentes de transparência, que podem ser classificados em três grupos: os açúcares, como a glucose, os álcoois, como a glicerina, e os agentes de contraste radiológico, como o Hypaque<sup>TM</sup> [11]. Uma vez que estes agentes são hiperosmóticos, originam uma elevada pressão osmótica no tecido, levando à desidratação do mesmo por fluxo induzido da água intersticial e intracelular para o exterior do tecido [61]. Em consequência, o agente de transparência difunde-se para o interior do tecido, posicionando-se no espaço intersticial ou intracelular anteriormente ocupado pelas moléculas de água, originando um crescimento do IR desses fluídos, tornando-o mais próximo do IR dos restantes componentes do tecido, o que leva a uma diminuição do espalhamento da luz e um aumento da transparência do tecido [11,66]. Perante este processo, torna-se importante conhecer a dispersão dos tecidos e dos seus variados componentes em estado natural para quantificar as variações induzidas pelo tratamento [66,73].

A glicerina é um conhecido agente de transparência, que apresenta um elevado IR, uma elevada osmolaridade e é de fácil diluição em água. Por outro lado, a glicerina não apresenta bandas de absorção desde o UV até ao IV, características que lhe permitem criar efeitos de transparência de elevada magnitude em diferentes tecidos [11,59]. Estudos destes tratamentos com glicerina foram já realizados em tecidos como o músculo esquelético [61], tecidos gengivais [59] e colorretais normais e patológicos [74], entre

outros. As características da glicerina fazem com que seja o agente de transparência de eleição para a realização dos primeiros estudos de transparência em tecidos do pâncreas.

## CAPÍTULO 3 - MÉTODOS

### **3. Métodos**

Dada a diversidade de técnicas de investigação e cálculos que fizeram parte do presente trabalho, torna-se necessário descrever em detalhe cada um dos métodos de medição e respetivos procedimentos em separado. Assim, na secção 3.1 serão descritos os métodos de medição e cálculos necessários à estimação do IR do pâncreas, na secção 3.2 serão descritos os estudos experimentais e cálculos para obter as suas restantes propriedades óticas e na secção 3.3 serão descritos os estudos para estimação das propriedades de difusão da água e da glicerina nestes tecidos.

#### **3.1. Estimação do índice de refração**

De forma a medir o IR do pâncreas, a diferentes comprimentos de onda, e calcular a sua dispersão, foi utilizado o método de reflexão interna total [30,31].

##### **3.1.1. Amostras de tecido**

Foram utilizados pâncreas de três coelhos, tendo estes sido congelados durante um período de 24 horas. A Fig. 1 mostra um desses pâncreas.

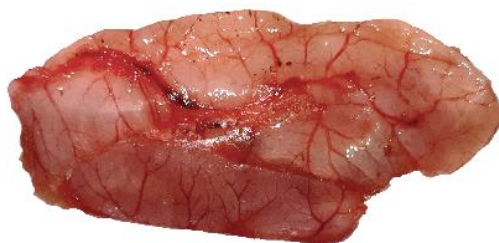


Figura 1: Pâncreas de coelho durante o processo de descongelamento.

Uma amostra de tecido com dimensões aproximadas de  $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 3\text{ mm}$  foi retirada de cada um dos três pâncreas, enquanto estes ainda estavam congelados. Todas as amostras foram preparadas com uma espessura aproximada de 3 mm, com uma das superfícies completamente plana e uniforme para aderir corretamente à superfície do prisma, sem a criação de bolhas de ar. Estas amostras foram mantidas em soro fisiológico durante 10 minutos e, posteriormente, foram limpas, de forma a remover restos exteriores do soro.

### 3.1.2. Lasers utilizados

Para cada amostra, foram realizadas medições com diferentes lasers, em comprimentos de onda discretos, na gama do visível e do infravermelho, com valores de 401.4, 534.6, 626.6, 782.1, 820.8 e 850.7 nm, tendo estes sido verificados com o recurso a um espectrómetro da marca Avantes<sup>TM</sup> (Holanda). Todos os lasers, com a exceção dos que emitem a 534.6 e a 626.6 nm são lasers díodo comprados à Edmund Optics. O laser com emissão a 534.6 nm é da marca Kvant (Eslováquia) e o que emite a 626.6 nm é da marca PASCO (EUA). Todos os lasers apresentam uma potência máxima de emissão na ordem dos 5 mW.

### 3.1.3. Procedimento de medição

Em cada medição do IR do pâncreas, com um determinado laser, foi adotado o seguinte procedimento. A amostra de tecido foi colocada em contacto com a base do prisma, tendo em conta a configuração da reflexão interna total representada na Fig. 2.

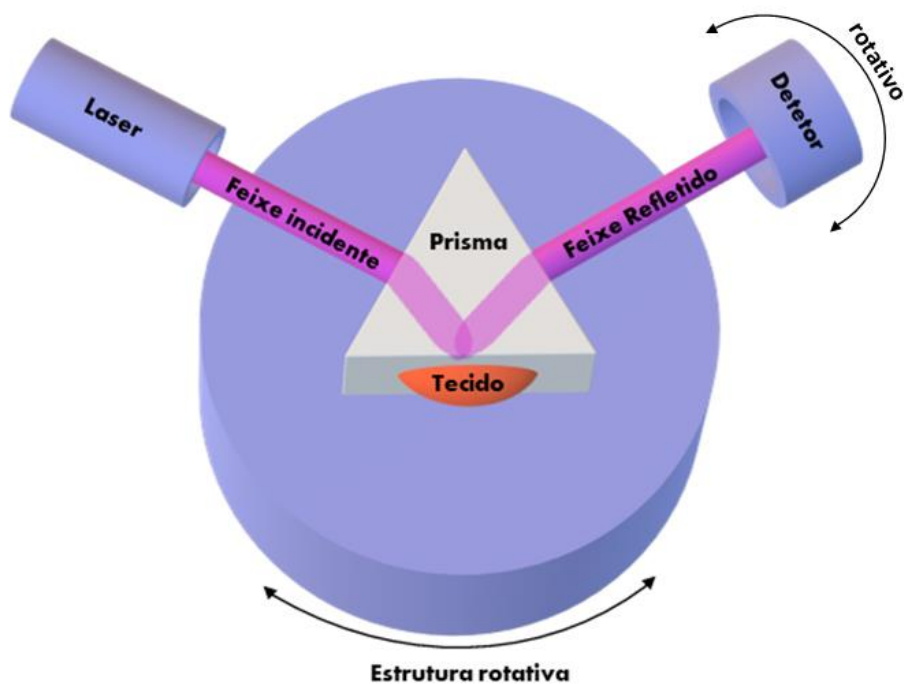


Figura 2: Configuração da montagem de reflexão interna total para medição do IR.

O prisma utilizado nesta montagem foi adquirido à Edmund Optics e é feito de vidro SCHOTT N-SF11, que apresenta uma dispersão como a que está representada na Fig. 3 [75].

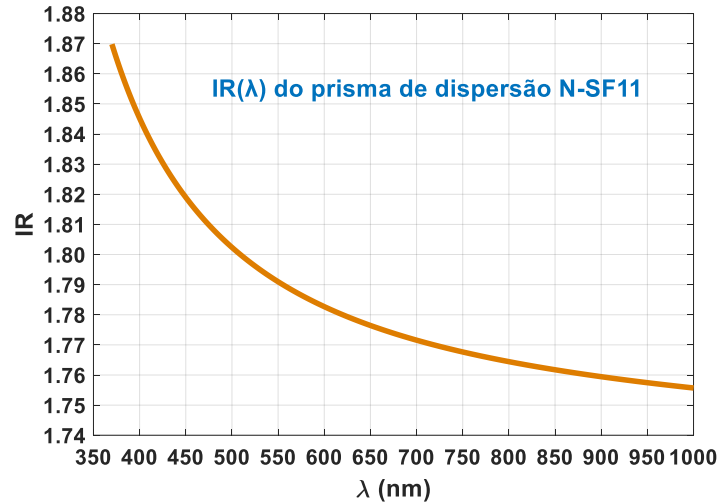


Figura 3: IR em função de  $\lambda$  para o prisma de dispersão SCHOTT N-SF11.

A curva representada na Fig. 3 é descrita pela equação de Sellmeier [75], a 20 °C:

$$n^2 - 1 = \frac{K_1 \lambda^2}{\lambda^2 - L_1} + \frac{K_2 \lambda^2}{\lambda^2 - L_2} + \frac{K_3 \lambda^2}{\lambda^2 - L_3}, \quad (1)$$

em que os coeficientes de Sellmeier tomam os seguintes valores para o vidro N-SF11:  $K_1=1.7376$ ,  $K_2=0.3137$ ,  $K_3=1.8988$ ,  $L_1=0.0132$ ,  $L_2=0.0623$  e  $L_3=155.2363$ . De acordo com a Ref. [75], uma vez que  $\lambda$  é representado em  $\mu\text{m}$  na Eq. (1),  $K_1$ ,  $K_2$  e  $K_3$  são coeficientes sem dimensões, enquanto que  $L_1$ ,  $L_2$  e  $L_3$  são representados em  $\mu\text{m}^2$ .

Considerando a montagem experimental representada na Fig. 2, o feixe proveniente do laser entra no prisma através de uma das suas faces onde, por refração, é redirecionado para a interface prisma/tecido. Nessa interface ocorre reflexão interna total e o feixe refletido sai do prisma pela terceira face, onde se encontra um detetor ligado a um voltímetro, de forma a fazer a recolha e o registo do sinal. O detetor é um sensor de potência ótica da Coherent (EUA) com banda de aquisição de 0.5 a 11  $\mu\text{m}$  e o voltímetro é da marca Wavetek Meterman (França).

Uma vez que o prisma foi colocado sobre uma base rotativa, foi possível variar o ângulo de incidência do feixe proveniente do laser para se medir a luz refletida a diferentes ângulos de incidência. Esta variação do ângulo de incidência induz uma rotação idêntica do feixe refletido, o que obriga a rodar também o detetor, para que fique perfeitamente alinhado com o feixe refletido e detete corretamente a intensidade de luz que sai da montagem.

Usando esta montagem foram realizados três conjuntos de medições com cada laser – um conjunto por amostra de tecido. Em cada estudo a temperatura foi mantida constante a 20 °C, e o procedimento realizado foi o seguinte:

1. Colocação da amostra em contacto com a base do prisma.
2. Iluminação da configuração, com o feixe laser, através de um dos lados do prisma.
3. Leitura do potencial elétrico, através de um voltímetro, do feixe refletido, recolhido com o detetor ótico.
4. Repetição do procedimento para diferentes ângulos de incidência, entre o feixe laser incidente e a normal à interface ar/prisma. A resolução angular para estas medições foi de 1°.

Após a recolha dos dados, os mesmos foram submetidos a cálculos, de forma a obter o IR do pâncreas, nos comprimentos de onda dos lasers utilizados.

#### **3.1.4. Cálculos para a obtenção do índice de refração**

Uma vez que os ângulos incidente e refletido, apenas podem ser medidos fora do prisma, nas interfaces prisma/ar, foi utilizada a equação de Snell-Descartes, representada na Eq. (2), de forma a converter o ângulo do feixe incidente (ou refletido), medido fora do prisma ( $\alpha$ ), para o ângulo incidente (ou refletido) na interface prisma/tecido ( $\theta$ ) [76]:

$$\theta = \beta - \arcsin \left[ \frac{1}{n_{\text{prisma}}} \times \sin (\alpha) \right], \quad (2)$$

onde  $\beta$  representa o ângulo interno do prisma (60° no prisma que utilizamos) e  $n_{\text{prisma}}$  o índice de refração do mesmo, para o  $\lambda$  do laser em uso (ver Fig. 3).

Tendo em conta as medições do potencial elétrico e os ângulos correspondentes, na interface prisma/tecido, foi calculada a curva de refletância da seguinte forma [32]:

$$R(\theta) = \frac{V(\theta) - V_{\text{ruído}}}{V_{\text{laser}} - V_{\text{ruído}}}, \quad (3)$$

com o potencial medido no ângulo  $\theta$  representado por  $V(\theta)$ , o potencial medido com a luz de fundo (ruído) representado por  $V_{\text{ruído}}$  e o potencial medido diretamente a partir do laser representado por  $V_{\text{laser}}$ .

Estando calculada a curva de refletância, torna-se necessário determinar o ângulo crítico de reflexão ( $\theta_c$ ), a partir da mesma. Para tal, fez-se o cálculo da primeira derivada, a partir da seguinte expressão [77]:

$$\text{deriv}(\theta) = \frac{\text{Ref}(\theta_i) - \text{Ref}(\theta_{i-1})}{\theta_i - \theta_{i-1}}, \quad (4)$$

onde  $\theta_i$  e  $\theta_{i-1}$ , representam os ângulos consecutivos de medição e  $\text{Ref}(\theta_i)$  e  $\text{Ref}(\theta_{i-1})$  representam as refletâncias obtidas das medições a esses ângulos. Como foi já verificado em estudos anteriores [30,31], as derivas calculadas pela Eq. (4) apresentam um forte pico, que ocorre ao ângulo que corresponde  $\theta_c$  para esse estudo.

Usando o valor de  $\theta_c$  obtido para cada estudo na Eq. (5), calculou-se o IR do pâncreas ( $n_{\text{tecido}}$ ) para o  $\lambda$  correspondente ao laser usado [44]:

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = n_{\text{prisma}}(\lambda) \times \sin(\theta_c), \quad (5)$$

Uma vez que foram realizados três conjuntos de medições com cada laser, foram calculados os valores médios e o desvio padrão para o  $n_{\text{tecido}}$ , uma vez que proporcionam uma maior precisão dos resultados e permitem descrever o afastamento dos dados entre amostras [32,44].

Todo este procedimento de cálculo foi realizado para os vários conjuntos de medições obtidas com cada laser, de forma a que os valores médios de  $n_{\text{tecido}}$  para diferentes  $\lambda$ s possam ser ajustados com curvas adequadas, de forma a obter a dispersão do pâncreas. Estas curvas são habitualmente descritas pelas equações de Cauchy (Eq. (6)), de Conrady (Eq. (7)) e de Cornu (Eq. (8)) [32,44]:

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4}, \quad (6)$$

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda} + \frac{C}{\lambda^{3,5}}, \quad (7)$$

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = A + \frac{B}{(\lambda - C)}, \quad (8)$$

onde A, B e C representam os parâmetros de Cauchy, de Conrady ou de Cornu, que são obtidos durante o ajuste de cada curva aos dados experimentais.

Tais curvas foram posteriormente testadas, de forma a ajustar os dados experimentais de IR obtidos para o tecido em estudo, através da utilização da ferramenta de ajuste de curvas (CFTOOL) do MATLAB™.

### **3.2. Estimação das propriedades óticas**

Uma vez que a curva de dispersão, obtida pelo procedimento descrito no ponto 3.1, não apresenta as assinaturas espectrais do tecido, esta será apenas usada como referência para determinar uma dispersão mais realista para o pâncreas. Tal dispersão será obtida pelas relações de Kramers-Kronig, a partir de  $\mu_a(\lambda)$ , que será obtido das medições espectrais. Tal procedimento de cálculo encontra-se descrito na subsecção 3.2.3. Como a dispersão e as restantes propriedades óticas a obter irão resultar das medições de espetros, o seu cálculo irá resultar em propriedades que correspondem à mesma banda das medições espectrais – entre 200 e 1000 nm.

#### **3.2.1. Preparação das amostras**

As amostras de tecido, necessárias para o estudo das propriedades óticas e dos tratamentos, foram obtidas com recurso ao criostato da marca Leica, modelo CM1860, que se encontra no laboratório do CIETI. Para tal, é necessário colocar o pâncreas inteiro

numa das mesas de corte deste aparelho e esperar cerca de dez minutos para que este congele e fique fixo à mesa, como representado na Fig. 4(a). Após o pâncreas se encontrar devidamente congelado, procede-se aos cortes do mesmo. O equipamento permite definir uma espessura de corte entre 1 - 100  $\mu\text{m}$ . No entanto, o crióstato apresenta um sistema de avanços que permite obter cortes com espessuras superiores. Assim, calibrando a espessura de corte para 50  $\mu\text{m}$  e fazendo 10 avanços sem cortar, conseguem-se cortes de 500  $\mu\text{m}$  de espessura, como pretendido. Um aspeto a ter em consideração, diz respeito ao facto de serem necessários alguns cortes preliminares de forma a homogeneizar a superfície do tecido. Tais cortes são feitos inicialmente com espessuras calibradas em 10  $\mu\text{m}$  para evitar desperdício do tecido. Após o corte ser feito, o mesmo é colocado numa lamela, com soro fisiológico durante 10 minutos, como representado na Fig. 4(b), para que possa estar pronto a ser utilizado.

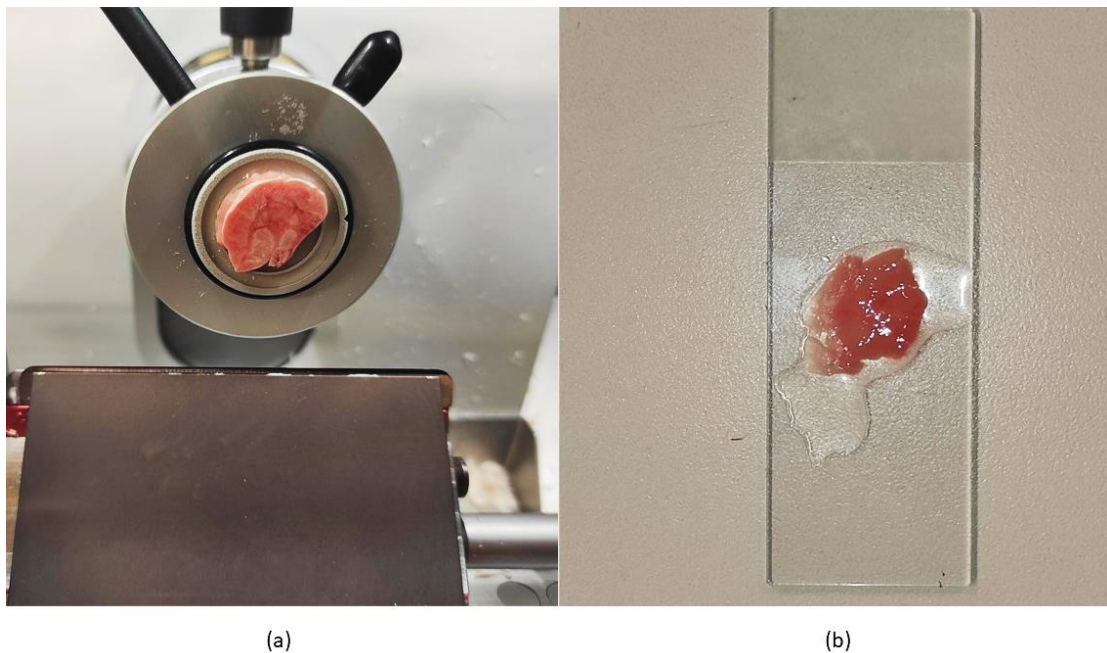


Figura 4: Preparação do tecido do pâncreas para corte (a) e o corte já feito (b).

### 3.2.2. Procedimento de medição de espetros

De forma a obter os espetros de  $T_t$ , de  $R_t$  e de  $T_c$  do tecido em estado natural, entre os 200 e os 1000 nm, foram utilizadas 10 amostras de tecido do pâncreas. Estas 10 amostras foram usadas em cada tipo de montagem experimental para adquirir os três tipos de espetro. Tais montagens experimentais encontram-se representadas na Fig. 5.

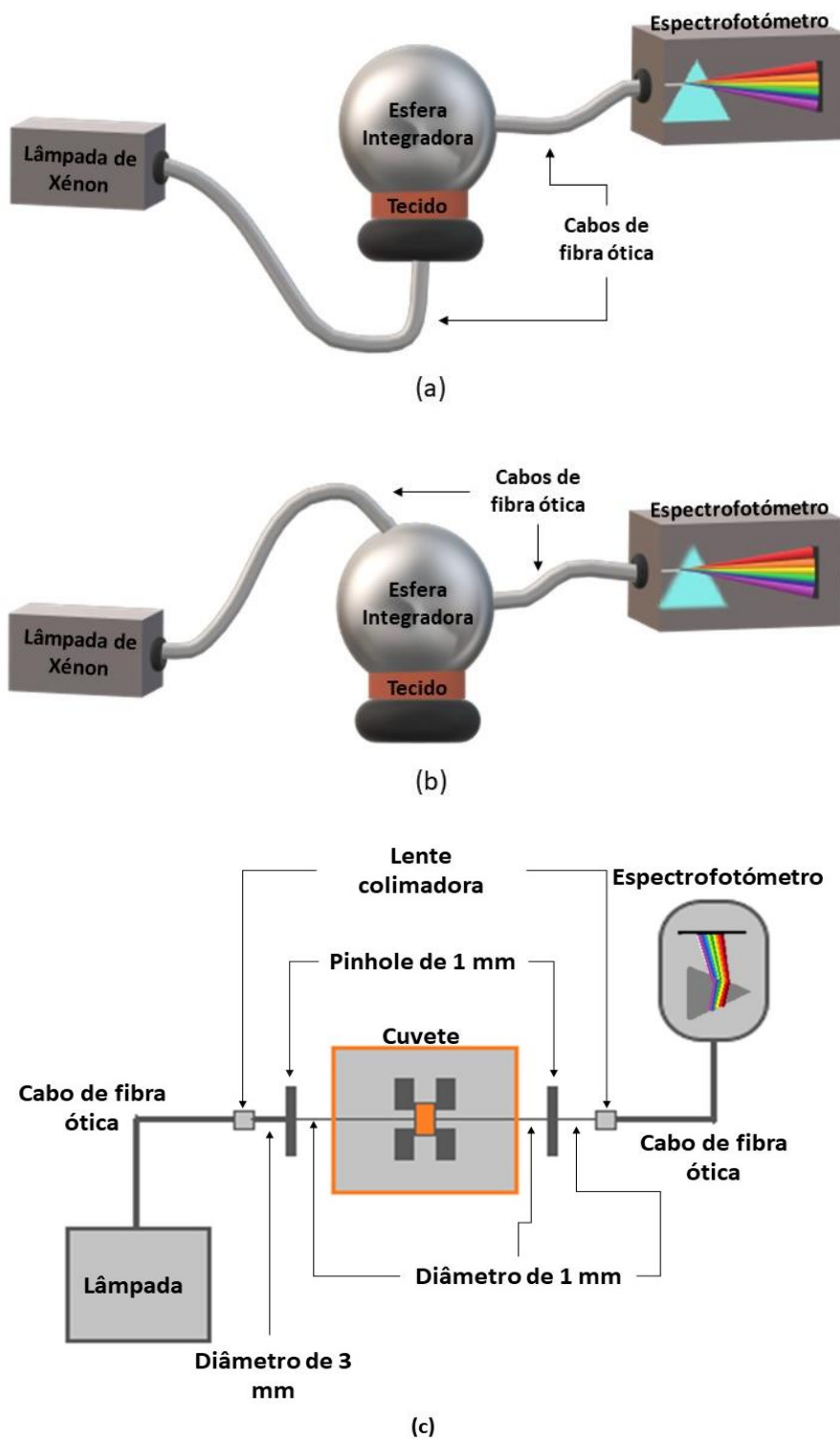


Figura 5: Montagens experimentais para a medição dos espectros de:  $T_t$  (a),  $R_t$  (b) e  $T_c$  (c).

Tendo em conta a configuração de  $T_t$  (Fig. 5(a)), foi utilizada uma lâmpada de xénon pulsada de banda larga para iluminar a amostra. O feixe de luz atravessa uma fibra

ótica e uma lente colimadora, que se encontra por baixo do tecido, limitando o diâmetro do feixe luminoso a 6 mm, antes de chegar à amostra. A luz que é transmitida pelo tecido entra na esfera integradora, onde sofre várias reflexões, antes de ser entregue ao espectrofotômetro por intermédio de outro cabo de fibra ótica. A configuração de  $R_t$  (Fig. 5(b)) utiliza os mesmos componentes óticos e a montagem que foram usados para medir os espectros de  $T_t$ . No entanto, nesta configuração de reflexão a iluminação da amostra de tecido é feita do mesmo lado de onde é recolhido o espectro de reflexão. O feixe proveniente da lâmpada de xénon é agora entregue pelo cabo de fibra ótica na parte de cima da esfera integradora, entrando nesta com um ângulo de  $8^\circ$  com a normal ao tecido.

Considerando a montagem para medir os espectros de  $T_c$  (ver Fig. 5(c)), a luz proveniente de uma lâmpada de deutério-halogénio passa por um cabo de fibra ótica e uma lente colimadora para formar um feixe de 3 mm de diâmetro. Antes de chegar à cuvette que contém a amostra de tecido, o feixe passa por um *pinhole* para reduzir o seu diâmetro para 1 mm. A cuvette tem no percurso do feixe duas janelas de vidro (UQG Optics, RU) com transmitância de 100% entre 170 e 2500 nm. O feixe colimado que atravessa a amostra passa por um outro *pinhole* para garantir que apenas a luz colimada de diâmetro 1 mm é coletada por outra lente e outro cabo de fibra ótica para enviar ao espectrofotômetro.

### 3.2.3. Cálculos para a obtenção das propriedades óticas

Deu-se início ao estudo experimental com a medição dos espectros de  $T_t$  e de  $R_t$  dos tecidos de pâncreas entre 200 e 1000 nm. Como foram medidos 10 espectros com cada montagem experimental, calculou-se a absorvância ( $A_b$ ) de cada amostra de tecido com a Eq. (9) para se obterem dados estatísticos [18]:

$$A_b(\lambda) = 1 - \left( \frac{T_t(\lambda) + R_t(\lambda)}{100} \right). \quad (9)$$

Para se obterem os espectros de  $\mu_a$  para cada amostra de tecido, usaram-se os resultados obtidos com a Eq. (9) e a espessura das amostras ( $d=0.5$  mm) na Eq. (10) [18]:

$$\mu_a(\lambda) = \frac{A_b(\lambda)}{d}. \quad (10)$$

Assim encontra-se estimada a primeira propriedade ótica dos tecidos do pâncreas que, introduzida nas relações de Kramers-Kroning [18,22], permite obter a dispersão espectral real do tecido. A primeira fase deste cálculo consistiu na obtenção da parte imaginária do IR, a partir do espectro de  $\mu_a$  com a Eq. (11) [70]:

$$k(\lambda) = \frac{\lambda}{4\pi} \mu_a(\lambda), \quad (11)$$

que substituindo na Eq. (12) [18,22,23], permite calcular a dispersão real do tecido da seguinte forma:

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = 1 + \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\lambda_1}{\Lambda} \times \frac{\lambda_1}{\Lambda^2 - \lambda_1^2} k(\lambda) d\Lambda. \quad (12)$$

Nesta equação,  $\Lambda$  é a variável de integração no intervalo de comprimento de onda em estudo e  $\lambda_1$  é um comprimento de onda fixo, que pode ser ajustado, de forma a que a dispersão calculada esteja de acordo com a previamente obtida pelas medições com a montagem de reflexão interna total [18]. Este cálculo da dispersão dos tecidos foi realizado 10 vezes para se obterem resultados estatísticos.

Com o objetivo de se calcular o espectro de  $\mu_s$ , foram realizadas medições dos espectros de  $T_c$  com as mesmas amostras de tecido usadas nas medições de  $T_t$  e de  $R_t$ . Para cada espectro de  $T_c$  medido, calculou-se o espectro correspondente de  $\mu_s$  com a Lei de Bouguer-beer-Lambert (BBL) [11,14,18]:

$$\mu_s(\lambda) = -\frac{\ln\left[\frac{T_c(\lambda)}{100}\right]}{d} - \mu_a(\lambda), \quad (13)$$

onde  $\mu_a(\lambda)$  representa cada um dos espectros obtidos pela Eq. (10) e  $d$  representa a espessura das amostras. Cada um dos espectros obtidos neste cálculo foi ajustado com a Eq. (14) [41], uma vez que o espalhamento nos tecidos é uma combinação de espalhamentos de Rayleigh e de Mie:

$$\mu_s(\lambda) = a' \left( f_{\text{Ray}} \left( \frac{\lambda}{500(\text{nm})} \right)^{-4} + (1 - f_{\text{Ray}}) \left( \left( \frac{\lambda}{500(\text{nm})} \right)^{-b_{\text{Mie}}} \right) \right). \quad (14)$$

Nesta equação,  $a'$  representa o coeficiente de espalhamento do tecido a 500 nm,  $f_{\text{Ray}}$  representa a fração de espalhamento de Rayleigh e  $b_{\text{Mie}}$  é o tamanho médio das partículas que criam o espalhamento de Mie [18]. Estes parâmetros foram estimados para cada amostra de tecido durante o processo de ajuste dos espectros de  $\mu_s$  com a Eq. (14). Em todos os casos de ajuste foi obtido um  $R^2$  superior a 0.99. A partir dos 10 espectros de  $\mu_s$  foram calculados o espectro médio e o respetivo desvio padrão.

O passo seguinte consistiu na determinação do espectro do coeficiente de espalhamento reduzido ( $\mu'_s(\lambda)$ ). Para tal começaram por usar-se valores discretos de  $T_t$ , de  $R_t$  e de  $n_{\text{tecido}}$ , entre 200 e 1000 nm para realizar simulações de IAD [11,18]. Tais simulações foram realizadas a cada 50 nm entre o valor mínimo e o valor máximo da banda considerada no nosso estudo. Os valores recolhidos destas simulações foram ajustados com uma curva como descrito pela Eq. (14), visto que  $\mu'_s(\lambda)$  apresenta o mesmo tipo de dependência em  $\lambda$  que  $\mu_s(\lambda)$  [72]. Mais uma vez, para se obterem resultados estatísticos para  $\mu'_s(\lambda)$ , as simulações IAD e os consequentes ajustes com a Eq. (14) foram realizados 10 vezes.

Para se calcular a anisotropia, os espectros de  $\mu_s(\lambda)$  e de  $\mu'_s(\lambda)$  obtidos para cada uma das 10 amostras de tecido foram usados no cálculo realizado com a Eq. (15) [11,14,18]:

$$g(\lambda) = 1 - \frac{\mu'_s(\lambda)}{\mu_s(\lambda)}. \quad (15)$$

Para terminar a determinação das propriedades óticas espectrais dos tecidos do pâncreas, usou-se a Eq. (16) para calcular a profundidade de penetração da luz ( $\delta$ ) [18]:

$$\delta(\lambda) = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\lambda)(\mu_a(\lambda) + \mu'_s(\lambda))}}. \quad (16)$$

Este procedimento para a obtenção das propriedades óticas é bastante simples e rápido, recorrendo apenas a cálculos com espectros e a um número reduzido de simulações de IAD. De forma a esquematizar todo o procedimento para a obtenção das propriedades óticas do tecido do pâncreas, realizou-se o fluxograma que se encontra esquematizado na Fig. 6.

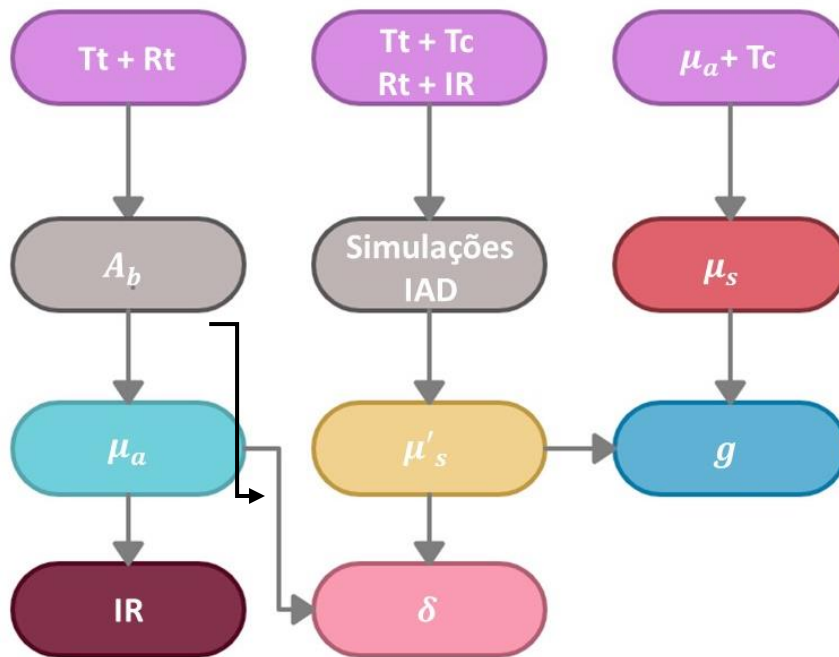


Figura 6: Fluxograma de cálculo para obtenção das propriedades óticas.

### 3.3. Estimação das propriedades de difusão

De forma a caracterizar os mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração nos tratamentos de transparência do pâncreas, foram realizados estudos em

que se mediu o espectro de  $T_c$  de tecidos durante tratamentos com soluções aquosas de glicerina com diferentes osmolaridades. Para se conseguirem essas soluções com osmolaridades distintas, foram preparadas soluções aquosas com concentrações de glicerina entre 20 e 60%, a cada 5%. Durante a preparação das soluções e como forma de controlo da concentração da glicerina em solução foi medido o IR da solução com um refratómetro de Abbe (KERN, modelo ORT-1) a 20°C para comparar com valores tabelados [78].

Para cada estudo com uma determinada solução foram realizados 3 conjuntos de medições para se obterem as variações temporais médias dos espectros de  $T_c$  dos tecidos. Estes estudos foram também realizados à temperatura constante de 20°C.

### **3.3.1. Procedimento experimental**

A configuração experimental utilizada para realizar as medições dos espectros de  $T_c$  necessários à estimação da difusão é a mesma que se encontra representada na Fig. 5(c). Em cada estudo começou-se por medir o espectro  $T_c$  referente ao tecido em estado natural, usando-o como referência para avaliar a evolução temporal ao longo do tratamento. Foram inseridos na cuvette da amostra 4 mL de solução para começar o tratamento e deu-se início ao registo dos espectros de  $T_c$ , que foram registados a cada segundo, durante 30 minutos. Este procedimento experimental foi adotado para todos os tratamentos realizados.

### **3.3.2. Cálculos necessários**

Considerando cada tratamento estudado, começou-se por calcular as variações temporais dos espectros de  $T_c$ . De seguida, seleccionaram-se  $\lambda$ s discretos entre 600 e 800 nm, uma banda onde o pâncreas não apresenta bandas de absorção e a dependência de  $T_c$  em  $\lambda$  é aproximadamente linear. Os valores de  $\lambda$  seleccionados correspondem a cada 20 nm entre os 600 e os 800 nm.

Considerando cada uma das variações temporais para os  $\lambda$ s seleccionados, e de acordo com o que está descrito na literatura [10,79,80], fez-se um deslocamento vertical para que o valor de  $T_c$  seja nulo a  $t = 0$ s (tecido natural). Tais variações temporais deslocadas, foram posteriormente normalizadas ao seu valor máximo, que ocorre no início da saturação do tratamento. Tal saturação é identificada visualmente na evolução temporal de  $T_c$  e corresponde ao instante de tempo em que termina o crescimento

exponencial suave inicial. Este início de saturação pode ocorrer a instantes de tempo bem distintos, dependendo da concentração de glicerina usada. Para os tratamentos em que a saturação ocorre antes de se atingirem os 30 min que escolhemos como duração dos estudos, despreza-se a evolução temporal de  $T_c$  para além do instante que corresponde ao início da saturação [79,80]. Veremos cada caso em particular no capítulo IV, com a apresentação dos resultados.

Após se ter deslocado e normalizado cada evolução temporal de  $T_c$ , até ao instante do início da saturação, tal evolução pode ser ajustada por uma curva descrita pela Eq. (17) [79,80]:

$$T_c(\lambda_i, t) \cong \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \right], \quad (17)$$

onde  $\tau_i$  representa o tempo de difusão característico para o tratamento em estudo, ao comprimento de onda  $\lambda_i$  [11,79-82].

Realizou-se este processo para todos os comprimentos de onda pretendidos e procedeu-se ao cálculo do valor médio de  $\tau$  e do seu desvio padrão, para o tratamento em causa. Este procedimento foi realizado para todos os tratamentos estudados, obtendo-se, assim, um valor médio de  $\tau$  (e respetivo desvio padrão) para cada tratamento realizado com uma osmolaridade distinta de glicerina. No fim, representaram-se os valores médios de  $\tau$  em função da concentração de glicerina em solução, ajustando esses pontos com uma *spline* [81], para obter a dependência e retirar resultados. Da curva resultante, verifica-se a ocorrência de um valor máximo, valor esse que corresponde ao real tempo de difusão da glicerina no tecido do pâncreas [11,79-82]. Este valor de  $\tau$  obtido para o máximo da curva do gráfico, corresponde à difusão única de glicerina para o interior do pâncreas pois, a água móvel do tecido encontra-se em equilíbrio com a água na solução de tratamento [74,80]. Por outro lado, para o tratamento com a maior osmolaridade (concentração de 60% de glicerina em solução), apenas ocorre o fluxo de água para o exterior do tecido, nos instantes iniciais, devido à forte pressão osmótica do agente na solução. O valor de  $\tau$  obtido para esta concentração, corresponde ao tempo de difusão característico do mecanismo de desidratação do tecido [74,80].

Os coeficientes de difusão ( $D$ ), característicos para os fluxos da glicerina e da água no pâncreas, podem ser calculados a partir dos valores de  $\tau$  correspondentes, que foram retirados do gráfico descrito anteriormente. Tal cálculo é feito pela Eq. (18) [11,82]:

$$D = \frac{d^2}{\pi^2\tau}, \quad (18)$$

onde  $d$  representa a espessura do tecido no mesmo instante de tempo que corresponde a  $\tau$ , para o tratamento com a mesma concentração de glicerina. Depois de retirados do gráfico os valores de  $\tau$  e calculados os valores de  $D$ , correspondentes à difusão única de glicerina e de água no pâncreas, ficam caracterizados os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs do tratamento de transparência.

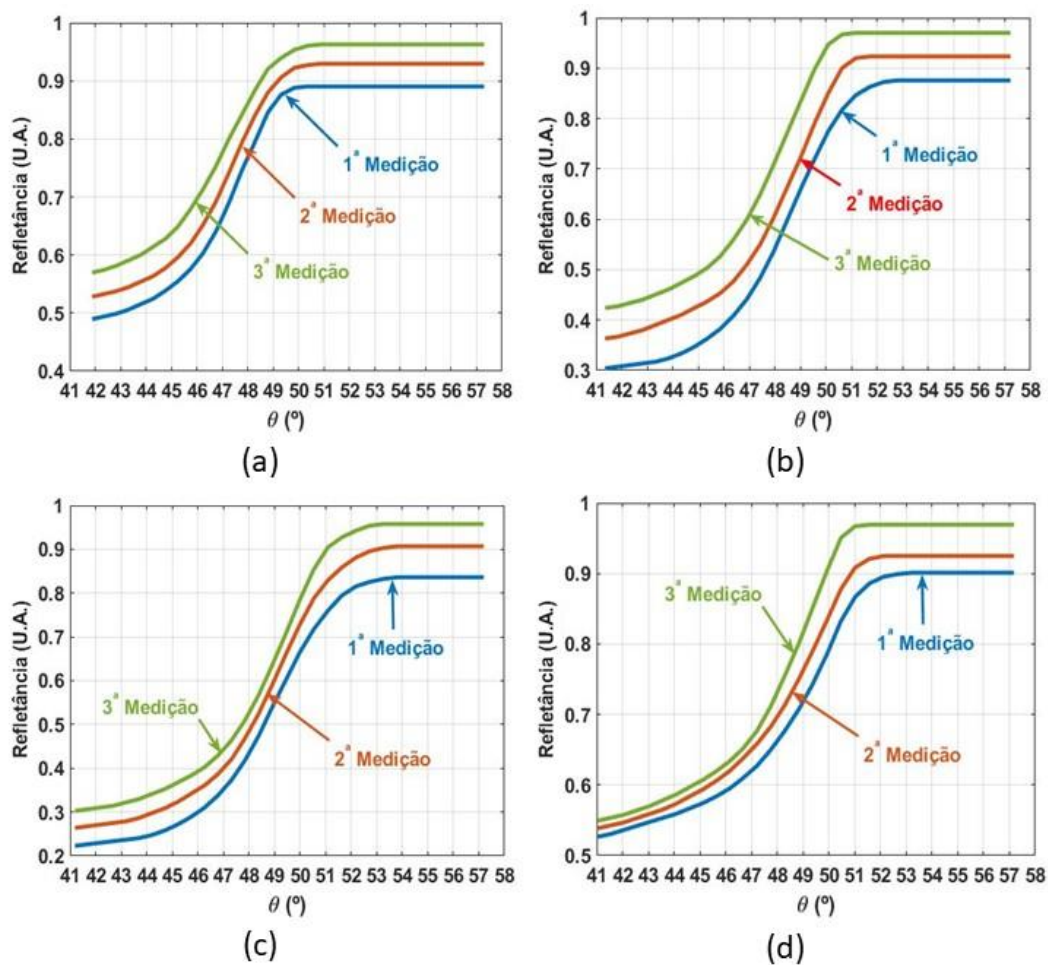
## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4. Resultados e Discussão

Seguindo o procedimento experimental, descrito no capítulo anterior, foram obtidos resultados e efetuados cálculos, que iremos agora apresentar. Este capítulo, encontra-se dividido em três secções, onde são apresentados os resultados para o estudo do IR, das propriedades óticas do pâncreas em estado natural e das propriedades de difusão da glicerina e da água, no seu interior, durante tratamentos de transparência.

### 4.1. Índice de refração

Após a obtenção de todos os dados experimentais com a montagem de reflexão interna total, procedeu-se ao cálculo das curvas de refletância para cada conjunto de medições usando a Eq. (3). As curvas de refletância obtidas neste cálculo para todos os lasers encontram-se representadas na Fig. 7.



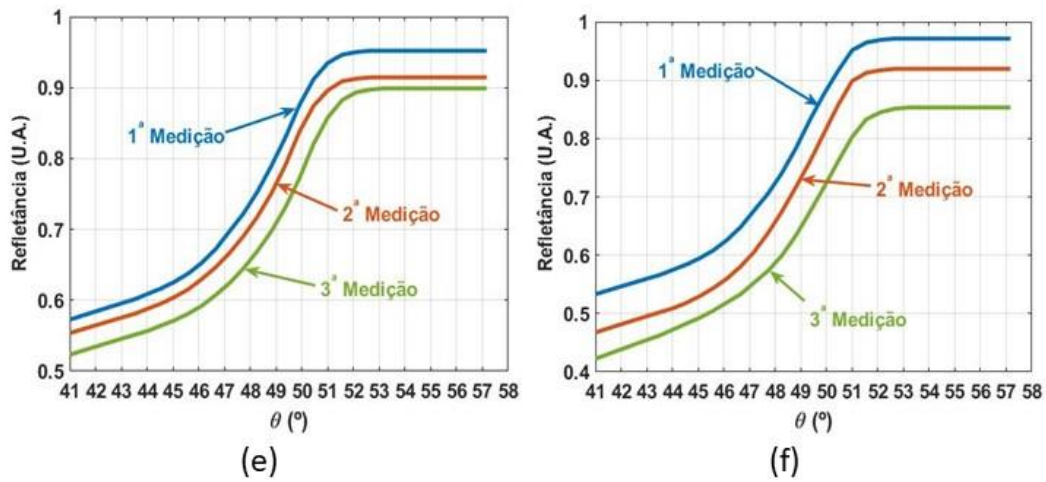
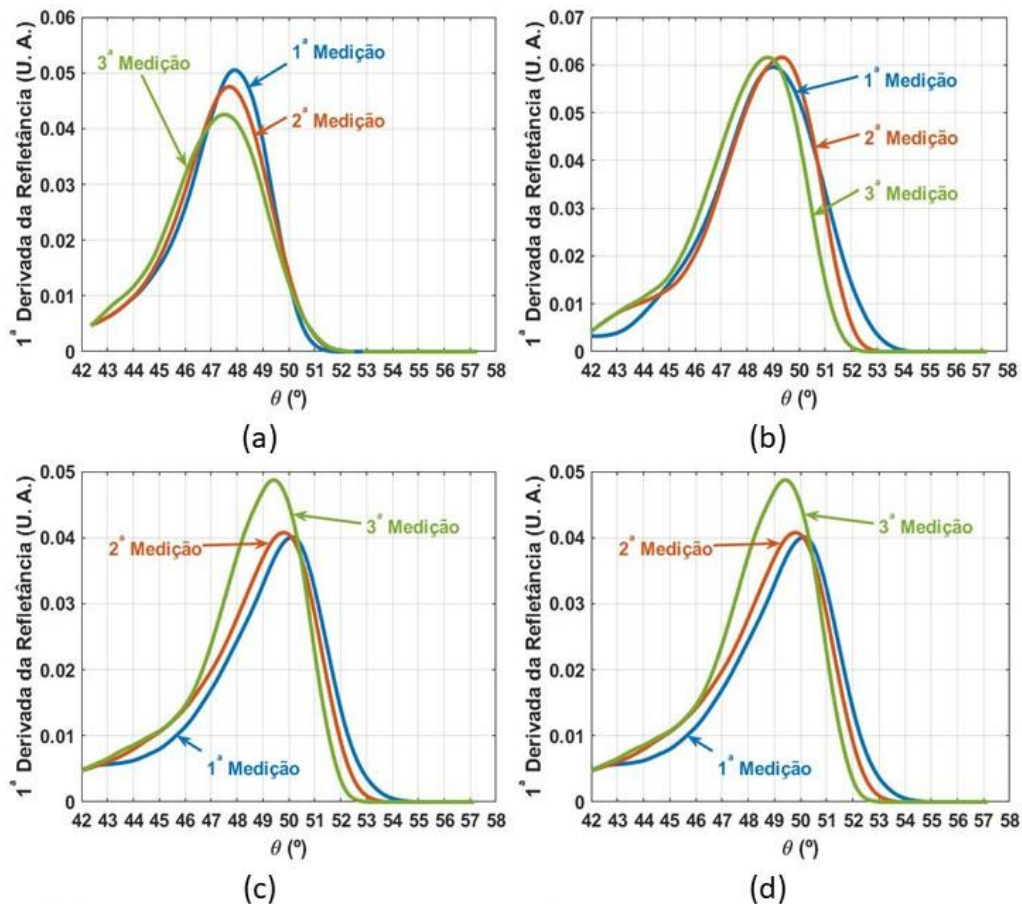


Figura 7: Curvas de refletância obtidas com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f).

Uma vez obtidas as curvas de refletância e seguindo o procedimento indicado na subsecção 3.1.4, utilizou-se a Eq. (4) para calcular as respectivas curvas das derivadas de primeira ordem. Estas curvas encontram-se representadas na Fig. 8.



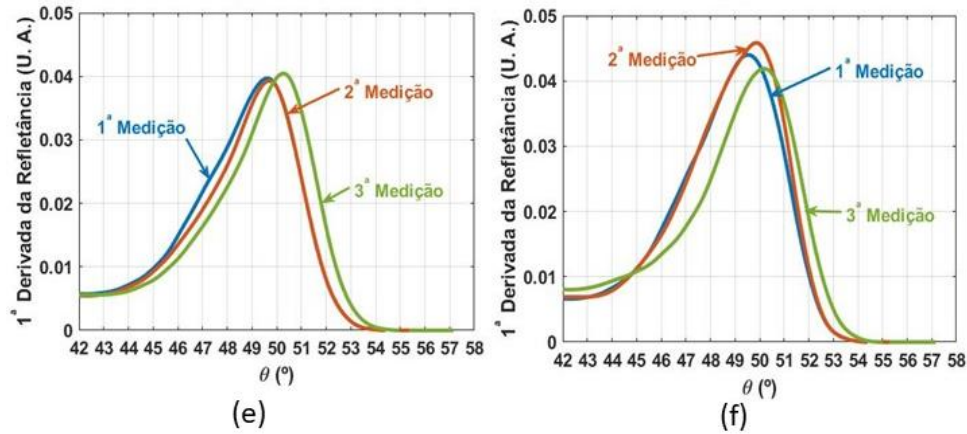


Figura 8: Curvas da primeira derivada da refletância para os estudos com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f).

Os picos observados em cada uma das curvas da Fig. 8, estão centrados a um ângulo, que corresponde ao  $\theta_c$  obtido para esse estudo. Assim, por análise de todos os gráficos da Fig. 8, foram recolhidos os valores de  $\theta_c$  que estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de  $\theta_c$  obtidos a partir dos gráficos da Fig. 8.

Laser	$\theta_c$ (°) por medição		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
<b>401.4 nm</b>	47.9	47.7	47.5
<b>534.6 nm</b>	49.0	49.3	48.8
<b>626.2 nm</b>	49.3	49.5	49.7
<b>782.1 nm</b>	50.1	49.8	49.4
<b>820.8 nm</b>	49.6	49.7	50.3
<b>850.7 nm</b>	49.5	49.9	50.2

Tendo por base os valores apresentados na Tabela 1, procedeu-se ao cálculo do índice de refração do tecido correspondente, usando a Eq. (5). A Tabela 2 contém os valores do IR do tecido para cada conjunto de medições, com cada laser, a respetiva média e desvio padrão.

Tabela 2: Valores de  $n_{\text{tecido}}$  obtidos.

$\lambda$ ( nm)	$n_{\text{tecido}}$				Média	Desvio padrão
	1°	2°	3°			
<b>401.4 nm</b>	1.3688	1.3643	1.3604		1.3645	0.0042
<b>534.6 nm</b>	1.3542	1.3612	1.3499		1.3551	0.0057

<b>626.2 nm</b>	1.3491	1.3521	1.3572	1.3528	0.0041
<b>782.1 nm</b>	1.3411	1.3489	1.3552	1.3484	0.0071
<b>820.8 nm</b>	1.3429	1.3447	1.3560	1.3479	0.0071
<b>850.7 nm</b>	1.3409	1.3474	1.3537	1.3473	0.0064

Recorrendo ao CFTOOL do MATLAB, os valores médios de IR da Tabela 2, foram ajustados, com curvas descritas pelas Eqs. (6), (7) e (8), para ver qual delas dava o melhor ajuste. A Fig. 9 apresenta todas essas curvas juntamente com os valores experimentais das medições, o valor do IR do pâncreas suíno da Ref. [37] e a curva de dispersão do pâncreas humano a 25 °C, retirada da Ref. [38].

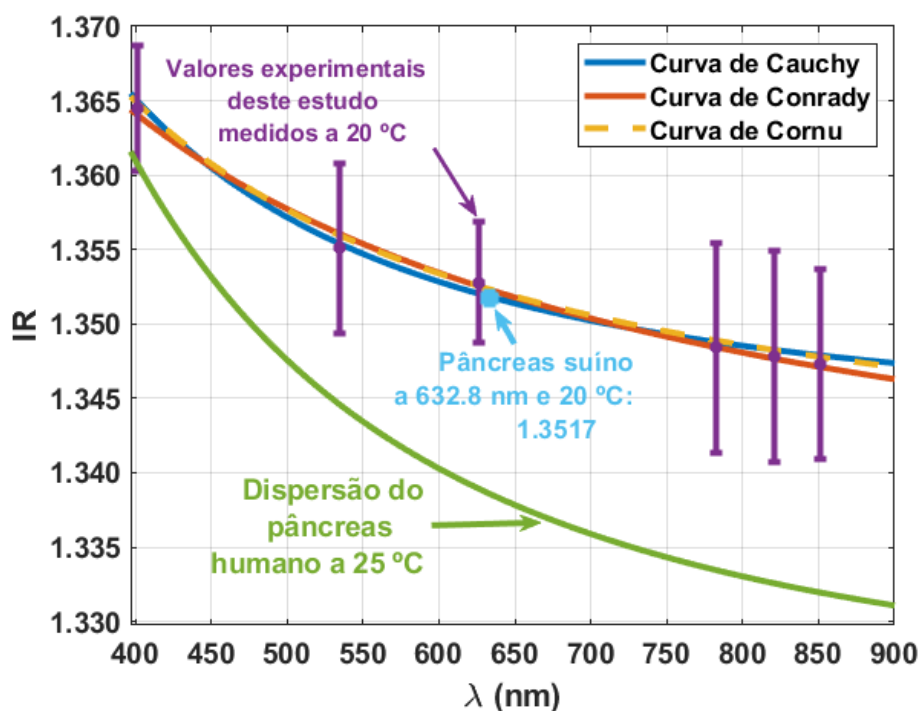


Figura 9: Valores experimentais do IR do pâncreas: do estudo presente, do pâncreas suíno e do pâncreas humano.

De acordo com a Fig. 9, foi conseguido um bom ajuste dos pontos experimentais com todas as curvas testadas, visto que se conseguiu valores de  $R^2$  de 0.997 para a curva de Cornu e de 0.994 para as curvas de Cauchy e de Conrady. Podemos também ver pela Fig. 9 que, o desvio padrão é superior para os valores de IR obtidos com os lasers no IV, um facto que se deve à dificuldade visual com lasers no IV neste tipo de medição. As equações obtidas para as curvas apresentadas na Fig. 9 foram as seguintes:

$$n_{tecido}(\lambda) = 1.343 + \frac{3542}{\lambda^2} + \frac{0.1576}{\lambda^4} \text{ (Cauchy)}, \quad (19)$$

$$n_{tecido}(\lambda) = 1.332 + \frac{12.86}{\lambda} + \frac{0.1576}{\lambda^{3.5}} \text{ (Conrady)}, \quad (20)$$

$$n_{tecido}(\lambda) = 1.337 + \frac{7.915}{(\lambda - 117)} \text{ (Cornu)}. \quad (21)$$

Considerando a Fig. 9 e fazendo uma comparação dos dados obtidos com os indicados na literatura, observamos que o pâncreas de coelho apresenta um IR semelhante ao do pâncreas de suíno onde, para  $\lambda = 633$  nm temos um valor de 1.3521 para o nosso estudo e 1.3517 para o IR suíno (Ref. [76]). Ambos os resultados foram obtidos para uma temperatura de 20 °C. Comparando os resultados que obtivemos para o pâncreas de coelho com a dispersão do pâncreas humano, publicada na Ref. [83], verificamos que os nossos dados experimentais apresentam valores superiores. Tal diferença é criada porque se tratam de pâncreas de espécies diferentes, mas, principalmente, porque os dois estudos foram realizados a temperaturas diferentes.

Tal como descrito na secção 3.2.3, a curva de dispersão a obter das medições experimentais de IR, servirá como referência para se obter uma dispersão mais realista do pâncreas, pelas equações de Kramers-Kronig. Assim, e como todas as curvas representadas na Fig. 9 tiveram um ajuste com  $R^2$  superior a 0.99, qualquer uma delas seria uma boa escolha. No entanto, o ajuste feito com estas curvas foi conseguido considerando-se apenas a banda espectral correspondente ao intervalo de  $\lambda$ s que contém os picos de emissão dos lasers usados nas medições com a montagem de reflexão interna total. Isto significa que, qualquer uma destas curvas pode não ser válida para o pâncreas fora dessa zona espectral. A escolha entre as três curvas, apenas pode feita quando calcularmos a dispersão real do pâncreas pelas equações K-K (Eqs. (11) e (12)) a partir do  $\mu_a(\lambda)$ . A escolha da dispersão adequada entre as representadas na Fig. 9 e os respetivos cálculos de K-K estão apresentados na próxima secção.

## 4.2. Propriedades óticas

Após a medição dos espectros de  $T_t$  e de  $R_t$ , fez-se o cálculo dos espectros médios e respetivos desvios padrão, que se encontram representados na Fig. 10.

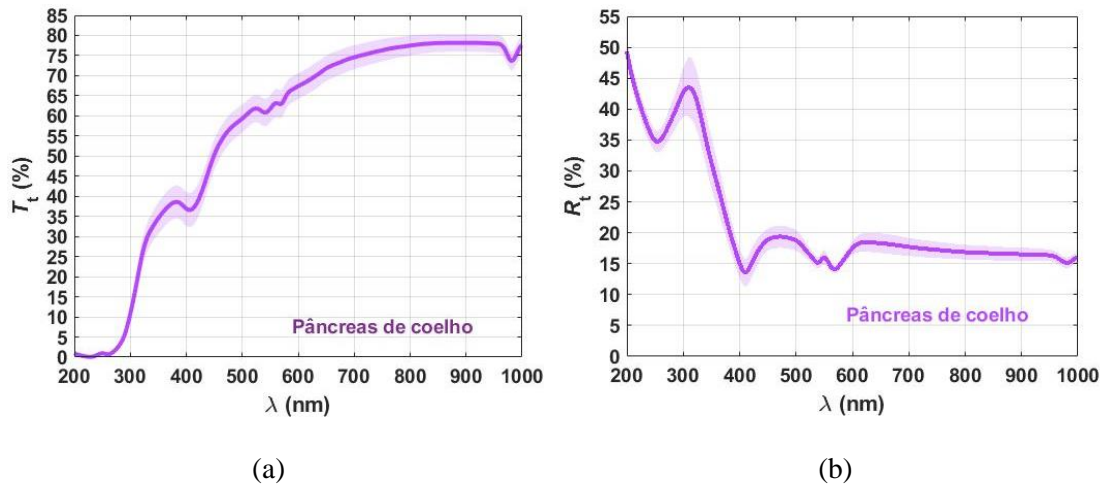


Figura 10: Média e desvio padrão dos espectros de  $T_t$  (a) e  $R_t$  (b).

Observando os espectros médios da Fig. 10, verificamos que ambos apresentam as bandas de absorção da hemoglobina e da água, localizadas respetivamente a 415, 540 e 570 nm para a hemoglobina e a 980 nm para a água [84]. No espectro de  $R_t$ , conseguimos também ver a banda de absorção do ADN/ARN, localizada aos 260 nm [84]. O desvio padrão representado em cada gráfico da Fig. 10 é reduzido em todo o espectro, mostrando grande semelhança entre as amostras de tecido usadas tanto para a transmitância como para a refletância. É, no entanto, de notar que tal desvio padrão é praticamente nulo na zona do UV profundo (abaixo de 250 nm), um facto que mostra que nessa zona do espectro, onde existe um forte espalhamento associado a grande absorção, os tecidos apresentam comportamentos semelhantes para estas medições.

Considerando cada par de espectros de  $T_t$  e de  $R_t$  medidos, usou-se a Eq. (9) para calcular  $A_b$ , que dividindo pela espessura das amostras ( $d=0.5\text{mm}$ ), tal como descrito na Eq. (10), foram calculados 10 espectros de  $\mu_a$ . A Fig. 11 representa o espectro médio e o desvio padrão resultante destes cálculos.

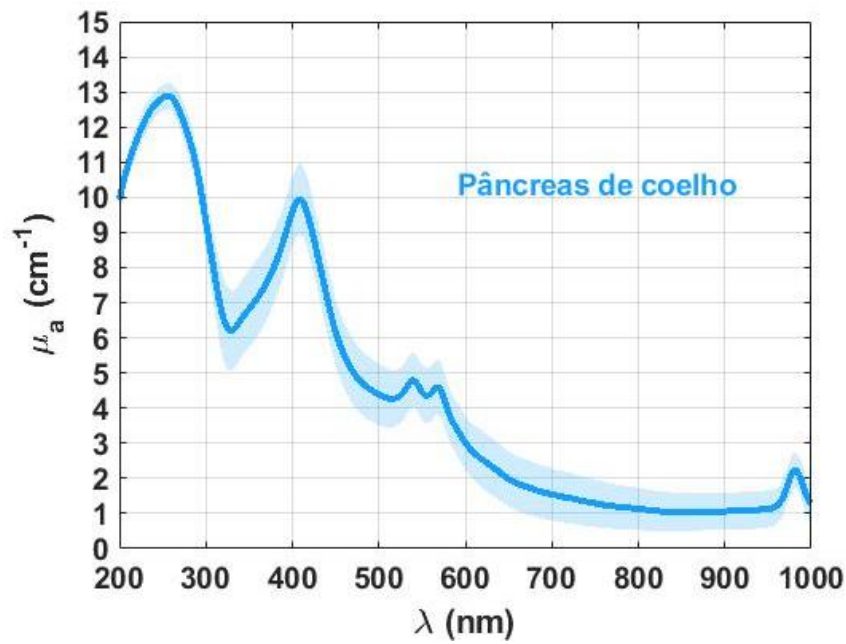


Figura 11: Média e desvio padrão de  $\mu_a$  para o pâncreas.

O passo seguinte foi obter a dispersão real do pâncreas por cálculo com as equações K-K (Eqs. (11) e (12)) a partir dos espectros de  $\mu_a$ . Durante este processo de cálculo, verificou-se que na banda espectral de 200 a 1000 nm a curva de dispersão representada na Fig. 9 que melhor se ajusta à dispersão calculada pelas equações K-K é a curva descrita pela equação de Cauchy (Eq. (19)). Depois de realizado este processo de cálculo com os dez espectros de  $\mu_a$  calculou-se a dispersão média e o desvio padrão que estão representados na Fig. 12.

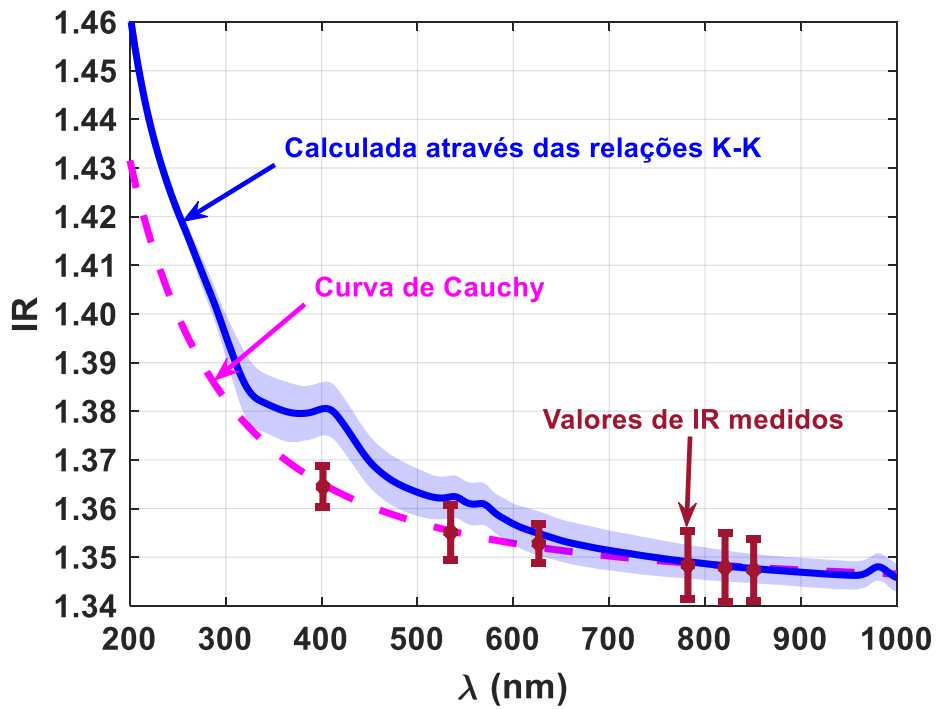


Figura 12: Dispersão do pâncreas calculada pelas relações K-K (azul escuro) e calculada pela equação de Cauchy (rosa) e medições de IR experimentais discretas (vermelho).

Seguindo o procedimento de cálculo das propriedades óticas, descrito na secção 3.2.3 passamos a calcular o espectro do  $\mu_s$ . Para proceder a este cálculo, foram utilizados os espectros de  $T_c$  individuais, que foram medidos das amostras de tecido de pâncreas. A Fig. 13 apresenta a média e o desvio padrão dos 10 espectros de  $T_c$  medidos.

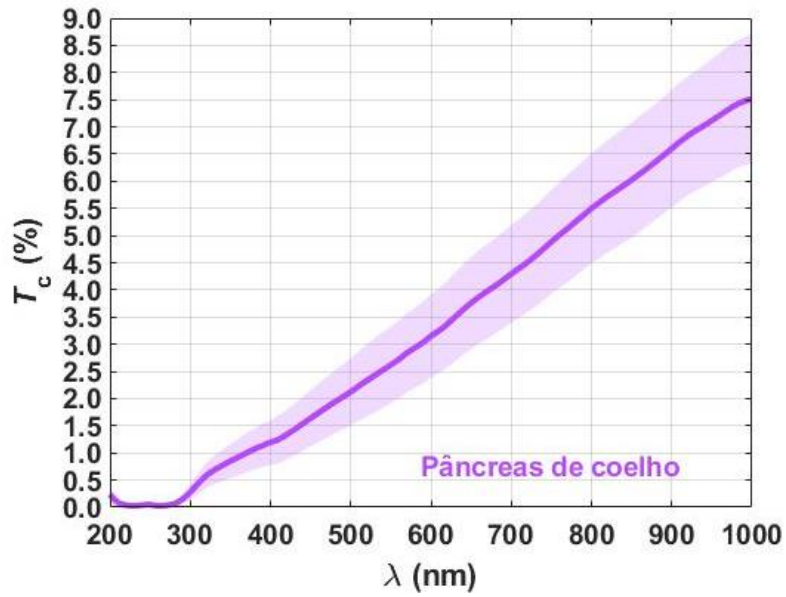


Figura 13: Média e desvio padrão dos espectros de  $T_c$ .

Para cada espectro de  $T_c$ , utilizou-se a Eq. (13) para calcular o espectro de  $\mu_s$ . Nestes cálculos fez-se uso da espessura do tecido e de um espectro de  $\mu_a$ , dos calculados anteriormente. Após se ter feito este cálculo 10 vezes, obteve-se o espectro médio e o desvio padrão para  $\mu_s$ .

Utilizando valores discretos de IR, de  $T_t$  e de  $R_t$  nas simulações IAD, foram obtidos os valores de  $\mu'_s$ , para  $\lambda$ s a cada 50 nm entre 200 e 1000 nm. Este procedimento foi também realizado 10 vezes com valores de  $T_t$  e de  $R_t$  de cada par de espectros medidos. Com os 10 espectros de  $\mu'_s$  obtidos, fez-se o ajuste com uma curva descrita pela Eq. (14), resultando no espectro médio e respetivo desvio padrão apresentados na Fig. 14.

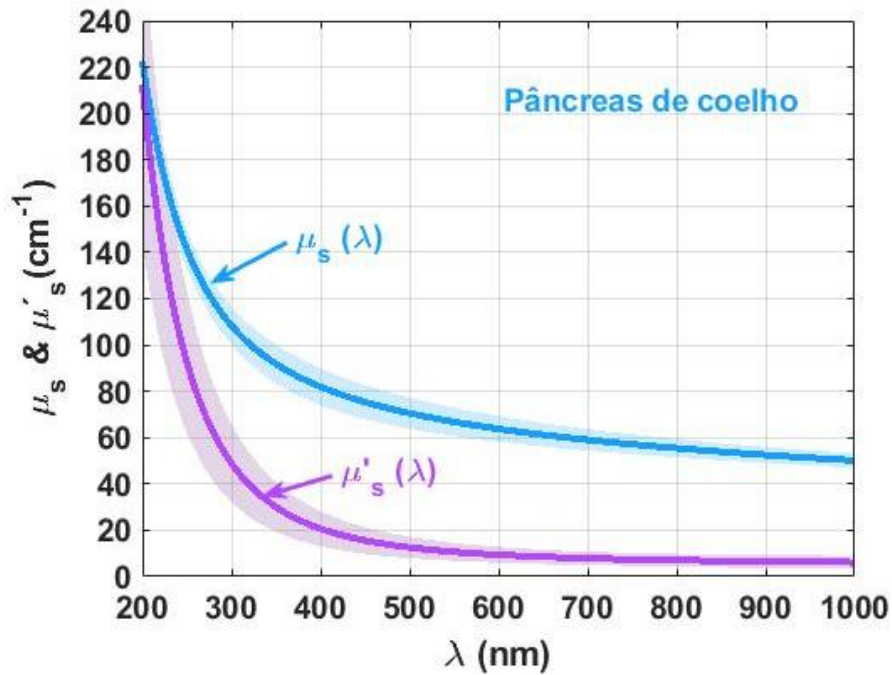


Figura 14: Média e desvio padrão de  $\mu_s$  (azul) e de  $\mu'_s$  (roxo).

Podemos verificar pela Fig. 14 que os dois coeficientes de espalhamento obedecem à lei exponencial decrescente com o aumento do  $\lambda$ , que resulta da combinação dos espalhamentos de Rayleigh e de Mie [41]. Tal como observado noutros estudos [18,21],  $\mu'_s$  apresenta valores quase coincidentes com os de  $\mu_s$  para baixos valores de  $\lambda$ , verificando-se um afastamento entre ambos com o aumento de  $\lambda$ . Na Fig. 14 observa-se que  $\mu'_s$  apresenta um desvio padrão de maior magnitude que  $\mu_s$ , mas tal diferença está relacionada com maior dispersão de resultados gerados nas simulações de IAD.

A propriedade ótica que foi calculada de seguida foi a anisotropia. Para procedermos a este cálculo, e usando pares de espectros de  $\mu_s$  e  $\mu'_s$  na Eq. (15), foram obtidos 10 espectros de  $g$ . A média e o desvio padrão destes espectros encontram-se representados na Fig. 15.

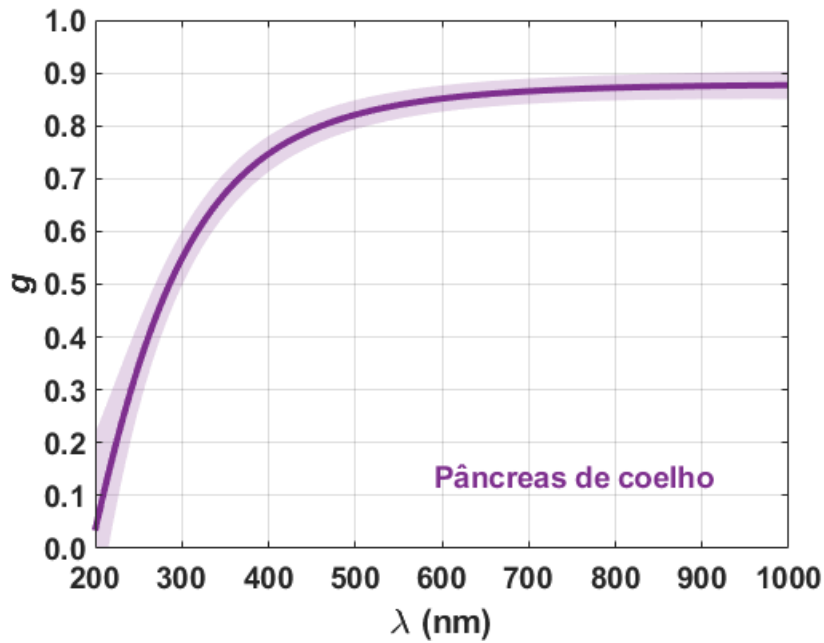


Figura 15: Média e desvio padrão de  $g$ .

A dependência em  $\lambda$  que  $g$  apresenta na Fig. 15 está de acordo com outros resultados apresentados na literatura [18,21] –  $g$  cresce de forma exponencial com  $\lambda$ , tomando valores praticamente nulos a 200 nm e aproximando-se da unidade na transição entre o visível e o IV. O desvio padrão apresentado para  $g$  tem uma magnitude quase constante em todo o espectro. No entanto, para valores de  $\lambda$  baixos, a magnitude do desvio padrão tende a aumentar devido a uma maior dispersão de resultados, quer nos experimentais de  $\mu_s$ , quer nos estimados de  $\mu'_s$ .

Para terminar o cálculo das propriedades óticas dos tecidos de pâncreas em estado natural, foram usados os espectros de  $\mu_a$  e de  $\mu'_s$  para obter os espectros de  $\delta$ . A média e o desvio padrão dos 10 espectros de  $\delta$ , encontram-se representados na Fig. 16.

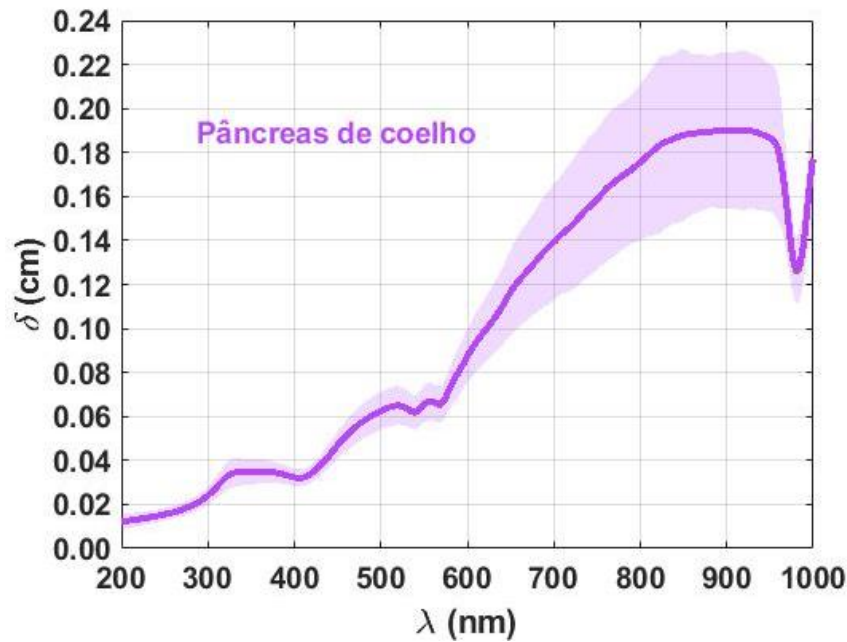


Figura 16: Média e desvio padrão da profundidade de penetração de luz no pâncreas.

Da Fig. 16 verifica-se que  $\delta$  toma valores baixos no UV e que vai crescendo com o aumento de  $\lambda$ . A Fig. 16 mostra também que  $\delta$  é sensível às bandas de absorção dos componentes biológicos do pâncreas, nomeadamente a hemoglobina e a água, tendo esta um forte efeito em  $\delta$ . Mediante a dependência de  $\delta$  em  $\lambda$ , representada na Fig. 16, será de interesse utilizar luz no IV para procedimentos de diagnóstico e terapia no pâncreas, uma vez que se conseguem maiores profundidades de penetração nessa zona. Lembramos que  $\delta$  é uma propriedade ótica de elevada importância dos tecidos biológicos, uma vez que permite otimizar a dose de radiação necessária para terapias de diversas doenças [85].

Voltando a considerar o espectro de  $\mu_a$ , representado na Fig. 11, verifica-se que há a existência de uma *baseline* com decaimento exponencial com o crescimento de  $\lambda$ . Há semelhança de outros estudos já publicados [18][86], a existência de tal *baseline* em todo o espectro de  $\mu_a$  é evidência de que o pâncreas contém algum pigmento. Consultando a literatura, verifica-se que a lipofuscina é um pigmento que costuma acumular-se nos tecidos e que está associado ao processo de envelhecimento dos mesmos, contribuindo também nesse processo, uma vez que é responsável pela degeneração de células [87,88]. Por outro lado, outros estudos realizados [87,89] mostram que durante a acumulação da lipofuscina ocorre também a acumulação da melanina.

Assumindo que estes dois pigmentos se encontram nos tecidos de pâncreas estudados e com o objetivo de verificar se de facto são responsáveis pela *baseline* existente no espectro de  $\mu_a$  obtido, procurou-se na literatura quais os espectros da melanina e da lipofuscina entre 200 e 1000 nm. No caso da melanina, verificou-se que tem um comportamento exponencial decrescente desde os 200 até aos 1000 nm [90]. Para a lipofuscina, verificou-se que o espectro, embora tenha também um comportamento exponencial decrescente, apresenta uma zona de absorção quase constante entre os 200 e os 300 nm [91]. Recolhendo valores numéricos da absorção da melanina e da lipofuscina nos gráficos apresentados nas Refs. [90] e [91], respetivamente, os seus espectros de  $\mu_a$  foram reconstruídos tal como apresentado na Fig. 17.

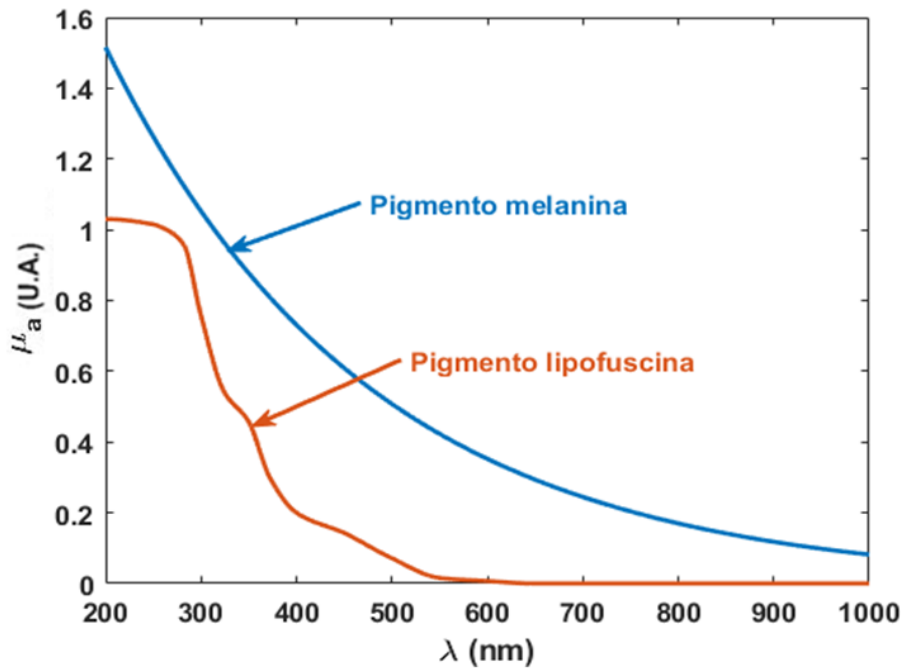


Figura 17: Espectro de  $\mu_a$  para a melanina (azul) e para a lipofuscina (laranja).

Com os espectros representados na Fig. 17, foram feitas tentativas de combinação de ambos para se subtrair ao  $\mu_a$  do pâncreas, tendo-se obtido uma situação ótima descrita pela equação seguinte:

$$\mu_{a\text{-pigmento}}(\lambda) = 5.3 \times \mu_{a\text{-melanina}}(\lambda) + 1.5 \times \mu_{a\text{-lipofuscina}}(\lambda), \quad (22)$$

onde  $\mu_{a\text{-melanina}}(\lambda)$  e  $\mu_{a\text{-lipofuscina}}(\lambda)$  representam os espectros da melanina e da lipofuscina tal como representados na Fig. 17. Subtraíndo a absorção da combinação destes dois pigmentos ao espectro do  $\mu_a$  do pâncreas, obteve-se o novo espectro que representa os restantes componentes biológicos que o pâncreas contém. A Fig. 18 apresenta os espectros de  $\mu_a$  do pâncreas original, do pigmento tal como descrito pela Eq. (22) e dos restantes componentes biológicos do pâncreas após se retirar a absorção dos pigmentos.

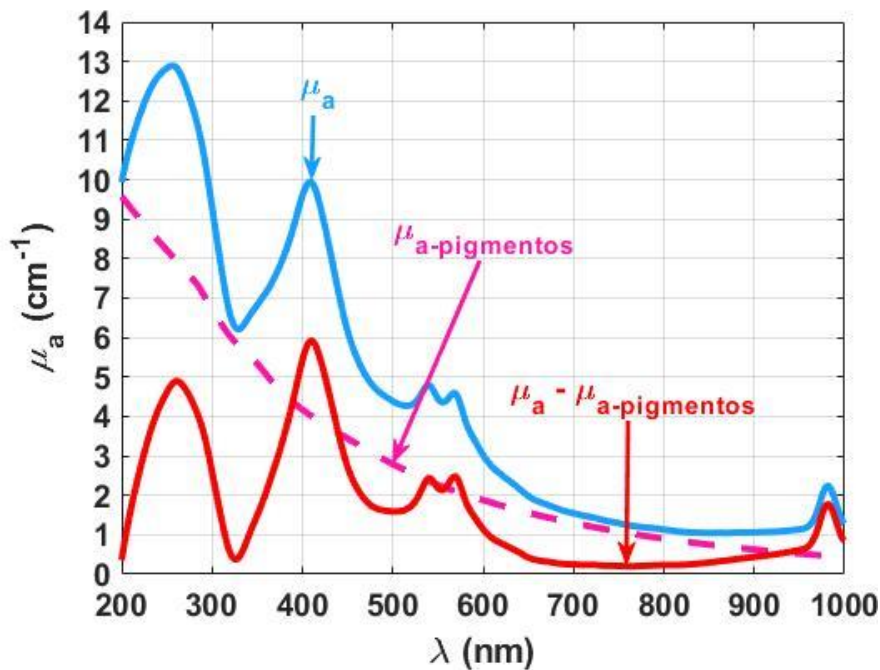


Figura 18: Coeficientes de absorção do pâncreas (azul), dos pigmentos (rosa) e dos restantes componentes do pâncreas (vermelho).

A descoberta de que os tecidos de pâncreas estudados continham uma combinação dos pigmentos melanina e lipofuscina mostra que o processo de envelhecimento destes tecidos já se encontra num estado algo avançado. Tal facto não é de surpreender, uma vez que os animais de onde foram recolhidos os pâncreas para o estudo eram animais adultos com alguma idade. Dado que estes animais foram adquiridos a pessoas particulares que os criam para consumo, não existe registo da idade dos animais na altura do seu sacrifício. Será interessante, em estudos futuros, realizar-se uma avaliação do mesmo tipo em tecidos de pâncreas, ou outros, provenientes de indivíduos da mesma espécie (coelho)

---

com idades diferentes, no sentido de se avaliar se o conteúdo dos pigmentos é progressivo com a idade e com o respectivo envelhecimento de órgãos e tecidos.

### 4.3.Difusão

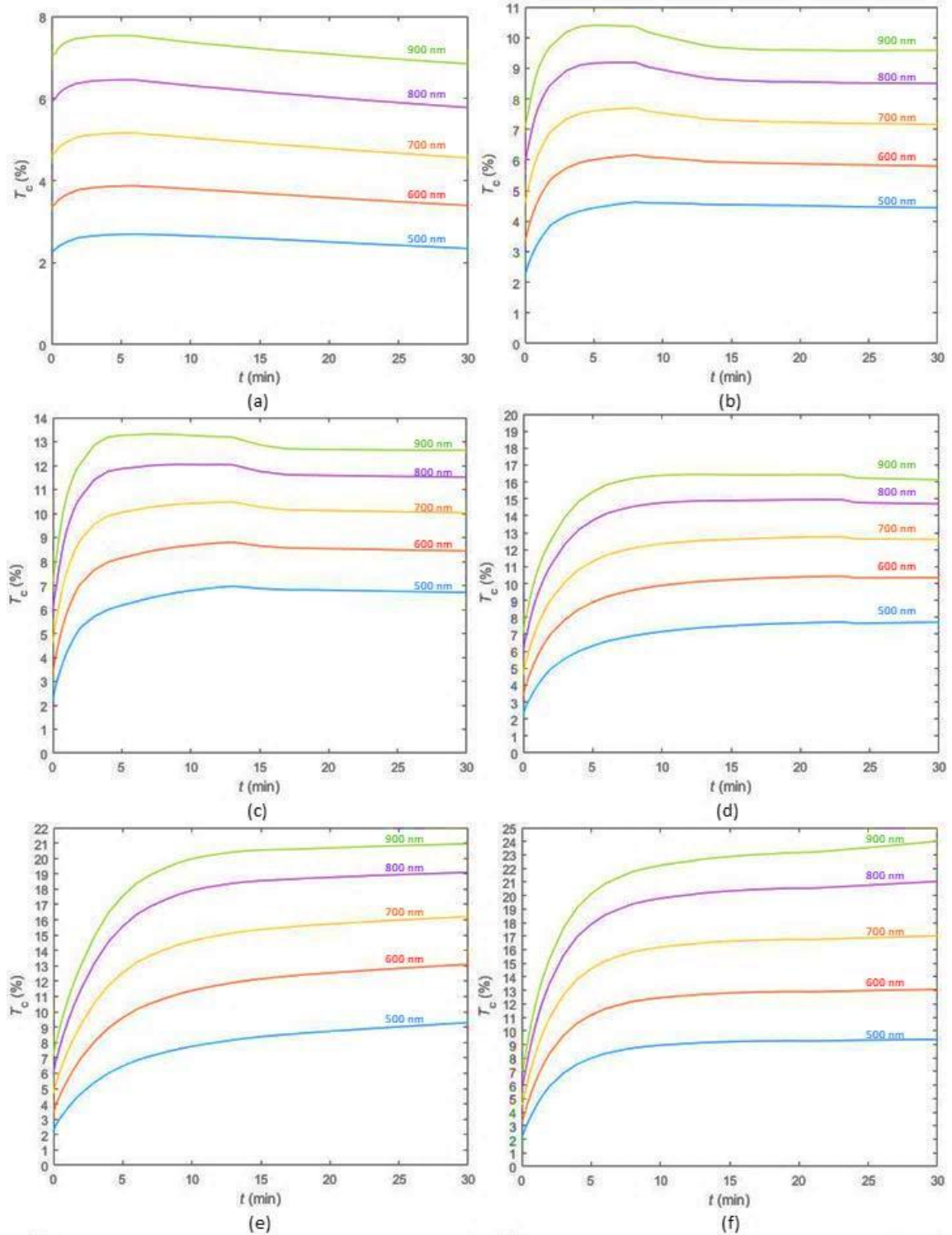
Para além da avaliação das propriedades óticas espectrais dos tecidos do pâncreas, é também importante avaliar quais as propriedades de difusão da água e de agentes de transparência nestes tecidos, no sentido de se poderem caracterizar os mecanismos que governam os tratamentos de transparência, para futuras aplicações de ótica médica. Nesse sentido, foram realizados estudos em que se mediram os espectros de  $T_c$  de tecidos do pâncreas imersos em soluções aquosas de glicerina com diferentes concentrações. A medição destes espectros permite calcular as evoluções temporais  $T_c$  para determinados  $\lambda_s$ , o que de acordo com outros estudos [79,80] é necessário e suficiente para determinar os tempos e os coeficientes de difusão da água e do agente de transparência.

No sentido de se obterem estes parâmetros, foram preparadas soluções aquosas de glicerina, diluindo glicerina com 99% de pureza em água destilada até se obterem as concentrações indicadas na Tabela 3. Na preparação destas soluções, o IR de cada uma foi controlado com o refratómetro de Abbe à temperatura de 20 °C.

Tabela 3: IR das soluções aquosas de glicerina preparadas.

Concentração de glicerina (%)	Índice de Refração
20	1.35749
25	1.36404
30	1.37070
35	1.37740
40	1.38413
45	1.39089
50	1.39809
55	1.40554
60	1.41299

Utilizando cada uma destas soluções, foram realizados 3 estudos para se obterem resultados estatísticos das evoluções temporais dos espectros de  $T_c$ . A Fig. 19 mostra as evoluções temporais médias obtidas dos 3 estudos realizados para cada tratamento, para os comprimentos de onda de 500, 600, 700, 800 e 900 nm.



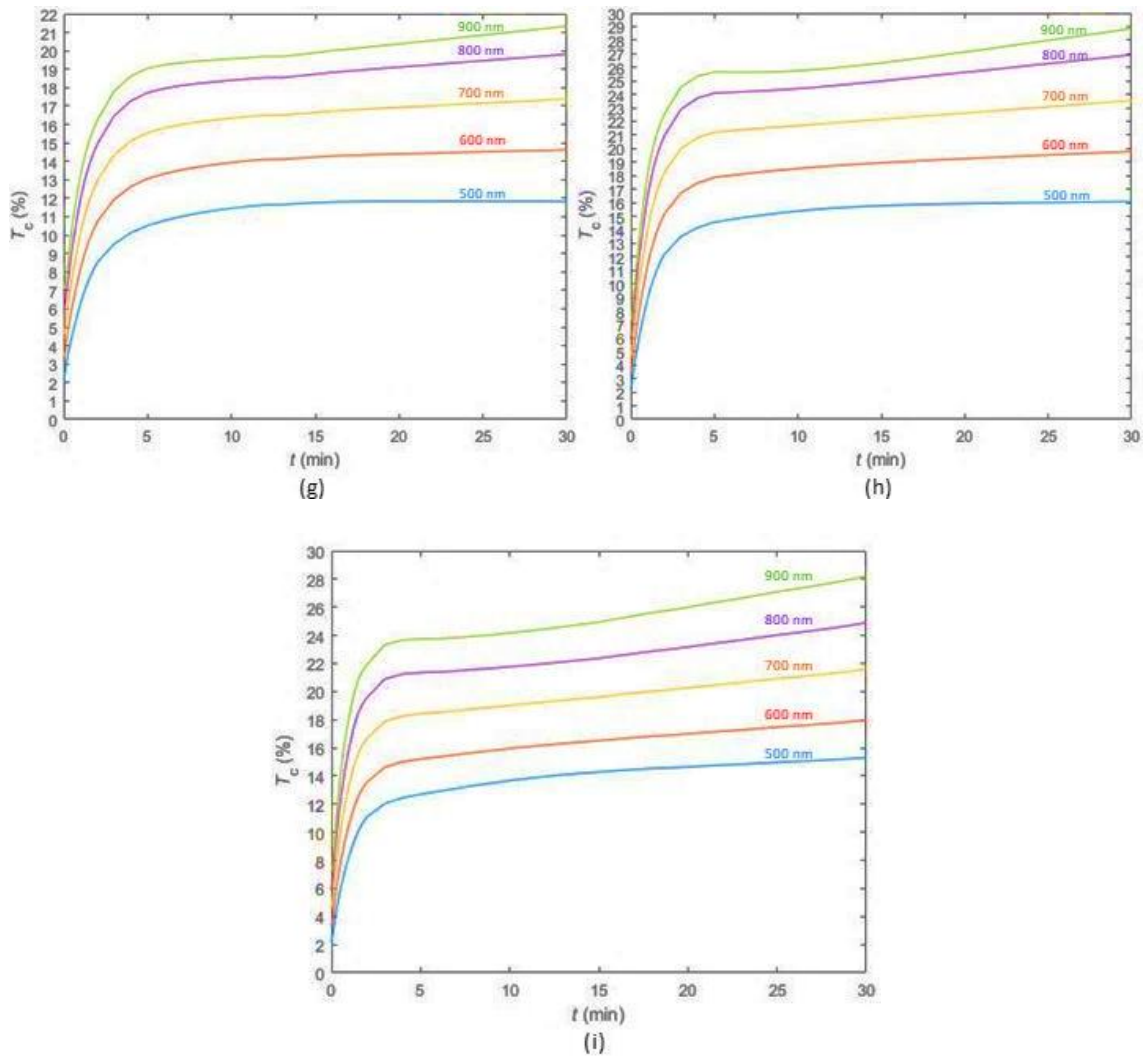


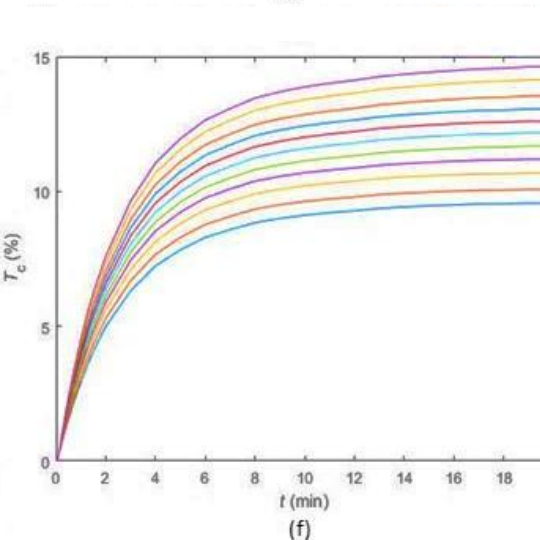
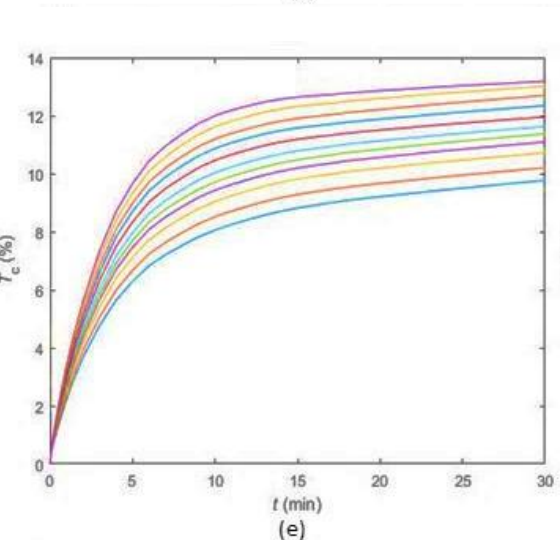
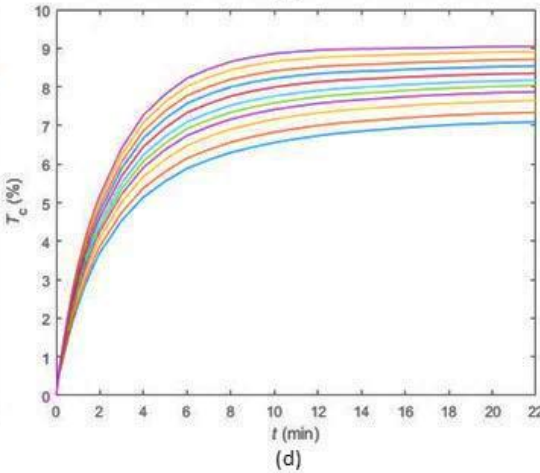
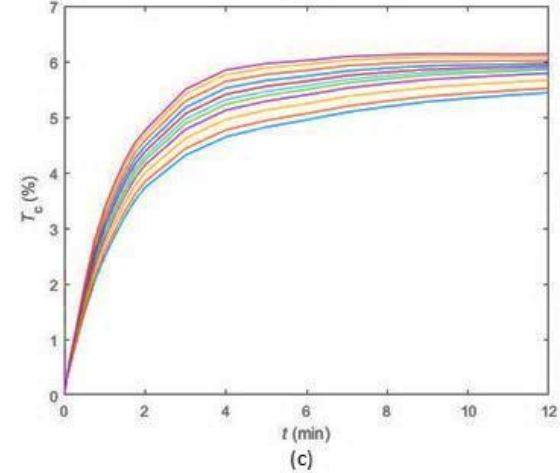
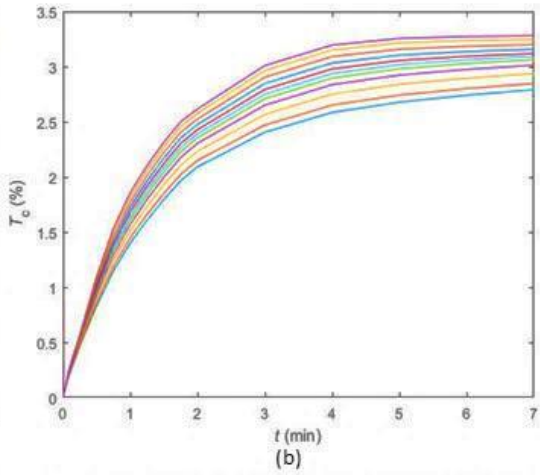
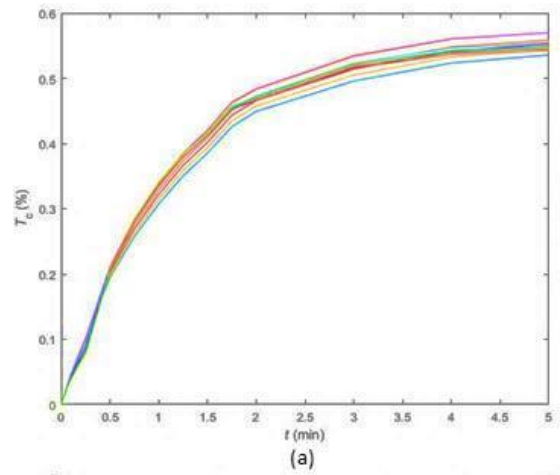
Figura 19: Dependências temporais de  $T_c$  para diferentes  $\lambda$ s obtidos nos tratamentos de tecidos do pâncreas com soluções de glicerina nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f), 50% (g), 55% (h) e 60% (i).

Os gráficos da Fig. 19 mostram que os diferentes tratamentos realizados apresentam comportamentos exponenciais crescentes limitados em intervalos de tempo distintos. Para tratamentos com concentrações de glicerina em solução abaixo de 40%, verifica-se que conforme a concentração de glicerina aumenta na solução usada, o intervalo de tempo desse crescimento exponencial vai aumentando. No caso do tratamento com 40% de glicerina, o crescimento exponencial ocorre durante todo o intervalo de tratamento considerado, enquanto que para concentrações de glicerina superiores, esse intervalo de tempo volta a diminuir com o aumento de glicerina em solução.

---

No sentido de escolhermos  $\lambda_s$  para a determinação do tempo de difusão ( $\tau$ ), é necessário considerar uma zona espectral onde o tecido não apresente bandas de absorção [79,80]. Observando o espectro médio de  $T_c$  na Fig. 13, verifica-se que no caso do pâncreas não existem bandas de absorção entre os 600 e os 800 nm e que o espectro de  $T_c$  tem comportamento linear nessa zona. Desta forma, selecionaram-se  $\lambda_s$  a cada 20 nm entre os 600 e os 800 nm para avaliar o valor de  $\tau$  para cada um dos tratamentos estudados.

De acordo com o procedimento descrito na secção 3.3.2, começou por identificar-se em cada tratamento, o instante de tempo onde ocorre a saturação do crescimento exponencial inicial de  $T_c$ . Para a grande maioria dos tratamentos em que esse instante de tempo é inferior aos 30 minutos considerados nos estudos experimentais, foram desprezadas as evoluções temporais de  $T_c$  para além do início da saturação. Para as evoluções temporais de  $T_c$  que ocorrem até o instante de saturação fez-se o deslocamento vertical por forma a que tivessem  $T_c = 0$  a  $t = 0$  s. A Fig. 20 apresenta as evoluções temporais para os diferentes  $\lambda_s$  em cada tratamento após a realização deste processamento preliminar.



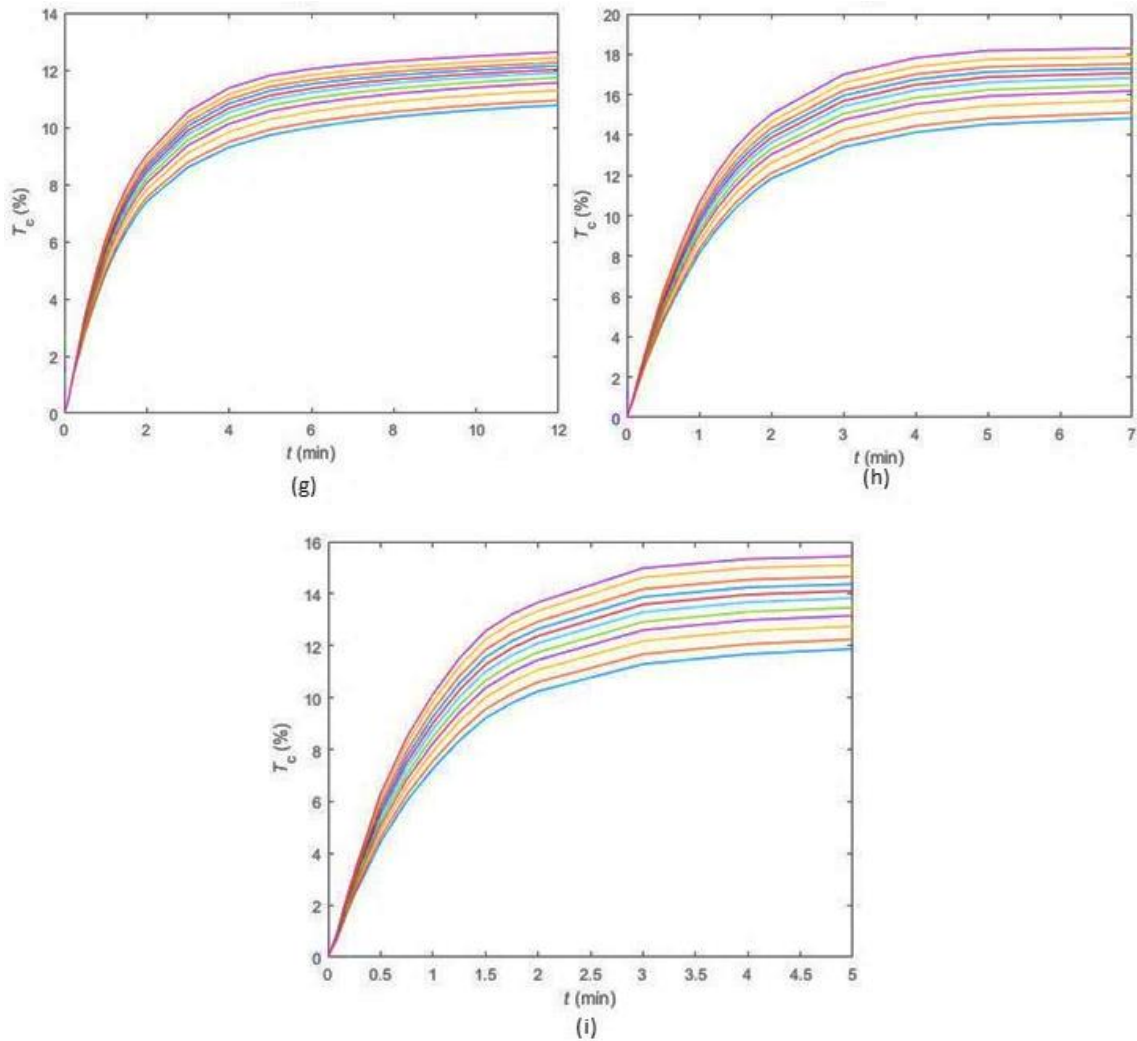


Figura 20: Dependências temporais de  $T_c$  deslocadas para zero a  $t=0s$  e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes  $\lambda_s$  obtidos nos tratamentos de tecidos do pâncreas com soluções de glicerina nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f), 50% (g), 55% (h) e 60% (i).

Cada uma das curvas dos gráficos representados na Fig. 20 foram, posteriormente, normalizadas ao seu valor máximo para se poder fazer o ajuste com a Eq. (17). O ajuste com esta equação foi feito para cada uma destas curvas, após a normalização, tendo-se obtido um valor de  $\tau$  para cada  $\lambda$ . Para cada tratamento, calculou-se o valor médio e o desvio padrão dos  $\tau$ s obtidos no ajuste de cada curva. Estes valores encontram-se representados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores experimentais do tempo de difusão para cada tratamento.

<b>Solução (%)</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>600</b>	<b>620</b>	<b>640</b>	<b>660</b>	<b>680</b>	<b>700</b>	<b>720</b>	<b>740</b>	<b>760</b>	<b>780</b>	<b>800</b>
<b>20</b>	$\tau$ (s)	69.43	76.01	70.02	67.2	72.82	73.22	73.98	74.6	63.73	70.0	66.45
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	70.67 $\pm$ 3.82										
<b>25</b>	$\tau$ (s)	86.74	85.17	83.55	82.19	81.01	79.66	78.24	76.75	75.36	74.15	73.09
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	79.63 $\pm$ 4.33										
<b>30</b>	$\tau$ (s)	105.0	101.6	97.90	95.06	92.70	90.10	87.10	84.05	81.30	79.00	77.35
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	90.11 $\pm$ 8.82										
<b>35</b>	$\tau$ (s)	175.2	170.9	165.7	161.5	159.2	155.8	151.3	147.5	145.2	142.4	138.6
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	155.75 $\pm$ 11.38										
<b>40</b>	$\tau$ (s)	256.2	246.7	237.5	231.0	227.7	220.8	211.6	206.6	205.0	198.4	188.9
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	220.95 $\pm$ 20.02										
<b>45</b>	$\tau$ (s)	169.4	167.3	166.8	167.0	168.1	168.7	168.4	168.4	169.7	170.6	170.5
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	168.63 $\pm$ 1.25										
<b>50</b>	$\tau$ (s)	105.2	104.1	103.0	101.9	101.0	99.91	98.88	97.90	97.05	96.37	95.73
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	100.09 $\pm$ 3.06										
<b>55</b>	$\tau$ (s)	76.06	75.31	74.75	74.16	73.53	72.98	72.36	71.70	71.02	70.52	70.15
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	72.96 $\pm$ 1.90										
<b>60</b>	$\tau$ (s)	62.39	61.65	60.92	60.29	59.71	59.15	58.52	57.80	57.13	56.73	56.23
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	59.14 $\pm$ 1.96										

Considerando os valores médios e os desvios padrão apresentados na Tabela 4, representaram-se esses valores em função da concentração de glicerina em solução, para se ver a dependência entre ambos. A Fig. 21 mostra esse gráfico, onde se ajustou uma *spline* que passa pelos pontos médios.

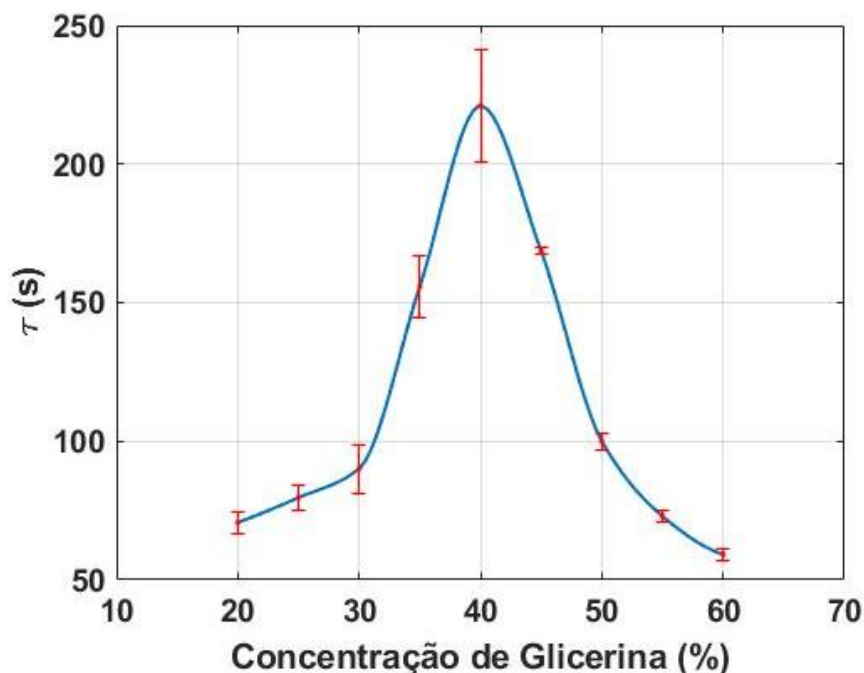


Figura 21: Tempos de difusão da glicerina com diferentes osmolaridades.

Considerando a dependência entre  $\tau$  e a concentração de glicerina em solução, verifica-se que ocorre um valor máximo para a concentração de 40.2%. Nesta situação e por existir um equilíbrio entre a água na solução e a água móvel dentro do tecido, apenas ocorre difusão de glicerina da solução de tratamento para o interior do tecido [79,80]. Isto significa que o valor da fração em volume da água móvel no pâncreas é de 59.8%, um valor até agora desconhecido. O valor máximo de  $\tau$  que ocorre a essa concentração ( $\tau = 220.8$  s) corresponde ao real tempo de difusão da glicerina nos tecidos do pâncreas, uma vez que, para este tratamento em particular, apenas ocorre o fluxo de glicerina para o interior do tecido. Situações semelhantes foram observadas noutros tecidos e com outros agentes, o que mostra que o conteúdo de cerca de 60% de água móvel é um valor mais ou menos constante nos diferentes tecidos biológicos saudáveis [79,80,81,92].

Para o tratamento com 60% de glicerina, dada a grande concentração de moléculas de glicerina em solução, forma-se uma elevada pressão osmótica sobre o tecido. Esta pressão osmótica elevada leva a uma forte e rápida desidratação do tecido, pelo que o valor de  $\tau$  obtido para este tratamento corresponde ao tempo de difusão da água. Do gráfico da Fig. 21 verifica-se que esse valor é de 59.14 s.

Após terem sido obtidos os valores dos tempos de difusão característicos dos mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs, é agora necessário calcular os correspondentes coeficientes de difusão. Para se proceder a este cálculo com a Eq. (18), foi necessário realizar medições de espessura de tecidos de pâncreas durante os tratamentos com 40% e 60%. Foram realizados três estudos com cada uma destas concentrações de glicerina em solução, de forma a se obter uma média e o respetivo desvio padrão. Após serem feitos estes estudos e considerando os tratamentos para cada concentração de glicerina, criou-se uma *spline* que passava pelos valores médios de espessura dos tecidos de forma a se poder avaliar qual a espessura que os tecidos têm ao fim do mesmo tempo que corresponde ao  $\tau$  obtido para cada um dos tratamentos. A Fig. 22 apresenta esses resultados.

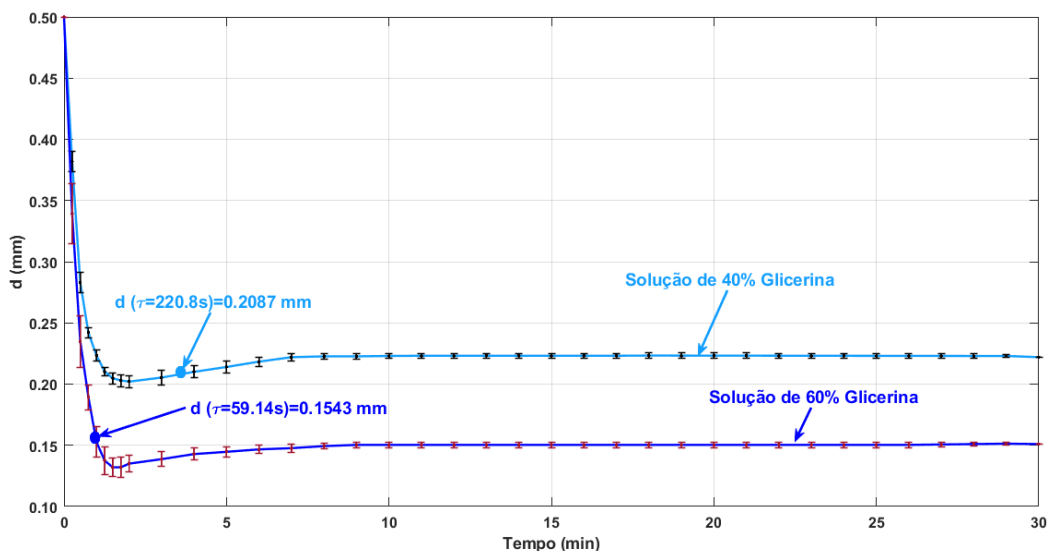


Figura 22: Variação da espessura das amostras de tecido do pâncreas em função do tempo para soluções de glicerina com concentrações de 40% e de 60%.

Das curvas representadas na Fig. 22, retiraram-se as espessuras dos tecidos nos instantes de tempo de tratamento que correspondem aos tempos de difusão obtidos da

Fig. 21: 0.2087 mm a  $t = 220.8$  s para o tratamento de 40% de glicerina e 0.1543 mm a  $t = 59.14$  s para o tratamento com 60% de glicerina. Usando estes valores (convertidos para cm) na Eq. (18), foram calculados os coeficientes de difusão da glicerina e da água no pâncreas, tal como representados nas Eqs. (27) e (28), respetivamente.

$$D_g = \frac{d^2}{\pi^2 \tau_g} = \frac{0.02087^2}{\pi^2 \times 220,8} = 1,999 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (27)$$

$$D_a = \frac{d^2}{\pi^2 \tau_a} = \frac{0.01543^2}{\pi^2 \times 59,14} = 4.079 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (28)$$

Considerando os valores obtidos para os coeficientes de difusão da glicerina e da água no pâncreas, podemos tentar fazer uma comparação com resultados análogos, que foram obtidos para outros tecidos. No caso da água, o valor de  $D_a$  obtido é de cerca de 10× superior ao obtido para músculo esquelético quando em tratamento com frutose ou propileno glicol, para músculo colorretal quando em tratamento com glicerina, para fígado humano quando em tratamento com glicerina ou para mucosa colorretal normal e patológica quando em tratamentos com glucose – todos da ordem de  $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  [81]. Embora nestes tratamentos se tenham obtido tempos de difusão semelhantes ao obtido no presente estudo para a água no pâncreas, a diferente constituição interna dos tecidos pode originar variações de espessura distintas, o que se traduz na diferença observada para os valores de  $D_a$ . No caso do valor de  $D_g$  obtido para a glicerina no pâncreas, verifica-se ser comparável aos obtidos para outros tecidos. Considerando em particular os tratamentos de glicerina aplicados a músculo colorretal e a fígado humano, obtiveram-se os valores de  $3.3 \times 10^{-7}$  e de  $8.2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ , respetivamente [81]. Estes valores mostram que a difusão da glicerina nestes tecidos está limitada por membranas nos tecidos e que as suas permeabilidades condicionam a difusão da glicerina, originando diferentes valores de  $D_g$  em diferentes tecidos.

---

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

---

## 5. Conclusão

O presente trabalho que consistiu no estudo das propriedades óticas espectrais e na determinação das propriedades de difusão da água e da glicerina num tecido como o pâncreas demonstrou-se bastante estimulante, dado ser um tecido biológico praticamente desconhecido no campo da ótica médica.

Utilizando a montagem de reflexão interna total para obter dados discretos do IR, que foram posteriormente complementados com a determinação da dispersão ótica por intermédio do espectro de  $\mu_a$ , conseguiu-se calcular a dispersão do pâncreas de coelho numa banda espectral ótica alargada, desde o UV até ao IV. Apesar de existirem poucos dados na literatura, esse processo demonstrou-se fiável, uma vez que o valor de IR do pâncreas obtido a 632 nm é praticamente coincidente com o pâncreas suíno a 20 °C.

Utilizando medições espectrais de amostras de tecido do pâncreas, foi possível calcular os espectros das diferentes propriedades óticas, que apresentam semelhança com outros resultados obtidos de outros tecidos moles e estão de acordo com as equações apresentadas na literatura. No caso particular do espectro de  $\mu_a$ , e como os tecidos usados foram recolhidos de coelhos adultos, verificou-se a existência de melanina e de lipofuscina, pigmentos que se costumam acumular durante o processo de envelhecimento dos tecidos. Em fase destes resultados e sabendo da literatura que estes pigmentos se acumulam de forma diferenciada em tecidos normais e patológicos, seria interessante poder-se realizar a avaliação do seu conteúdo em tecidos do pâncreas em diferentes idades e também em tecidos patológicos para comparação. Talvez o conteúdo de melanina e de lipofuscina possa ser um marcador ótico que permita avaliar o envelhecimento dos tecidos do pâncreas e discriminar patologias.

Aplicando tratamentos de transparência com soluções de glicerina em diferentes osmolaridades foi possível pela primeira vez avaliar as propriedades de difusão da água e da glicerina em tecidos do pâncreas. Tais propriedades caracterizam os dois mecanismos de criação de transparência – o mecanismo de desidratação e o mecanismo de adaptação de IRs. Embora se possam vir a desenvolver outros estudos semelhantes para avaliar as propriedades de difusão de outros agentes nos tecidos do pâncreas, ficou ainda por avaliar o terceiro mecanismo de transparência – a dissociação de proteínas. Tal estudo seria interessante de realizar tanto em tecidos do pâncreas saudáveis, como com patologia, para avaliar diferenças. Relativamente aos tempos de difusão obtidos para o pâncreas, estes

---

são semelhantes aos observados para a água e para a glicerina noutros tecidos. O mesmo acontece para o coeficiente de difusão da glicerina, que é da mesma ordem de grandeza ao observado noutros estudos para tecidos do fígado e do musculo colorretal humano. Quanto ao coeficiente de difusão da água, este apresenta uma ordem de grandeza superior a outros valores reportados para outros tecidos, mas tal diferença pode ser justificada pela constituição e organização fisiológica interna do pâncreas, que pode dar origem a variações de espessura dos tecidos distintas de outros tecidos durante os tratamentos de transparência aplicados.

A metodologia experimental adotada no presente trabalho é de fácil compreensão e pode ser aplicada no estudo com outros tecidos diferentes, tanto em versão saudável como em versão patológica, o que permitirá a comparação de resultados e obtenção de potenciais parâmetros de diagnóstico, como já foi demonstrado em alguns casos publicados. Assim, pretende-se continuar a realizar estes procedimentos para outro tipo de tecidos, normais e patológicos, utilizando, também, agentes de transparência distintos, para comparação, uma vez que são de extrema importância para estimação e conhecimento das características das propriedades de diversos tecidos biológicos.



---

## Referências

- [1] B. Lewis and J. Mao, “Development of the Pancreas and Related Structures,” in *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine and Surgery*, 3 Ed., Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018.
- [2] A. P. Klein, “Pancreatic cancer: a growing burden,” *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, vol. 4, no. 12. Elsevier Ltd, pp. 895–896, Dec. 01, 2019.
- [3] S. Mohammed, G. Van Buren, and W. E. Fisher, “Pancreatic cancer: Advances in treatment,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 28, pp. 9354–9360, Jul. 2014.
- [4] D. P. Ryan, T. S. Hong, and N. Bardeesy, “Pancreatic Adenocarcinoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, no. 11, pp. 1039–1049, Sep. 2014.
- [5] J. M. Albores S, J.; Adsay, N. V.; Crawford, “WHO classification of Tumours. Digestive System Tumours,” *Who*, no. 4, 2010.
- [6] K. Yamaguchi *et al.*, “Clinical practice guidelines for pancreatic cancer 2016 from the pancreas society: A synopsis,” *Pancreas*, vol. 46, no. 5, pp. 595–604, 2017.
- [7] H. H. Joo, M. J. Cobb, M. B. Kimmey, and X. Li, “Optical coherence tomography imaging of the pancreas: A needle-based approach,” in *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Jul. 2005, vol. 3, no. 7 SUPPL., pp. S49–S52.
- [8] S. Y. Lee *et al.*, “Characterizing human pancreatic cancer using quantitative tissue optical spectroscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 12, p. 2828, Dec. 2013.
- [9] R. H. Wilson *et al.*, “Optical spectroscopy detects histological hallmarks of pancreatic cancer,” *Opt. Express*, vol. 17, no. 20, p. 17502, Sep. 2009.
- [10] V. V. Tuchin, *Optical clearing of tissues and blood*. Bellingham Wash.: SPIE, 2006.
- [11] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, “The Optical Clearing Method,” *Part SpringerBriefs Phys. B. Ser. (SpringerBriefs Physics)*, 2019.
- [12] J. Lai, Z. Li, C. Wang, and A. He, “Experimental measurement of the refractive index of biological tissues by total internal reflection,” in *Applied Optics*, Apr. 2005, vol. 44, no. 10, pp. 1845–1849.
- [13] V. V Tuchin, “Light scattering study of tissues,” *Physics-Uspekhi*, vol. 40, no. 5,

- 
- pp. 495–515, May 1997.
- [14] V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE), 2015.
- [15] “Biomedical Photonics Handbook: Biomedical Diagnostics - 2nd Edition -,” 2003.  
.
- [16] O. A. Smolyanskaya *et al.*, “Terahertz biophotonics as a tool for studies of dielectric and spectral properties of biological tissues and liquids,” *Progress in Quantum Electronics*, vol. 62. Elsevier Ltd, pp. 1–77, Nov. 01, 2018.
- [17] K. I. Zaytsev, A. A. Gavdush, N. V. Chernomyrdin, and S. O. Yurchenko, “Highly Accurate in Vivo Terahertz Spectroscopy of Healthy Skin: Variation of Refractive Index and Absorption Coefficient Along the Human Body,” *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.*, vol. 5, no. 5, pp. 817–827, Sep. 2015.
- [18] S. Carvalho, I. Carneiro, R. Henrique, V. Tuchin, and L. Oliveira, “Lipofuscin-type pigment as a marker of colorectal cancer,” *Electron.*, vol. 9, no. 11, pp. 1–14, Nov. 2020.
- [19] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Measuring optical properties of human liver between 400 and 1000 nm,” *Quantum Electron.*, vol. 49, no. 1, pp. 13–19, Jan. 2019.
- [20] I. Y. Yanina, E. N. Lazareva, and V. V. Tuchin, “Refractive index of adipose tissue and lipid droplet measured in wide spectral and temperature ranges,” *Appl. Opt.*, vol. 57, no. 17, p. 4839, Jun. 2018.
- [21] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Measurement of optical properties of normal and pathological human liver tissue from deep-UV to NIR,” in *Tissue Optics and Photonics*, Apr. 2020, vol. 11363, p. 16.
- [22] O. Sydoruk, O. Zhernovaya, V. Tuchin, and A. Douplik, “Refractive index of solutions of human hemoglobin from the near-infrared to the ultraviolet range: Kramers-Kronig analysis,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 11, p. 115002, Nov. 2012.
- [23] J. Gienger, H. Gross, J. Neukammer, and M. Bär, “Determining the refractive index of human hemoglobin solutions by kramers-kronig relations with an

- improved absorption model,” *arXiv*, vol. 55, no. 31. arXiv, pp. 8951–8961, Nov. 02, 2017.
- [24] J. J. J. Dirckx, L. C. Kuypers, and W. F. Decraemer, “Refractive index of tissue measured with confocal microscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 4, p. 044014, 2005.
- [25] Z. Wang, “Tissue refractive index as marker of disease,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 11, p. 116017, Nov. 2011.
- [26] Y. Zhou, K. K. H. Chan, T. Lai, and S. Tang, “Characterizing refractive index and thickness of biological tissues using combined multiphoton microscopy and optical coherence tomography,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 1, p. 38, Jan. 2013.
- [27] J. Sun, S. J. Lee, L. Wu, M. Sarntinoranont, and H. Xie, “Refractive index measurement of acute rat brain tissue slices using optical coherence tomography,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 2, p. 1084, Jan. 2012.
- [28] R. Khan, B. Gul, S. Khan, H. Nisar, and I. Ahmad, “Refractive index of biological tissues: Review, measurement techniques, and applications,” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 33. Elsevier B.V., p. 102192, Mar. 01, 2021.
- [29] H. Li and S. Xie, “Measurement method of the refractive index of biotissue by total internal reflection,” *Appl. Opt.*, vol. 35, no. 10, p. 1793, Apr. 1996.
- [30] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. Tuchin, “Water Content and Scatterers Dispersion Evaluation in Colorectal Tissues,” *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 3, no. 4, p. 040301, Dec. 2017.
- [31] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira, and V. Tuchin, “Wavelength dependence of the refractive index of human colorectal tissues: comparison between healthy mucosa and cancer,” *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 2, no. 4, p. 040307, Dec. 2016.
- [32] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Simple multimodal optical technique for evaluation of free/bound water and dispersion of human liver tissue,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, no. 12, 2017.
- [33] H. Ding, J. Q. Lu, K. M. Jacobs, and X.-H. Hu, “Determination of refractive indices of porcine skin tissues and Intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 22, no. 6, p. 1151, Jun. 2005.

- 
- [34] H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel, and X. H. Hu, "Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm," *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, no. 6, pp. 1479–1489, Mar. 2006.
- [35] J. Wang *et al.*, "Measurement of the refractive index of hemoglobin solutions for a continuous spectral region," *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 7, p. 2536, Jul. 2015.
- [36] Z. Deng *et al.*, "Determination of continuous complex refractive index dispersion of biotissue based on internal reflection," *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 1, p. 015003, Jan. 2016.
- [37] J. C. Lai, Y. Y. Zhang, Z. H. Li, H. J. Jiang, and A. Z. He, "Complex refractive index measurement of biological tissues by attenuated total reflection ellipsometry," *Appl. Opt.*, vol. 49, no. 16, pp. 3235–3238, Jun. 2010.
- [38] M. Matiatou, P. Giannios, S. Koutsoumpos, K. G. Toutouzas, G. C. Zografos, and K. Moutzouris, "Data on the refractive index of freshly-excised human tissues in the visible and near-infrared spectral range," *Results Phys.*, vol. 22, p. 103833, Mar. 2021.
- [39] P. Giannios *et al.*, "Visible to near-infrared refractive properties of freshly-excised human-liver tissues: Marking hepatic malignancies," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, Jun. 2016.
- [40] P. Giannios, S. Koutsoumpos, K. G. Toutouzas, M. Matiatou, G. C. Zografos, and K. Moutzouris, "Complex refractive index of normal and malignant human colorectal tissue in the visible and near-infrared," *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 2, pp. 303–310, Feb. 2017.
- [41] S. L. Jacques, "Optical properties of biological tissues: A review," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 58, no. 11. IOP Publishing, p. R37, Jun. 07, 2013.
- [42] F. Carpignano, G. Rigamonti, G. Mazzini, and S. Merlo, "Low-coherence reflectometry for refractive index measurements of cells in micro-capillaries," *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 10, Oct. 2016.
- [43] Z. Turani, E. Fatemizadeh, Q. Xu, S. Daveluy, D. Mehregan, and M. Nasiriavanaki, "Refractive index correction in optical coherence tomography

- images of multilayer tissues,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 07, p. 1, Jul. 2018.
- [44] E. N. Lazareva *et al.*, “Refractive index measurements of tissue and blood and OCAS in a wide spectral range,” *Tissue Opt. Clear. new Prospect. Opt. imaging*.
- [45] A. Knüttel and M. Boehlau-Godau, “Spatially confined and temporally resolved refractive index and scattering evaluation in human skin performed with optical coherence tomography,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 5, no. 1, p. 83, 2000.
- [46] J. C. Lai, Z. H. Li, and A. Z. He, “Influence of complex refractive index on diffuse reflection of biological tissues,” *Chinese Phys. Lett.*, vol. 22, no. 2, pp. 332–334, Feb. 2005.
- [47] *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics, Second Edition, Volume 2: Methods*. SPIE, 2017.
- [48] T. Vo-Dinh, “Biomedical photonics: A revolution at the interface of science and technology,” in *Biomedical Photonics: Handbook*, 2nd ed., T. Vo-Dinh, Ed. CRC Press, 2014, pp. 1–22.
- [49] L. M. Oliveira, K. Zaytsev, and V. V. Tuchin, “Improved biomedical imaging over a wide spectral range from UV to THz towards multimodality,” in *SPIE*, Oct. 2020, vol. 11585, p. 20.
- [50] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, M. D. Kozintseva, V. I. Kochubei, S. Y. Gorodkov, and V. V. Tuchin, “Optical properties of peritoneal biological tissues in the spectral range of 350–2500 nm,” *Opt. Spectrosc. (English Transl. Opt. i Spektrosk.)*, vol. 120, no. 1, 2016.
- [51] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, V. S. Rubtsov, E. A. Kolesnikova, and V. V. Tuchin, “Optical properties of human colon tissues in the 350 – 2500 nm spectral range,” *Quantum Electron.*, vol. 44, no. 8, 2014.
- [52] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, “Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 38, no. 15, 2005.
- [53] A. N. Bashkatov, É. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, “Optical properties of the subcutaneous adipose tissue in the spectral range 400-2500 nm,” *Opt. Spectrosc. (English Transl. Opt. i Spektrosk.)*, vol. 99, no. 5, 2005.

- 
- [54] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, "Optical properties of human cranial bone in the spectral range from 800 to 2000 nm," 2006.
- [55] A. N. Bashkatov *et al.*, "Optical properties of human stomach mucosa in the spectral range from 400 to 2000 nm: Prognosis for gastroenterology," *Med. Laser Appl.*, vol. 22, no. 2, 2007.
- [56] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, "Optical properties of human sclera in spectral range 370-2500 nm," *Opt. Spectrosc. (English Transl. Opt. i Spektrosk.)*, vol. 109, no. 2, 2010.
- [57] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, "Comparative study of the optical properties of colon mucosa and colon precancerous polyps between 400 and 1000 nm," in *Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XIV*, 2017, vol. 10063.
- [58] L. Oliveira, I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, and V. V. Tuchin, "Optical properties of colorectal muscle in visible/NIR range," 2018.
- [59] 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, Jul. 2021.
- [60] L. Oliveira and V. V. Tuchin, "Optical clearing for cancer diagnostics and monitoring," in *Tissue optical clearing: new prospects in optical imaging*, D. Zhu, E. Genina, and V. V. Tuchin, Eds. CRC Press, 2021.
- [61] 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, Sep. 2016.
- [62] W. Spalteholz, *Über Das Durchsichtigmachen von Menschlichen Unde Tierischen Präparaten unde Seine Theoretischen Bedingungen, Nebst Anhang: Über Knochenfärbung*. Leipzig, Germany: S. Hirszel, 1911.
- [63] W. Spalteholz, *Über Das Durchsichtigmachen von Menschlichen Unde Tierischen Präparaten unde Seine Theoretischen Bedingungen, Nebst Anhang: Über Knochenfärbung*. Leipzig, Germany: S. Hirszel, 1914.
- [64] 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.

- [65] V. V. Tuchin et al, "Light propagation in tissues with controlled optical properties," *J. Biomed. Opt.* 2(4), pp. 401–417, 1997.
- [66] 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, Jul. 2021.
- [67] I. Carneiro, S. Carvalho, V. Silva, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, "Kinetics of optical properties of human colorectal tissues during optical clearing: a comparative study between normal and pathological tissues," *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 12, p. 1, Dec. 2018, doi: 10.1117/1.jbo.23.12.121620.
- [68] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, "Kinetics of Optical Properties of Colorectal Muscle During Optical Clearing," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 25, no. 1, 2019, doi: 10.1109/JSTQE.2018.2840346.
- [69] V. V. Tuchin, *Optical Clearing of Tissues and Blood*. Bellingham, USA: SPIE Press, 2006.
- [70] A. Y. Sdobnov, M. E. Darvin, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, J. Lademann, and V. V. Tuchin, "Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 197, pp. 216–229, May 2018.
- [71] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Y. P. Sinichkin, I. Y. Yanina, and V. V. Tuchin, "Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy," *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 22–58, Mar. 2015.
- [72] 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.
- [73] N. Gomes, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, "Uv-nir efficiency of the refractive index matching mechanism on colorectal muscle during treatment with different glycerol osmolarities," *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 6, no. 2, pp. 1–13, Jun. 2020.
- [74] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, "Glucose diffusion in colorectal mucosa—a comparative study between normal

- 
- and cancer tissues,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, no. 9, p. 091506, Feb. 2017.
- [75] “RefractiveIndex.INFO - Refractive index database.” <https://refractiveindex.info/> (accessed Jun. 17, 2021).
- [76] Q. W. Song, C.-Y. Ku, C. Zhang, and R. Michalak, “Modified critical angle method for measuring the refractive index of bio-optical materials and its application to bacteriorhodopsin,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 12, no. 5, p. 797, May 1995.
- [77] I. Martins, H. Silva, V. V. Tuchin, and L. Oliveira, “Estimation of Rabbit Pancreas Dispersion Between 400 and 1000 nm Estimation of Rabbit Pancreas Dispersion Between 400 and 1000 nm,” *J Biomed. Photonics Eng*, vol. 7, no. 2, p. 020303, May 2021, doi: 10.18287/JBPE21.07.020303.
- [78] “Refractive Index of Glycerine-Water Solutions at 20°C (69°F).” [http://edge.rit.edu/edge/P13051/public/Research Notes/refractive index glycerin water.pdf](http://edge.rit.edu/edge/P13051/public/Research%20Notes/refractive%20index%20glycerin%20water.pdf) (accessed Jun. 17, 2021).
- [79] 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, 2014.
- [80] 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, Jul. 2013.
- [81] 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, Apr. 2019.
- [82] 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,” in *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*, Springer International Publishing, 2020, pp. 107–131.
- [83] M. T. Jansen, “On the refractive index of histological tissue sections in visible and in ultraviolet light,” *Exp. Cell Res.*, vol. 15, no. 1, 1958.
- [84] 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.
- [85] V. V. Tuchin, “Lasers and Fiber Optics in Biomedical Investigations,” (Sarat. Gos. Univ., Saratov, 1998) [in Russian].
- [86] L. Fernandes *et al.*, “Diffuse reflectance and machine learning techniques to differentiate colorectal cancer *ex vivo*,” *Chaos An Interdiscip. J. Nonlinear Sci.*, vol. 31, no. 5, p. 053118, May 2021, doi: 10.1063/5.0052088.
- [87] J. J. Hunter, J. I. W. Morgan, W. H. Merigan, D. H. Sliney, J. R. Sparrow, and D. R. Williams, “The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light,” *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 31, no. 1. Prog Retin Eye Res, pp. 28–42, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.001.
- [88] M. E. Gosnell, A. G. Anwer, J. C. Cassano, C. M. Sue, and E. M. Goldys, “Functional hyperspectral imaging captures subtle details of cell metabolism in olfactory neurosphere cells, disease-specific models of neurodegenerative disorders,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1863, no. 1, pp. 56–63, 2016, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.030.
- [89] L. Feeney-Burns, E. S. Hilderbrand, and S. Eldridge, “Aging human RPE: Morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 25, no. 2, pp. 195–200, 1984.
- [90] G. Zonios, A. Dimou, I. Bassukas, D. Galaris, A. Tsolakidis, and E. Kaxiras, “Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 1, p. 014017, 2008, doi: 10.1117/1.2844710.
- [91] M. B. Rózanowska, A. Pawlak, and B. Rózanowski, “Products of docosahexaenoate oxidation as contributors to photosensitising properties of retinal lipofuscin,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, Apr. 2021, doi: 10.3390/ijms22073525.
- [92] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “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.