



## Caracterização de agentes de transparência

**DANIELA SILVA TEIXEIRA**

outubro de 2022

# **Caracterização de agentes de transparência**

**Daniela Silva Teixeira**

Licenciada em Tecnologia Biomédica pelo Instituto Politécnico de Bragança

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

Orientador: Professor Luís Oliveira

**Setembro 2022**



*“A educação é o passaporte para o futuro, pois o amanhã pertence  
a quem se prepara hoje.”*

Malcolm X



## **Agradecimentos**

Durante dois anos fui aluna no Instituto Superior de Engenharia do Porto e, agora, posso dizer que ainda bem que o fui. Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de uma forma direta ou indireta, permitiram que esta tese se realizasse.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, carinho, motivação e presença ao longo de todo o meu percurso académico. Aos restantes familiares e namorado reconheço todo o apoio e ajuda.

Aos meus melhores amigos por terem estado presentes em mais uma etapa da minha vida, pelos conselhos, pela compreensão e pela paciência. Aos amigos que fiz aqui agradeço a ajuda, o apoio e o facto de terem enfrentado todos os obstáculos comigo.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto por me ter acolhido e pelas memórias criadas.

Ao meu orientador, professor Luís Oliveira, pelo apoio, empenho e disponibilidade demonstrados.



## Resumo

A criação de efeitos de transparência em tecidos biológicos é uma área recente de investigação que tem por objetivo superar o forte espalhamento da luz que é característico dos tecidos naturais para poder otimizar a aplicação de procedimentos clínicos de diagnóstico e de tratamento que utilizem a luz. Se durante os últimos 30 anos a investigação nesta área foi intensa, com a descoberta de certos agentes inócuos e capazes de criar transparência em tecidos, há ainda outros produtos naturais que poderão ser potenciais agentes de transparência e que precisam de ser estudados. As características desejáveis para que um determinado agente possa criar transparência em tecidos são conhecidas e apenas com a verificação da existência de tais características num determinado agente, este pode ser aceite e utilizado na criação de transparência em tecidos biológicos. O presente estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar certos agentes de transparência já reconhecidos e alguns óleos de produtos naturais que são vendidos para aplicações cosméticas e culinárias e que apresentam um elevado índice de refração a 589,6 nm. A caracterização destes líquidos consistiu na medição dos seus índices de refração a vários comprimentos de onda para criar a sua curva de dispersão entre 200 e 1000 nm, na medição dos seus espectros de transmitância colimada para identificar as suas bandas de absorção e na realização de tratamentos de tecido músculo-esquelético com cada um dos líquidos para avaliar se criam transparência ou não. Em termos de dispersões, verificou-se que todos os óleos apresentavam elevados valores em todo o espectro, sendo sempre superiores aos obtidos para os agentes de transparência já reconhecidos que foram também estudados. No entanto, durante a avaliação dos espectros medidos dos líquidos em estudo verificou-se que todos os óleos apresentam as suas bandas de absorção na zona do ultravioleta, sendo a absorção determinada de 100 % e com uma largura espectral significativa. Tal facto é um sério inconveniente para a criação de transparência em tecidos biológicos. Como resultado dos tratamentos aplicados com estes óleos em amostras de músculo, verificou-se que alguns deles podem ser úteis se combinados com certos agentes de transparência, uma vez que poderão induzir uma rápida desidratação do tecido, aumentar a permeabilidade à difusão do agente de transparência, ou até mesmo dissociar proteínas, que é um dos mecanismos que contribui para a criação de transparência nos tecidos biológicos.

**Palavras-chave:** tecido músculo-esquelético, agentes de transparência, transparência ótica, índices de refração, curvas de dispersão, bandas de absorção, transmitância colimada, eficiência de transparência.

## **Abstract**

The creation of transparency effects in biological tissues is a recent research field that aims to overcome the strong light scattering that is characteristic in natural tissues to optimize the application of clinical diagnostic and treatment procedures that use light. Although during the last 30 years, research in this area has been intense, with the discovery of certain innocuous agents that are capable of creating transparency in tissues, there are still other natural products that could be potential clearing agents and that need to be studied. The desirable characteristics for a given agent to create transparency in tissues are known and only with the verification that such agent has those characteristics, it can be accepted and used to create transparency in biological tissues. The present study was carried out with the objective of characterizing certain already recognized transparency agents and some oils from natural products that are sold for cosmetic and culinary applications and that have a high refractive index at 589.6 nm. The characterization of these liquids consisted of measuring their refractive indices at various wavelengths to create their dispersion curve between 200 and 1000 nm, measuring their collimated transmittance spectra to identify their absorption bands and performing treatments on musculoskeletal tissue samples with each of the liquids to assess whether they create transparency or not. In terms of dispersions, it was found that all oils had high values across the entire spectrum, always being higher than those obtained for the already recognized transparency agents that were also studied. However, during the evaluation of the measured spectra of the liquids under study, it was found that all the oils present their absorption bands in the ultraviolet range, with the evaluated absorption being 100 % within a significant spectral width. This fact is a serious inconvenience for creating transparency in biological tissues. As a result of the treatments applied with these oils in muscle samples, it was found that some of them can be useful if combined with certain transparency agents, since they can induce a rapid dehydration of the tissue, increase the permeability to the diffusion of the transparency agent, or even dissociating proteins, which is one of the mechanisms that contributes to the creation of transparency in biological tissues.

**Key words:** musculoskeletal tissue, optical clearing agents, optical transparency, refractive indices, dispersion curves, absorption bands, collimated transmittance, transparency efficiency.

# Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VII
ÍNDICE.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XV
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO .....	3
1.2. MOTIVAÇÃO .....	5
1.3. OBJETIVOS.....	6
1.4. ESTRUTURA DO DOCUMENTO .....	7
2. ESTADO DA ARTE .....	11
2.1. PROPRIEDADES ÓTICAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS .....	11
2.2. TRATAMENTOS DE TRANSPARÊNCIA E SUAS VANTAGENS.....	12
2.3. CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS PARA AGENTES DE TRANSPARÊNCIA .....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. LÍQUIDOS A ESTUDAR .....	19
3.2. AVALIAÇÃO DAS DISPERSÕES DOS AGENTES.....	21
3.3. AVALIAÇÃO DOS ESPETROS DE ABSORÇÃO DOS LÍQUIDOS .....	23
3.4. ESTUDO DOS TRATAMENTOS E AVALIAÇÃO DAS EFICIÊNCIAS DOS AGENTES .....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1. ESTUDOS DE IR E ESTIMAÇÃO DAS CURVAS DE DISPERSÃO DOS LÍQUIDOS .....	29
4.2. ESTUDO DAS BANDAS DE ABSORÇÃO DOS LÍQUIDOS.....	33
4.3. ESTUDOS DE TRANSPARÊNCIA EM MÚSCULO-ESQUELÉTICO .....	39
5. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS .....	63



## Lista de Figuras

<b>Figura 3.1</b> - Montagem experimental para medir o IR de um líquido pelo método do ângulo de desvio mínimo.....	22
<b>Figura 4.1</b> - Curvas de dispersão calculadas para os líquidos em estudo: glicerina (a), propileno glicol (b), etilenoglicol (c), glucose-54 % (d) e <i>e-Cig</i> (e).....	30
<b>Figura 4.2</b> - Curvas de dispersão calculadas para os líquidos em estudo: óleo de amêndoa (f), óleo de canela (g), óleo de cravo (h), óleo de anis (i) e óleo de rícino (j). 31	
<b>Figura 4.3</b> - Curvas de dispersão de todos os líquidos em estudo e da água. ....	33
<b>Figura 4.4</b> - Espectro de $T_c$ para os líquidos em estudo: glicerina (a), propileno glicol (b), etilenoglicol (c), glucose-54 % (d) e <i>e-Cig</i> (e). ....	34
<b>Figura 4.5</b> – Espectro de $T_c$ para os líquidos em estudo: óleo de amêndoa (f), óleo de canela (g), óleo de cravo (h), óleo de anis (i) e óleo de rícino (j).....	35
<b>Figura 4.6</b> - Espectros de $T_c$ para todos os líquidos em estudo. ....	38
<b>Figura 4.7</b> - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com uma solução de glicerina – 99 %, mostrando a evolução temporal do espectro de $T_c$ (a), a evolução do espectro de $OC_{\text{eff}}$ (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).....	40
<b>Figura 4.8</b> - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com etilenoglicol, mostrando a evolução temporal do espectro de $T_c$ (a), a evolução do espectro de $OC_{\text{eff}}$ (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d). ....	41
<b>Figura 4.9</b> - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com propileno glicol, mostrando a evolução temporal do espectro de $T_c$ (a), a evolução do espectro de $OC_{\text{eff}}$ (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).....	43
<b>Figura 4.10</b> - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com solução de glucose a 54 %, mostrando a evolução temporal do espectro de $T_c$ (a), a evolução do espectro de $OC_{\text{eff}}$ (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d). ....	44
<b>Figura 4.11</b> - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com <i>e-Cig</i> , mostrando a evolução temporal do espectro de $T_c$ (a), a evolução do espectro de $OC_{\text{eff}}$ (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d). ....	46

**Figura 4.12** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de amêndoa, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d). . 47

**Figura 4.13** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de canela, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d). . 49

**Figura 4.14** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de cravo, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d)..... 51

**Figura 4.15** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de anis, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d)..... 53

**Figura 4.16** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de rícino, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d)..... 55

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 3.1</b> - Dados dos líquidos usados no presente estudo.....	20
<b>Tabela 3.2</b> - Dados dos lasers usados nas medições de IR dos agentes.....	23
<b>Tabela 4.1</b> – Valores experimentais dos IRs medidos para os diferentes líquidos a 20 °C. ....	29
<b>Tabela 5.1</b> - Quadro síntese. ....	60



## Lista de Abreviaturas

- nm - Nanómetros
- IR - Índice de refração
- OCA - Agente de transparência ótica (*Optical Clearing Agent*, do Inglês)
- e-Cig* - Fluido dos cigarros eletrônicos
- UV - Ultravioleta

## Lista de Símbolos

- $\mu_a$  - Coeficiente de absorção
- $\mu_s$  - Coeficiente de espalhamento
- $g$  - Anisotropia
- $\mu'_s$  - Coeficiente de espalhamento reduzido
- $\mu_t$  - Coeficiente de atenuação total
- $\delta$  - Profundidade de penetração da luz
- $T_c$  - Transmitância colimada
- $OC_{\text{eff}}$  - Eficiência do tratamento de transparência
- min - Minuto
- s - Segundos



## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO



## 1. Introdução

No âmbito da unidade curricular Tese do Mestrado em 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 avaliar o potencial de criação de efeitos de transparência de certos agentes químicos e óleos naturais e caracterizar algumas propriedades óticas desses produtos, como a sua dispersão e o seu espectro de absorção entre o ultravioleta (UV) profundo e o infravermelho.

As quatro secções do presente capítulo foram criadas para contextualizar o problema proposto, indicar as motivações e objetivos do trabalho realizado, e descrever a estrutura do presente documento.

### 1.1. Contextualização

Um dos principais objetivos da ótica médica é reduzir o forte espalhamento da luz que os tecidos apresentam, através da criação de efeitos de transparência, permitindo assim a aplicação de procedimentos clínicos de diagnóstico e de tratamento no seu interior, sem recurso a radiação ionizante [1–3].

Uma vez que os tecidos biológicos são materiais heterogéneos [4–6], compostos por vários componentes, como proteínas, lípidos e células, que são permeados por líquidos intersticiais, a diferença de índices de refração entre estes componentes está na origem do forte espalhamento que os tecidos apresentam [3, 6]. A razão para esta disparidade entre o índice de refração (IR) dos vários componentes de um tecido é que o líquido intersticial apresenta valores muito baixos devido ao elevado conteúdo de água (> 90 % em volume do líquido) [3, 6]. No interior das células acontece algo semelhante, pois os núcleos e os organelos, ou mesmo o ADN apresentam valores de IR elevados comparando com o IR do citoplasma, que mais uma vez é maioritariamente composto por água [6]. Quando um fotão transita entre um líquido e um outro componente biológico dentro do tecido, ocorre um forte espalhamento do fotão para uma direção distinta da sua direção original [3, 7].

Para reduzir ou mesmo eliminar totalmente este forte espalhamento, que é característico da maioria dos tecidos biológicos, utilizam-se os tratamentos de

transparência, que consistem numa troca temporária e reversível da água intersticial ou da água no citoplasma das células por um agente de transparência (OCA – *Optical Clearing Agent*, do Inglês), que apresenta um IR mais elevado do que a água, mais próximo do IR dos restantes componentes do tecido [1, 8].

Os tratamentos de transparência podem ser realizados tanto em tecidos *ex vivo*, como em tecidos *in vivo*, sendo o modo de administração do OCA, ou de uma solução aquosa deste, feito por imersão do tecido nessa solução ou por injeção direta com seringa e agulha da solução para o espaço intersticial do tecido [8]. Quando estes tratamentos são iniciados num determinado tecido, a transparência é criada por ação de três mecanismos, designados por: *desidratação do tecido*, *adaptação de índices de refração* e *dissociação de proteínas* [7, 9, 10]. Com a exceção do último mecanismo, que não é fácil de detetar e ocorre apenas em tecidos com conteúdo significativo de proteínas, os mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração ocorrem sempre em qualquer tecido e estão diretamente associados aos fluxos de água para o exterior do tecido em tratamento e do agente para o seu interior [9, 10]. Existem atualmente diversos OCAs com provas dadas na criação de transparência e outros que apresentam potencial para criar tal transparência em tecidos, mas que precisam de ser estudados e explorados [6]. Daqueles que já foram estudados e explorados, podemos distribuí-los em três classes distintas, de acordo com a sua natureza química ou aplicações em que são usados: os açúcares, os álcoois e as soluções eletrolíticas, que são produtos comerciais usados em radiologia [3]. Todos estes produtos apresentam elevado IR, significativamente superior ao da água e podem ser facilmente dissolvidos em água ou noutros solventes para criar transparências de menor magnitude se for esse o objetivo. No entanto, os agentes puros, ou soluções aquosas com elevada concentração do agente são os que apresentam maior osmolaridade e que dão origem a efeitos de transparência de forma mais rápida e com maior amplitude [9, 11].

Na atualidade, para além dos OCAs que se conhecem e que foram já testados exaustivamente em tecidos, existem outros produtos ou agentes, que por apresentarem certas características óticas favoráveis, como por exemplo um elevado IR [6], e por serem produtos comerciais para aplicações cosméticas ou similares, poderão ter potencial para criar efeitos de transparência em tecidos biológicos. O estudo de caracterização desses agentes ou produtos para identificar o seu real potencial de criação de transparência é urgente. São disto exemplo, alguns açúcares e alguns álcoois que, apesar de já terem sido

usados como agentes de transparência, não foram ainda estudados nem caracterizados ópticamente, e também óleos naturais que, produzidos a partir de plantas, sementes, frutos ou cereais, poderão ter potencial para este tipo de aplicações nos tecidos biológicos. As características desejáveis para potenciais OCAs são um elevado IR, especialmente na zona onde apresentam bandas de absorção desde o UV profundo até ao infravermelho (200 a 1000 nm), para garantir uma boa adaptação de índices de refração e forte osmolaridade para induzir uma forte desidratação do tecido [3]. Assim, torna-se importante avaliar a dispersão e o espectro de absorção de potenciais agentes de transparência nessa banda espectral, tal como a eficiência de transparência criada num determinado tecido. Exemplos de produtos que podem ter potencial de criação de transparência onde tal avaliação nunca foi feita são: os óleos de amêndoas, de anis, de canela, de cravo e de rícino. Para além destes, há agentes de transparência já reconhecidos como os álcoois glicerina, etilenoglicol e propileno glicol, ou os açúcares glucose, frutose e sacarose, que também carecem dessa caracterização ótica. Não menos importantes são as possíveis misturas destes e de outros agentes, existindo no mercado alguns produtos com potencial de criação de transparência que consistem nessas misturas. Uma delas que já demonstrou potencial de criação de transparência é o fluido dos cigarros eletrónicos [12], que consiste numa mistura que pode ter diferentes combinações de concentração volumétrica de glicerina e de propileno glicol.

## 1.2. Motivação

Tal como foi referido acima, existem diferentes OCAs que já foram utilizados para criar efeitos de transparência em vários tecidos, tendo demonstrado bons resultados. Não obstante desses bons resultados, tais agentes nunca foram caracterizados ópticamente, ou seja, nunca se avaliou a sua dispersão nem o espectro de absorção que apresentam entre o UV profundo e o infravermelho para identificar possíveis zonas do espectro onde o efeito de transparência criado por esses agentes possa ser deficiente. Tal falta de eficiência pode ocorrer no UV profundo, onde a maioria destes OCAs apresenta bandas de absorção [13]. Para esses casos, e considerando a diminuição da escala de comprimentos de onda, se o agente não tiver uma dispersão fortemente crescente na aproximação das suas bandas de absorção ou se estas forem de elevada magnitude, a eficiência de transparência criada nessa zona do espectro em qualquer tecido pode ser baixa, ou mesmo negativa [13],

tornando o tecido ainda mais opaco à passagem de luz. Por outro lado, estão atualmente disponíveis no mercado, e a custos pouco significativos, vários produtos que, por apresentarem valores de IR muito elevados, são potenciais agentes de transparência. Tais produtos são de fácil aquisição e a um custo reduzido e podem ser estudados para avaliar as suas características óticas e potencial de criação de transparência, nomeadamente a sua dispersão entre 200 e 1000 nm, o seu espectro de absorção na mesma banda espectral e o efeito de transparência que cria num determinado tecido para comparação com os resultados obtidos com OCAs já reconhecidos.

Este tipo de estudos tem alguma urgência em ser feito, no sentido de se poder reunir a informação em falta para os OCAs atualmente em uso e caracterizar de forma completa os potenciais agentes de transparência que existem no mercado. Só com esta informação disponível se pode fazer uma seleção do OCA adequado e um planeamento de tratamentos de transparência num determinado tecido e numa determinada zona espectral para que este seja otimizado.

### **1.3. Objetivos**

Em face do exposto na secção anterior, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar óticamente vários OCAs já reconhecidos, assim como outros produtos, que apesar de ainda não terem sido testados, apresentam algumas características que os tornam potenciais agentes de transparência.

Assim, e seleccionando o músculo-esquelético de coelho como tecido biológico de teste, foram feitos estudos de transparência para avaliar a eficiência de cada um com os OCAs: glicerina, etilenoglicol, propileno glicol, solução aquosa de glucose (54 % de volume em solução) e uma mistura contendo 70 % em volume de glicerina e 30 % em volume de propileno glicol, que é vulgarmente conhecida no mercado como líquido de cigarros eletrónicos (*e-Cig*). Para estes OCAs foi também feita a medição do seu espectro de transmitância colimada para avaliar onde ocorrem as bandas de absorção de cada um, assim como o cálculo da sua curva de dispersão entre 200 e 1000 nm, a partir de medições discretas de IR com lasers. Desta forma, a obtenção dos espectros de absorção e da dispersão de cada OCA, juntamente com a avaliação da eficiência de transparência num tecido, permite caracterizar cada um desses agentes com o objetivo do planeamento de futuros tratamentos a aplicar a tecidos biológicos.

Para além dos OCAs acima referidos e com o mesmo objetivo, foi feito um estudo semelhante para alguns produtos existentes no mercado, que apresentam elevado IR a 589,6 nm. Tais produtos, são essencialmente óleos de plantas naturais, que são vendidos para aplicações cosméticas ou de culinária. Dentro destes, os selecionados para estudar no presente trabalho foram: o óleo de amêndoas, o óleo de anis, o óleo de canela, o óleo de rícino e o óleo de cravo.

Com a recolha dos dados propostos pretende-se não só caracterizar cada um dos líquidos estudados, como avaliar a eficiência dos tratamentos de transparência que permitem obter.

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

O presente documento encontra-se dividido em cinco capítulos. O primeiro capítulo foi usado para fazer uma contextualização do problema a estudar, apresentar a motivação e indicar os objetivos do presente estudo. O segundo capítulo apresenta o atual estado da arte relativo à caracterização ótica dos OCAs. Os materiais e métodos usados na investigação experimental e os cálculos realizados no presente trabalho encontram-se descritos no capítulo 3, sendo os resultados obtidos, assim como a discussão dos mesmos apresentados no capítulo 4. O capítulo 5 apresenta as conclusões do presente trabalho e as perspectivas para futuros trabalhos complementares de investigação.



## CAPÍTULO 2 – ESTADO DA ARTE



## 2. Estado da Arte

### 2.1. Propriedades óticas de tecidos biológicos

As propriedades óticas dos tecidos biológicos são características próprias que estes apresentam que condicionam a forma como um feixe de luz se propaga no interior desses tecidos e que quantificam o número de fótons que estão sujeitos a fenômenos pontuais de interação, como a absorção ou o espalhamento. O coeficiente de absorção ( $\mu_a$ ) quantifica quantos fótons do feixe são absorvidos por unidade de comprimento pelo tecido (ou pelos seus componentes). De forma semelhante, o coeficiente de espalhamento ( $\mu_s$ ) quantifica quantos fótons do feixe são espalhados por unidade de comprimento para direções distintas da original e o fator de anisotropia de espalhamento ( $g$ ) representa o valor médio do cosseno entre a direção original do feixe e as direções após eventos de espalhamento em que os fótons passam a deslocar-se [2, 14]. Para além destas propriedades óticas mais fundamentais, existem outras, como o coeficiente de espalhamento reduzido ( $\mu'_s$ ), o coeficiente de atenuação total ( $\mu_t$ ), que é a soma do coeficiente de absorção com o coeficiente de espalhamento, e ainda a profundidade de penetração da luz ( $\delta$ ), que dá uma medida da profundidade a que o feixe consegue chegar sem sofrer uma atenuação superior a 67 % [2, 14]. Todas estas propriedades óticas são características dos tecidos, ou mesmo de outros materiais biológicos, funcionando como um cartão de identidade para esses materiais e que dependem todas do comprimento de onda e da temperatura a que são medidas [15–18].

Independentemente da temperatura a que as propriedades óticas de um tecido são medidas, verifica-se que o  $\mu_s$  é sempre superior ao  $\mu_a$  [19–23]. Esta relação característica entre os dois coeficientes verifica-se para qualquer tecido biológico e está na base da forte atenuação da luz que os tecidos apresentam [3, 6]. Com este forte espalhamento que é característico dos tecidos biológicos, estes tornam-se opacos à passagem da luz, o que significa que apresentam uma baixa profundidade de ação da luz em tecidos espessos e consequentemente limitam muito a aplicação de métodos óticos na prática clínica [3].

## 2.2. Tratamentos de transparência e suas vantagens

Em face das limitações à aplicação das tecnologias óticas em procedimentos de diagnóstico e tratamento, nomeadamente devido ao forte espalhamento que os tecidos apresentam e à consequente profundidade de penetração da luz reduzida, torna-se necessária a criação de efeitos temporários de transparência.

Os tratamentos de transparência por imersão são a melhor opção para vencer o forte espalhamento que é característico dos tecidos biológicos. Isto porque são temporários [3, 5, 24], podem ser revertidos [25] e não apresentam efeitos secundários ou indesejáveis [6]. A criação destes efeitos pode ser feita tanto numa situação *in vivo*, como numa situação *ex vivo* [7], sendo que nesta última uma amostra de tecido é mergulhada num agente de transparência, ou numa solução aquosa que contém uma percentagem volúmica desse agente [26]. O agente presente na solução cria uma pressão osmótica sobre o tecido, forçando à sua desidratação numa forma rápida, o que leva à aproximação dos restantes componentes do tecido no interior e à consequente diminuição da espessura da amostra em estudo [7]. Com a rápida saída da água intersticial, que é designada por mecanismo de desidratação do tecido, o agente na solução passa a difundir-se para o interior, indo as suas moléculas colocar-se no espaço intersticial do tecido, o que força um aumento da espessura da amostra. Este fluxo do agente para o interior do tecido é mais lento, uma vez que as moléculas do mesmo são de maior dimensão do que as moléculas de água e também porque certos agentes apresentam maior viscosidade [10]. A substituição das moléculas de água intersticial pelas moléculas do agente faz com que o IR médio do líquido intersticial do tecido suba, aproximando-se mais do IR dos restantes componentes do tecido, um mecanismo que toma a designação de adaptação de IRs e que está na base da redução do forte espalhamento que é natural dos tecidos biológicos [7, 10]. Existe ainda um terceiro mecanismo de transparência, que é habitualmente designado por dissociação de proteínas [11, 25]. Este terceiro mecanismo de transparência não é fácil de detetar, visto que apenas se torna mensurável em tecidos que contenham elevado conteúdo de proteínas [11], em tratamento com agentes de transparência com forte osmolaridade [11, 26] e a sua deteção é apenas possível com espectroscopia de UV-profundo [11] ou com técnicas de imagem de segundo harmónico [27]. Este terceiro mecanismo de transparência é também reversível [28], tal como verificado para os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs [2, 29–31]. Essa reversibilidade dos três mecanismos é conseguida de forma assistida para tecidos *ex vivo*, mergulhando-os

após a criação da transparência em soro fisiológico [31]. Para tecidos *in vivo*, a reversão da transparência acaba por acontecer eventualmente e de forma natural devido ao fluxo de líquido intersticial dos tecidos adjacentes para os tecidos tratados, o que faz com que o agente de transparência seja expelido [3].

Muitos estudos sobre os efeitos de transparência foram feitos nos últimos 30 anos com vários tecidos *ex vivo* ou *in vivo* em tratamento com diferentes agentes de transparência, combinações desses agentes, ou soluções aquosas dos mesmos [5]. Alguns desses estudos produziram resultados com informação fisiológica dos tecidos previamente desconhecida, como o conteúdo de água móvel que possuem, que é distinto entre tecido saudável e tecido com patologias [32–37]. Outros estudos foram também realizados em tecidos saudáveis e em tecidos patológicos, tendo a comparação dos resultados obtidos entre os dois tipos de tecido fornecido outros parâmetros que podem ser considerados para diagnóstico [11, 25, 37–41].

Apesar de todos os esforços nesta área de investigação nas últimas 3 décadas, há ainda muito a ser feito para que a aplicação das técnicas de transparência *in vivo*, combinadas com métodos de espectroscopia ou de imagem, permitam realizar diagnósticos ou tratamentos de patologias de forma eficiente, sem recurso a métodos que envolvam a utilização de radiação ionizante, ou sem recurso a cirurgia ou biópsias para recolha de tecidos para análise.

Um contributo para atingir tal objetivo consiste na caracterização ótica de vários agentes de transparência, aqueles que já são conhecidos e outros que se suspeite terem potencial de criação de transparência em tecidos biológicos. Um complemento a este estudo de caracterização dos OCAs e de potenciais agentes de transparência será avaliar a eficiência dos tratamentos que estes geram em determinados tecidos.

Assim, há que referir que um determinado produto deve apresentar certas características para que seja considerado um bom agente de transparência. Na secção seguinte iremos descrever quais são essas características e indicar o que se conhece a esse respeito sobre alguns agentes.

### **2.3. Características desejáveis para agentes de transparência**

As características desejáveis para os agentes de transparência são várias e diversificadas. A primeira dessas características é que o agente apresente um elevado IR numa banda espectral larga, para que ao aplicar os tratamentos, possa realizar a adaptação dos IRs dos líquidos intersticial e intracelular com os restantes componentes biológicos nos tecidos de forma eficaz [10]. Esta característica não é suficiente, pois, há que considerar outros aspetos que o agente deve apresentar, como a sua transparência, onde apresenta bandas de absorção e se é inofensivo para os tecidos e para os seus componentes biológicos [10, 42].

Assim e em geral, um agente de transparência deve ser um líquido translúcido, que não apresente bandas de absorção significativas nas zonas em que o seu IR é baixo para não alterar a forma do espectro do tecido aquando da ocorrência dos tratamentos [13]. Para evitar que isto aconteça, é desejável que as bandas de absorção do agente estejam localizadas no UV profundo, uma zona em que a dispersão do agente é fortemente crescente com a diminuição do comprimento de onda e que essas bandas não sejam significativamente largas nem tenham uma magnitude muito elevada [13, 42]. Alguns dos agentes de transparência, como a glicerina, o etilenoglicol ou o dimetilsulfóxido (DMSO) são comumente usados em outras aplicações, pelo que o estudo da sua dispersão e do seu espectro de absorção foi já realizado com outros interesses e encontra-se disponível numa base de dados online [43]. Tais dados foram obtidos com as mais variadíssimas técnicas e representam os referidos agentes no estado mais puro possível. Quando se compram estes produtos no mercado para usar em estudos de investigação como o presente, os resultados obtidos para o espectro de absorção, ou para a dispersão do agente poderão apresentar algumas diferenças dos disponíveis online, uma vez que os produtos comprados poderão não ser totalmente puros, como por exemplo apresentarem algum conteúdo de água, ou outras impurezas. Por outro lado, a diferença entre os resultados disponíveis online [43] e os encontrados em estudos de investigação pode também dever-se à precisão dos instrumentos usados para os obter, ou à falta de cuidado na preparação do agente/solução a usar.

Em consequência da necessidade de caracterização ótica de produtos comerciais que tem potencial de criação de transparência e de outros que apesar de não terem esse potencial ainda reconhecido, apresentam características favoráveis, convém realizar um estudo completo com vários desses agentes e produtos, para verificar se de facto podem

ser considerados como agentes de transparência e qual o seu desempenho na criação de tais efeitos. Neste tipo de estudo, como o realizado no presente trabalho, podem incluir-se agentes de transparência já reconhecidos, para os quais se desconhecem dados óticos característicos ou para se considerarem tais dados como referência para comparação com os resultados obtidos para os restantes líquidos a avaliar.

Considerando o que foi descrito no parágrafo anterior, o presente estudo consistiu na avaliação das características espectrais óticas de vários líquidos com potencial de servirem como agentes de transparência e de outros já reconhecidos, em que os seus dados característicos servirão como referência. Assim, estudaram-se no presente trabalho a dispersão e o espectro de absorção entre os 200 e os 1000 nm para a glicerina, o etilenoglicol, o propileno glicol, uma solução aquosa contendo 54 % de volume de glucose, o *e-Cig*, o óleo de amêndoas, o óleo de anis, o óleo de cravo, o óleo de rícino e o óleo de canela. Para além de caracterizar opticamente todos estes líquidos, foram feitos também tratamentos de tecido músculo-esquelético de coelho com cada um deles para avaliar a eficiência destes líquidos para a criação de transparência. A metodologia experimental usada neste estudo encontra-se descrita no capítulo 3 e os resultados obtidos estão apresentados no capítulo 4, juntamente com a discussão dos mesmos.



## CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS



### 3. Materiais e Métodos

Dado que o presente trabalho consistiu na caracterização ótica de vários líquidos e na avaliação das eficiências dos tratamentos criados por esses líquidos em tecido muscular, o presente capítulo irá descrever os diferentes métodos experimentais usados para a obtenção dos resultados.

Assim, na secção 3.1 serão indicados os líquidos estudados e as características que nos mostram que se tratam de produtos com potencial para criar efeitos de transparência em tecidos. Na secção 3.2 serão descritos os procedimentos para a obtenção da dispersão dos líquidos estudados, enquanto na secção 3.3 será descrita a medição experimental do seu espectro de absorção. Por fim, na secção 3.4 será feita a descrição das medições que levaram à obtenção das eficiências dos vários tratamentos realizados com amostras do tecido muscular.

#### 3.1. Líquidos a estudar

Conforme foi referido no capítulo anterior, os produtos selecionados para o presente estudo podem ser incluídos em dois grupos, o grupo dos agentes de transparência já reconhecidos e o grupo dos produtos comerciais com potencial para criação de transparência. Foi também anteriormente referido que os OCAs que fazem parte do primeiro grupo apresentam já dados publicados que os caracterizam opticamente, mas que podem estar limitados a uma banda espectral diferente da escolhida para a realização do presente estudo. Dada a instrumentação usada na realização do presente trabalho, os resultados medidos e calculados referem-se a uma banda espectral entre os 200 e os 1000 nm, pelo que alguns dos OCAs que fazem parte do primeiro grupo poderão ver no presente trabalho a sua descrição ótica estendida a esta banda espectral pela primeira vez. Quanto aos líquidos incluídos no segundo grupo, os resultados obtidos são todos inovadores, uma vez que deles apenas se conhecia o valor do IR a 589,6 nm [44], que é o comprimento de onda de referência do refratómetro de Abbe.

A Tabela 3.1 apresenta alguns dados dos vários líquidos a estudar, nomeadamente o grau de pureza do líquido, o seu IR a 589,6 nm e o local onde foi comprado.

**Tabela 3.1** - Dados dos líquidos usados no presente estudo.

Líquido	Pureza	IR a 589,6 nm	Local de compra
Glicerina	99 %	1,4707	Supermercado local
Etilenoglicol	100 %	1,4325	Drogaria local
Propileno glicol	100 %	1,4335	Tabacaria online
Glucose (diluída em água)	54 %	1,4148	Farmácia local
<i>e-Cig</i> (glicerina/propileno glicol)	70/30 %	1,4595	Tabacaria online
Óleo de amêndoas	??	1,4710	Loja de produtos naturais
Óleo de rícino	??	1,4785	Loja de produtos naturais
Óleo de canela	??	1,6075	Loja de produtos naturais
Óleo de cravo	??	1,5340	Loja de produtos naturais
Óleo de anis	??	1,5520	Loja de produtos naturais

Os valores de IR indicados na Tabela 3.1 foram medidos no laboratório, no âmbito do presente trabalho, usando um refratômetro de Abbe e serviram para comparar com valores tabelados e identificar a pureza do líquido [3, 43, 44]. No caso dos óleos, como os valores tabelados se encontram dentro de um intervalo [44], não foi possível identificar a pureza de cada um. No entanto, os valores indicados na Tabela 3.1 encontram-se dentro dos respectivos intervalos publicados [44]. Para a solução de glucose, esta foi comprada em pó e depois diluída em água, controlando-se o seu IR com o refratômetro. Note-se que tal como descrito na literatura [3], a solução aquosa de glucose com maior concentração que se consegue é a que contém 54 %. Maiores concentrações são possíveis, mas em vez de uma solução aquosa, passamos a ter um gel [3].

Conforme pode verificar-se pelos valores de IR apresentados na Tabela 3.1 todos os líquidos apresentam valores significativamente superiores ao da água, que é 1,3330 a 589,6 nm [45], o que nos indica que poderão todos ser potenciais agentes de transparência quando aplicados para tratar tecidos biológicos. O valor de IR do *e-Cig* ( $n_{e-Cig}$ ) é idêntico ao calculado pela equação de Gladstone e Dale [3], a partir dos valores de IR da glicerina e do propileno glicol, como:

$$n_{e-cig} = f_{glic}n_{glic} + f_{pg}n_{pg} = 0,7 \times 1,4707 + 0,3 \times 1,4335 = 1,4595, \quad (1)$$

em que  $f_{glic}$  e  $f_{pg}$  representam as frações volúmicas de glicerina e propileno glicol e  $n_{glic}$  e  $n_{pg}$  representam os valores de IR desses agentes a 589,6 nm, respetivamente.

Apesar de todos os valores de IR apresentados na Tabela 3.1 serem promissores para que estes líquidos façam uma boa adaptação de IRs em tecidos biológicos, há que realizar outros estudos para os caracterizar ópticamente e avaliar a eficiência dos tratamentos por eles produzidos num determinado tecido biológico.

### 3.2. Avaliação das dispersões dos agentes

As curvas de dispersão de um determinado material não podem ser medidas diretamente. Para as conseguir determinar, é habitual realizarem-se medições discretas do IR do material a estudar, usando nessas medições lasers com emissão a comprimentos de onda dentro da banda a estudar. Posteriormente, ajustam-se os valores experimentais discretos de IR obtidos com curvas de dispersão típicas, como a equação de Cauchy (Eq. (2)), a equação de Conrady (Eq. (3)) ou a equação de Cornu (Eq. (4)), para ver qual delas apresenta um melhor ajuste, ou seja, a que tem um valor máximo de  $R^2$  [3, 13, 42].

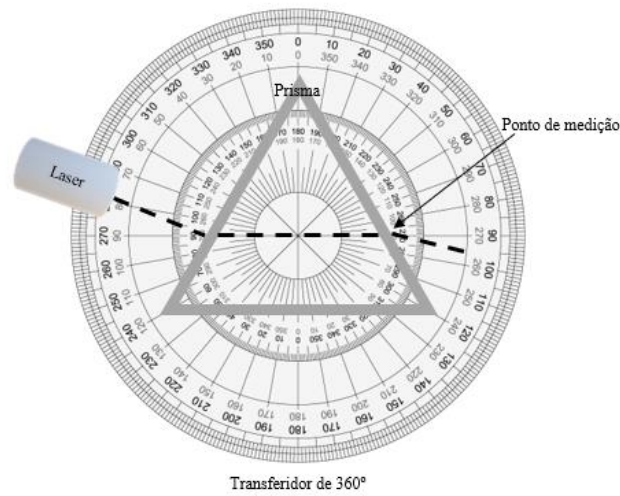
$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (2)$$

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda} + \frac{C}{\lambda^{3.5}} \quad (3)$$

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{(\lambda-c)} \quad (4)$$

Os parâmetros A, B e C, que são designados por parâmetros de Cauchy, de Conrady ou de Cornu, são estimados quando se ajustam as curvas descritas pelas equações (2), (3) ou (4) aos pontos discretos obtidos com as medições experimentais aos comprimentos de onda dos lasers usados [42].

No presente estudo, usou-se o método do ângulo de desvio mínimo [46] com vários lasers para se obterem os valores de IR de cada líquido a diferentes comprimentos de onda. Neste método, o líquido a analisar é colocado dentro de um prisma equilátero ( $\phi=60^\circ$ ) oco e transparente, que foi construído no laboratório do Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI) propositadamente para este estudo. O prisma é colocado sobre uma base que contém um transferidor com medição de ângulos entre 0 e  $360^\circ$ , como mostra a Figura 3.1.



**Figura 3.1** - Montagem experimental para medir o IR de um líquido pelo método do ângulo de desvio mínimo.

Usando um laser em particular, a medição é feita procurando um ângulo do feixe incidente no prisma que produz um feixe de saída com um ângulo mínimo de desvio relativamente ao feixe incidente. O ângulo mínimo de desvio é conseguido, quando dentro do prisma, o feixe tem um alinhamento paralelo à base do prisma, tal como representado na Figura 3.1. Após se conseguir esse alinhamento de feixes, calcula-se o ângulo mínimo de desvio ( $\delta_{\min}$ ) como a soma entre o ângulo que o feixe de incidência faz com a normal à face do prisma à esquerda ( $\theta_{in}$ ) e o ângulo que o feixe emergente faz com a face do prisma à direita ( $\theta_{out}$ ):

$$\delta_{\min} = \theta_{in} + \theta_{out}. \quad (5)$$

Depois de obtido o  $\delta_{\min}$  para o laser usado, calcula-se o IR do líquido para o comprimento de onda do laser com a seguinte relação [46]:

$$n(\lambda) = 2,00056 \times \sin\left(\frac{\phi + \delta_{\min}}{2}\right). \quad (6)$$

Este procedimento foi usado para todos os líquidos quando sujeitos a medições com cada um dos lasers indicados na Tabela 3.2.

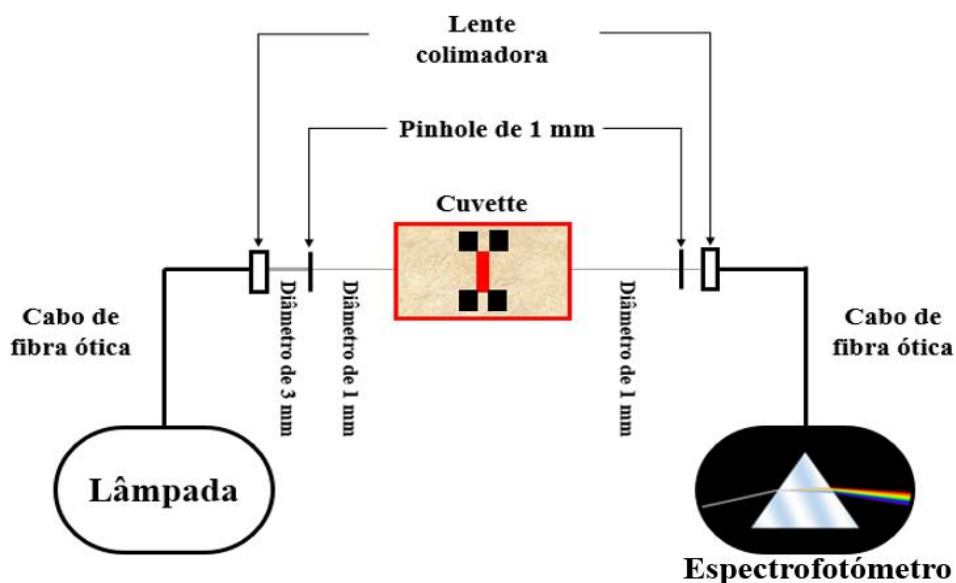
**Tabela 3.2** - Dados dos lasers usados nas medições de IR dos agentes.

<b>Laser</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Potência (mW)</b>	<b>Fabricante</b>
Laser 1	401,4	5	Edmund Optics (EUA)
Laser 2	534,6	4,5	Kvant (Eslováquia)
Laser 3	626,6	5	PASCO (EUA)
Laser 4	782,1	5	Edmund Optics (EUA)
Laser 5	820,8	5	Edmund Optics (EUA)
Laser 6	850,7	5	Edmund Optics (EUA)

Deve notar-se que para as medições feitas com o propileno glicol, com o *e-Cig* e com a solução de glucose, os lasers 2 e 3 indicados na Tabela 3.2 foram substituídos por outros equivalentes, mas com comprimentos de onda de emissão a 532 nm e a 650 nm, respetivamente. Esta substituição foi forçada por necessidade dos lasers 2 e 3 em atividades letivas na altura da realização das medições para o presente estudo. Todas as medições dos valores de IR dos diferentes líquidos foram feitas a temperaturas na ordem de  $20 \pm 1$  °C. Depois de realizadas todas as medições, calcularam-se as curvas de dispersão dos vários líquidos ajustando os valores de IR discretos obtidos para cada líquido com as equações (2), (3) e (4) e selecionando a que deu melhor ajuste.

### 3.3. Avaliação dos espectros de absorção dos líquidos

De forma a avaliar as bandas de absorção dos vários líquidos em estudo para verificar em que zona do espectro ocorrem, foram feitas medições dos espectros de transmitância colimada ( $T_c$ ) de cada um entre 200 e 1000 nm. Para tal, e considerando qualquer um desses líquidos em particular, foi colocada uma amostra do líquido, com 2 mm de espessura, dentro da cuvette da montagem experimental apresentada na Figura 3.2 com forma circular ( $\phi=1$  cm), para medir o seu espectro de  $T_c$ .



**Figura 3.2** - Montagem experimental para medir os espectros de  $T_c$  dos agentes e dos tecidos em tratamento.

Na Figura 3.2, que não se encontra à escala, estão representadas uma barra vermelha e quatro barras pretas dentro da cuvete, que não são usadas nas medições dos espectros de  $T_c$  dos líquidos. Tais barras são importantes nas medições a realizar com os tecidos em estado natural, ou durante os tratamentos para avaliar a eficiência dos agentes em estudo, sendo que a barra vermelha representa a amostra de tecido e as barras pretas são representativas de um sistema de fixação mecânica dos tecidos.

Para a medição dos espectros de  $T_c$  dos líquidos, apenas uma amostra de cada um, é colocada no interior da cuvete para ser atravessada por um feixe de luz colimada com 1 mm de diâmetro. Dado que se pretende medir esse espectro entre 200 e 1000 nm, o feixe proveniente de uma lâmpada de deutério-halogénio é apontado para o interior da cuvete pela ótica de iluminação, que é composta por um cabo de fibra ótica, uma lente colimadora e um pinhole de diâmetro 1mm, conforme se pode ver à esquerda da cuvete, na Figura 3.2. Após atravessar os 2 mm de líquido, o feixe é coletado pela ótica de deteção, que é também composta por um pinhole de diâmetro 1 mm, uma lente colimadora e um cabo de fibra ótica, conforme representado à direita da cuvete. Uma vez recolhido para o interior do cabo de fibra ótica, o feixe é entregue ao espectrofotómetro para que o espectro de  $T_c$  do agente seja registado entre 200 e 1000 nm.

### 3.4. Estudo dos tratamentos e avaliação das eficiências dos agentes

Sendo a fase final do presente trabalho, a avaliação das eficiências dos tratamentos realizados com os diversos líquidos em tecido muscular permitirá verificar quais apresentam bons e maus resultados e concluir se cada um desses líquidos poderá ou não ser de interesse para aumentar de forma eficiente a transparência de tecidos biológicos.

Nesta fase final selecionou-se utilizar como tecido de estudo o músculo-esquelético de coelho, uma vez que é um tecido fácil de conseguir e que apresenta boas características fisiológicas para a aplicação deste tipo de tratamentos. Isto porque, é composto essencialmente por cordões de fibras de proteínas que se encontram permeadas por líquido intersticial [47]. Por outro lado, o tecido muscular foi já usado em muitos estudos para avaliar tratamentos de transparência, conforme descrito na literatura [10, 32–34, 47, 48].

Assim, recolheu-se uma perna de um coelho recentemente sacrificado para consumo e guardou-se a mesma num congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sempre que necessário, retirou-se uma porção de músculo dessa perna para preparar as amostras para os estudos. Tais amostras foram preparadas com um crióstato (modelo 1860UV da Leica<sup>TM</sup>, Alemanha) para obterem uma forma circular com um diâmetro de  $\sim 1\text{ cm}$  e espessura uniforme de  $0,5\text{ mm}$ . Foi usada uma amostra para realizar o tratamento com cada um dos agentes, perfazendo assim um total de 10 amostras de músculo.

Na execução de cada um destes estudos, a amostra de tecido foi colocada no centro da cuvete e fixa nessa posição, tal como representado pelas barras vermelha e pretas na Figura 3.2. Uma vez colocado e fixo o tecido, começou-se por medir o espectro de  $T_c$  deste em estado natural, para obter uma referência no cálculo da eficiência do tratamento. Depois disso encheu-se a cuvete com o agente e foram registados espectros de  $T_c$  a cada 5 segundos. No fim do tratamento calculou-se a eficiência deste em função do tempo ( $OC_{\text{eff}}(\lambda, t)$ ) de acordo com a seguinte relação [11, 31]:

$$OC_{\text{eff}}(\lambda, t) = \frac{[T_c(\lambda, t) - T_c(\lambda, t=0)]}{T_c(\lambda, t=0)} \times 100\%, \quad (7)$$

em que  $T_c(\lambda, t)$  representa o espectro de  $T_c$  do tecido entre 200 e 1000 nm que foi medido no instante de tratamento  $t$  e  $T_c(\lambda, t=0)$  representa o espectro de referência do tecido em

estado natural, antes de ser aplicado o tratamento [11, 31]. Este procedimento foi feito para os tratamentos realizados com cada um dos líquidos em estudo, permitindo assim avaliar e comparar entre as eficiências de transparência criadas por cada um no mesmo tecido.

Os resultados obtidos para todas as fases de estudo descritas no presente capítulo encontram-se apresentados no capítulo 4.

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO



## 4. Resultados e Discussão

Conforme foi descrito no capítulo anterior, a primeira fase do presente trabalho consistiu na caracterização ótica dos vários líquidos e a segunda consistiu na avaliação da eficiência dos tratamentos criados por esses líquidos em tecido músculo-esquelético de coelho. Desta forma, a secção 4.1 apresenta os resultados obtidos nas medições discretas de IR dos líquidos e a estimação das suas curvas de dispersão entre 200 e 1000 nm. Na secção 4.2 são apresentados os espectros de  $T_c$  dos diferentes líquidos na mesma zona espectral e será feita uma análise das suas bandas de absorção. A secção 4.3 apresenta os mapas 3D da  $T_c$  e da eficiência de criação de transparência em amostras de músculo em tratamento com cada um dos líquidos. Em face de todos os resultados apresentados será feita uma análise crítica sobre o potencial de transparência de cada líquido.

### 4.1. Estudos de IR e estimação das curvas de dispersão dos líquidos

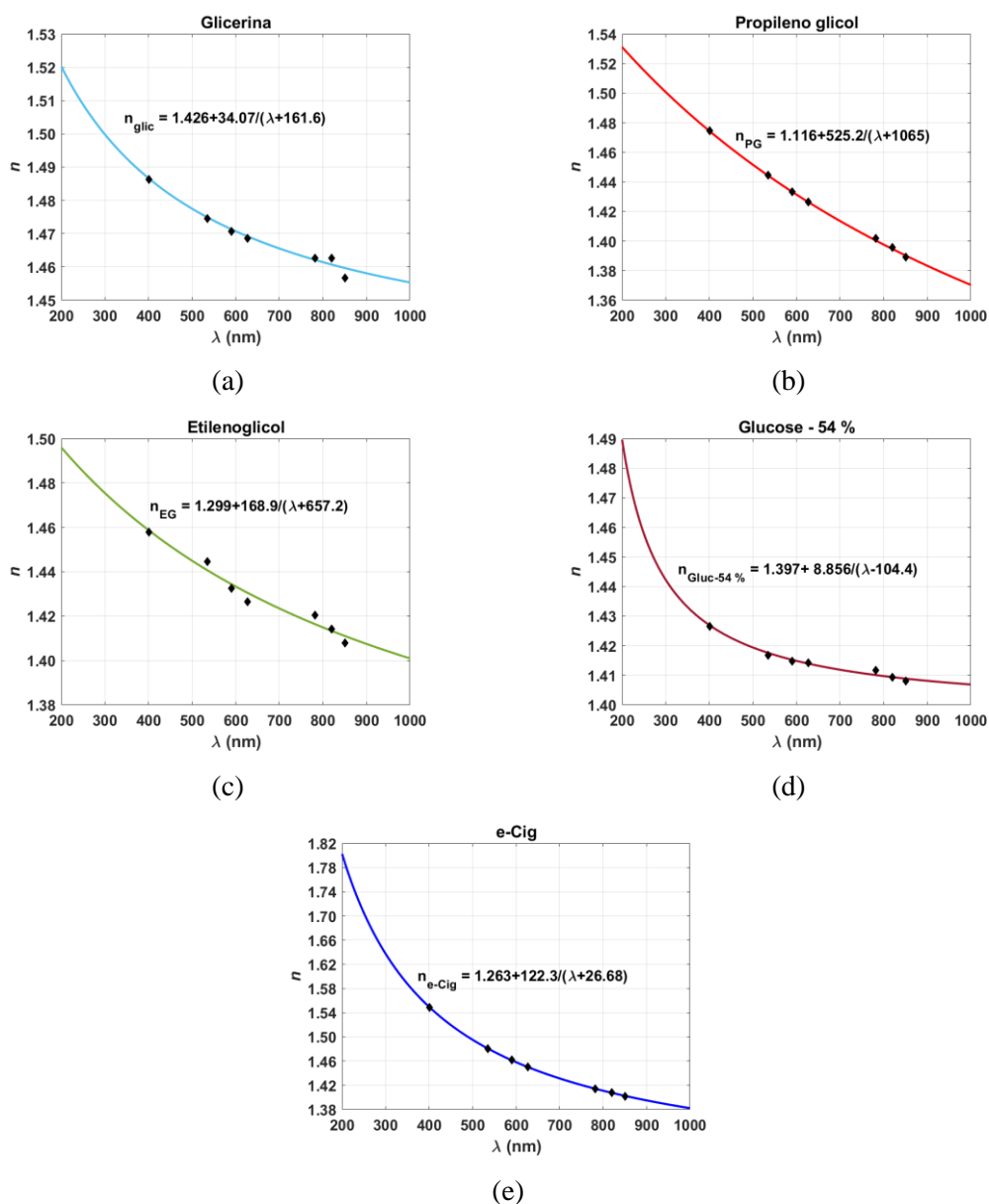
Na primeira fase experimental do presente trabalho, foram realizadas as medições discretas de IR dos vários líquidos utilizando o método do ângulo mínimo de desvio. Tais medições foram feitas uma única vez em cada situação experimental líquido/laser a estudar e os valores discretos de IR respetivos, depois de calculados com as equações (5) e (6), encontram-se representados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** – Valores experimentais dos IRs medidos para os diferentes líquidos a 20 °C.

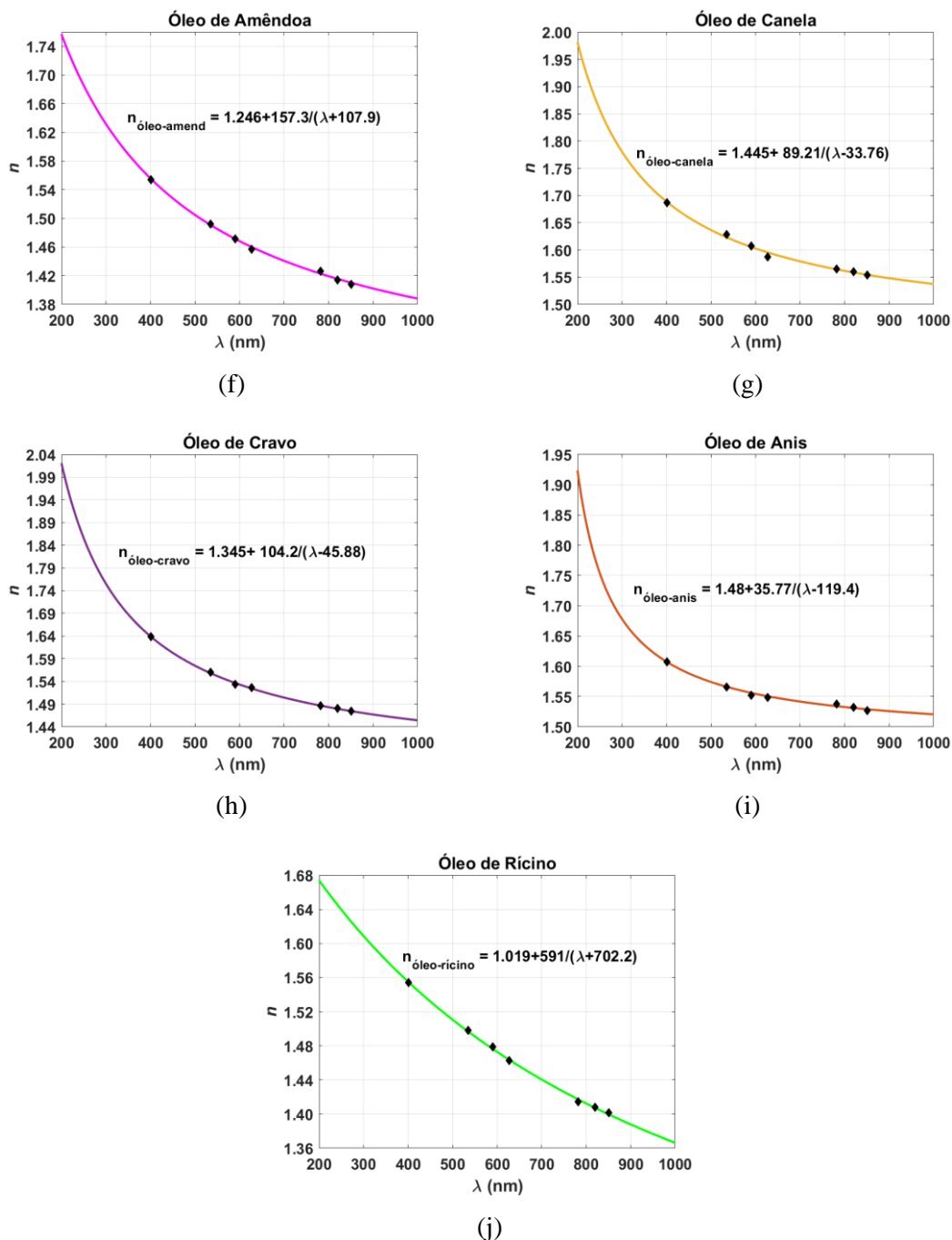
<b>Laser</b> <b>Líquido</b>	<b>401,4 nm</b>	<b>534,6 nm</b> <b>(532 nm)</b>	<b>626,6 nm</b> <b>(650 nm)</b>	<b>782,1 nm</b>	<b>820,2 nm</b>	<b>850,7 nm</b>
Glicerina	1,4863	1,4746	1,4686	1,4627	1,4627	1,4567
Propileno glicol	1,4746	<b>1,4447</b>	<b>1,4326</b>	1,4018	1,3956	1,3893
Etilenoglicol	1,4579	1,4447	1,4265	1,4204	1,4142	1,4080
Glucose-54 %	1,4265	<b>1,4167</b>	<b>1,4142</b>	1,4117	1,4093	1,4080
<i>e-Cig</i>	1,5488	<b>1,4804</b>	<b>1,4507</b>	1,4142	1,4080	1,4018
Óleo de amêndoa	1,5543	1,4921	1,4567	1,4265	1,4142	1,4080
Óleo de canela	1,6868	1,6282	1,5867	1,5652	1,5598	1,5542
Óleo de cravo	1,6383	1,5598	1,5265	1,4863	1,4804	1,4746
Óleo de anis	1,6077	1,5652	1,5488	1,5378	1,5321	1,5265
Óleo de rícino	1,5543	1,4979	1,4627	1,4142	1,4080	1,4018

Na tabela 4.1 alguns valores são apresentados a azul, uma vez que foi necessário alterar dois lasers para realizar essas medições, conforme mencionado no capítulo

anterior. Após a obtenção dos valores de IR discretos, fez-se o ajuste dos pontos obtidos para cada líquido com curvas descritas pelas Equações (2), (3) e (4), para ver qual delas descrevia melhor a dispersão de cada um. Tais ajustes foram feitos com o *Curve Fitting Tool* do MATLAB™, e o melhor ajuste para cada um dos líquidos foi obtido com a equação de Cornu (Eq. (4)), sempre com  $R^2 > 0,99$ . Considerando que as curvas que ajustam os pontos são válidas entre 200 e 1000 nm, fez-se a representação das mesmas nos gráficos das Figuras 4.1 e 4.2. Nesses gráficos encontram-se também representadas as equações de Cornu que resultam do ajuste dos pontos discretos para cada caso.



**Figura 4.1** - Curvas de dispersão calculadas para os líquidos em estudo: glicerina (a), propileno glicol (b), etilenoglicol (c), glucose-54 % (d) e *e-Cig* (e).



**Figura 4.2** - Curvas de dispersão calculadas para os líquidos em estudo: óleo de amêndoa (f), óleo de canela (g), óleo de cravo (h), óleo de anis (i) e óleo de rícino (j).

Conforme se pode verificar em cada um dos gráficos das Figuras 4.1 e 4.2, todos os líquidos estudados apresentam o comportamento típico para a dispersão – o IR decresce de forma exponencial com o aumento do comprimento de onda. Em alguns casos, como por exemplo para o propileno glicol ou para o óleo de rícino, tal comportamento exponencial decrescente aproxima-se de um comportamento linear, mas

mantém a dependência típica de um agente de transparência, com valores elevados de IR para os comprimentos de onda mais baixos.

Para os casos da glicerina, do propileno glicol e do etilenoglicol, as curvas de dispersão estão disponíveis online, podendo ser consultadas através do link da Ref. [43]. Fazendo uma comparação entre os resultados obtidos no presente estudo, em que as medições foram feitas a 20 °C, e os que estão disponíveis online verificamos que para o caso da glicerina, a curva de dispersão é praticamente coincidente na zona onde as medições de IR foram feitas, mas para comprimentos de onda abaixo de 400 nm, a curva obtida está um pouco baixa. Note-se que para os dados disponíveis na Ref. [43], não há indicação da temperatura a que foram obtidos, pelo que poderão corresponder a uma temperatura mais elevada à que corresponde ao presente estudo, o que justifica as diferenças observadas. No caso do propileno glicol, a curva disponível online apenas está disponível entre 434 e 656 nm e resulta de medições a 25 °C [43], mas os valores nessa banda são praticamente coincidentes com os obtidos no presente estudo. Para o etilenoglicol, a curva obtida no presente trabalho está ligeiramente abaixo da dispersão publicada online [43]. No entanto, esta diferença pode dever-se a diferenças de temperatura entre as medições feitas nos dois estudos, uma vez que para este líquido apenas está indicado na Ref. [43] que as medições foram feitas à temperatura ambiente. Para os restantes líquidos estudados, apenas se conhecem as curvas de dispersão para soluções de glucose a 40 % e a 60 %, e do *e-Cig*, mas a 27 °C [3], pelo que a comparação com os dados obtidos no presente trabalho não faz sentido.

De forma a comparar as dispersões representadas nos gráficos das Figuras 4.1 e 4.2 entre si e com a dispersão da água para ver se estes agentes podem proporcionar uma boa adaptação de IRs nos tecidos, fez-se a representação da Figura 4.3.

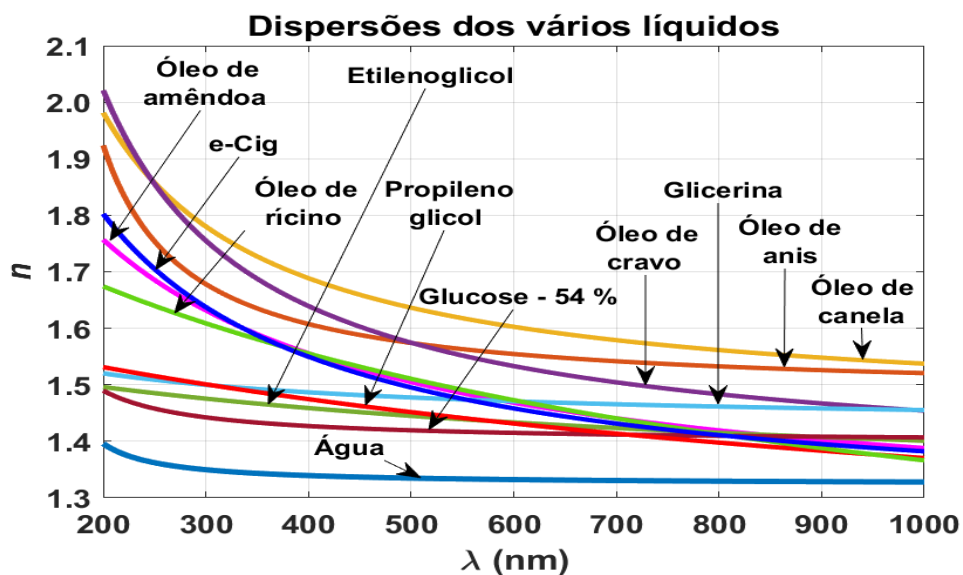
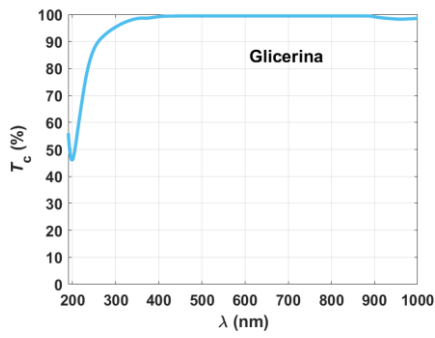


Figura 4.3 - Curvas de dispersão de todos os líquidos em estudo e da água.

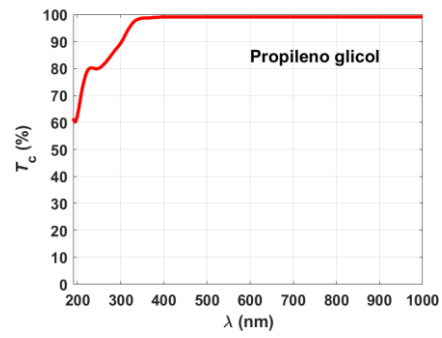
Conforme mostra a Figura 4.3, todos os líquidos estudados apresentam dispersões superiores à da água. Esta característica é sugestiva de que qualquer um dos líquidos estudados poderá realizar uma boa adaptação de índices de refração quando forem usados para tratar tecidos biológicos. O caso da solução de glucose a 54 % é o que apresenta a dispersão mais baixa e mais próxima da que corresponde à água, mas neste caso, tal proximidade deve-se ao facto de esta solução conter 46 % de água, o que faz baixar a sua dispersão. No caso dos óleos, as dispersões representadas são as que apresentam maiores valores, especialmente no UV, indicando que esses óleos poderão ter grande potencial de criação de transparência em tecidos biológicos, através do mecanismo de adaptação de IRs. Para garantir que tal acontece é necessário verificar se estes óleos não apresentam bandas de absorção largas e de forte magnitude na zona espectral considerada, o que impedirá a ocorrência de uma eficiente adaptação de IRs [3]. Tal estudo foi feito e os resultados obtidos encontram-se apresentados na secção seguinte.

## 4.2. Estudo das bandas de absorção dos líquidos

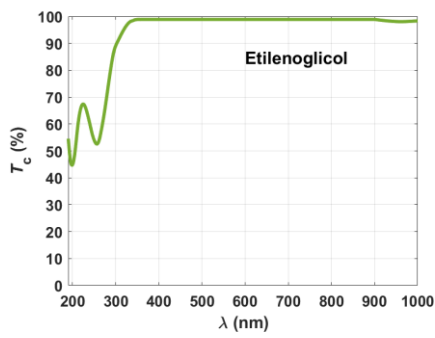
No sentido de identificar as bandas de absorção dos diferentes líquidos em estudo, foram medidos os seus espectros de  $T_c$  entre 200 e 1000 nm, de acordo com o procedimento descrito na secção 3.3. As Figuras 4.4 e 4.5 mostram cada um desses espectros.



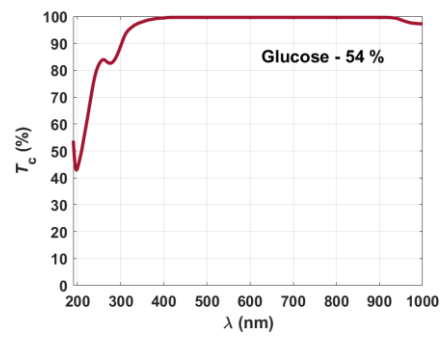
(a)



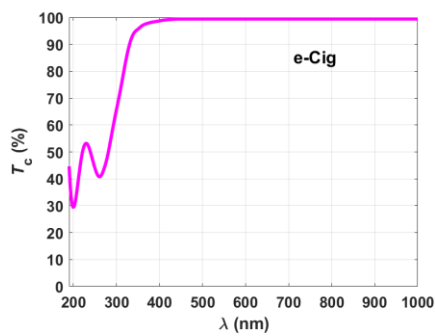
(b)



(c)

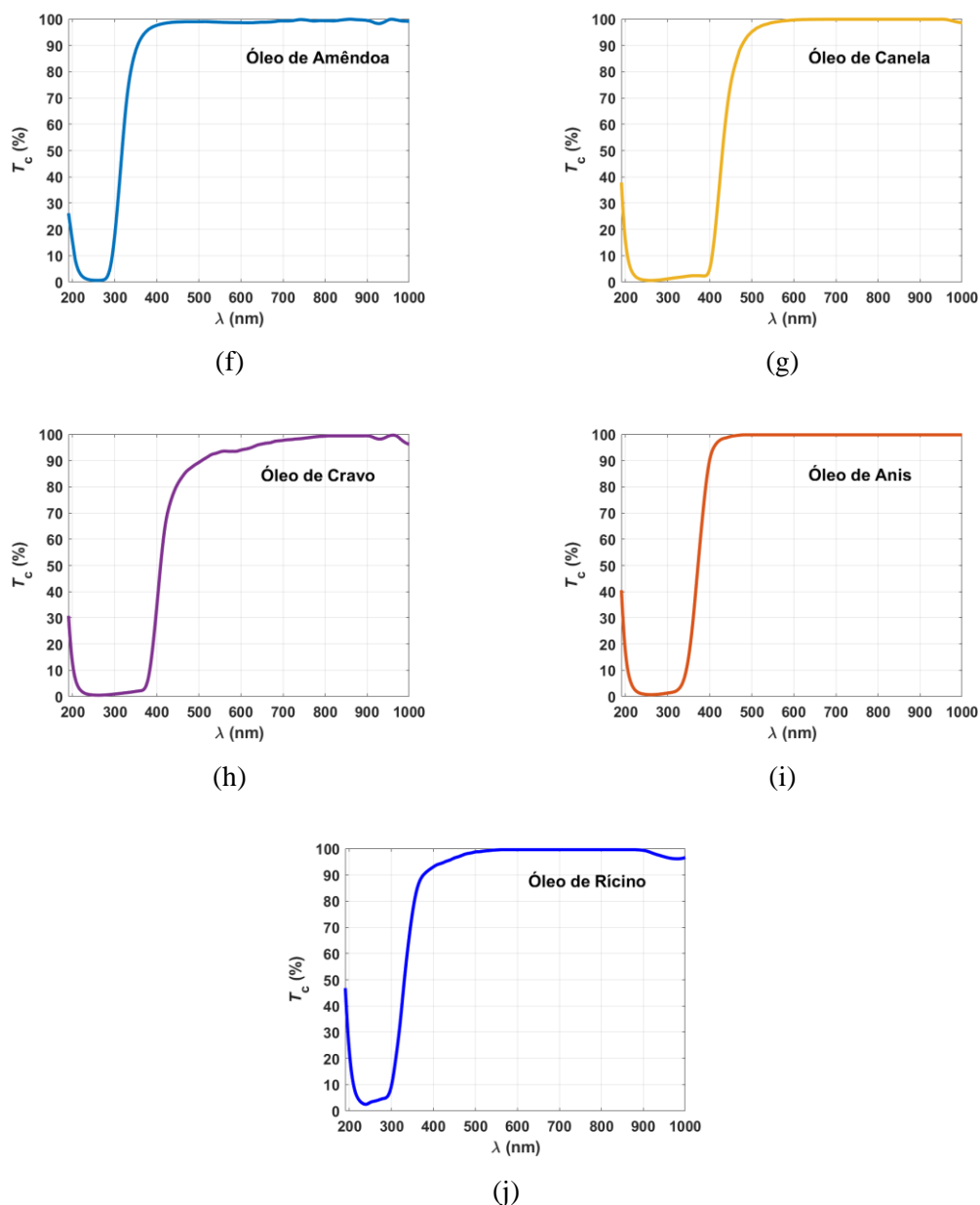


(d)



(e)

**Figura 4.4** - Espectro de  $T_c$  para os líquidos em estudo: glicerina (a), propileno glicol (b), etilenoglicol (c), glucose-54 % (d) e *e-Cig* (e).



**Figura 4.5** – Espectro de  $T_c$  para os líquidos em estudo: óleo de amêndoa (f), óleo de canela (g), óleo de cravo (h), óleo de anis (i) e óleo de rícino (j).

Analisando os diferentes espectros representados nas Figuras 4.4 e 4.5, verificamos que todos os líquidos em estudo apresentam bandas de absorção na zona do UV, onde a sua dispersão é fortemente crescente. No entanto, dada a largura e a magnitude diferenciadas dessas bandas de absorção entre os líquidos, uma análise mais cuidada é necessária para cada um.

No caso da glicerina, começamos por verificar a ocorrência de uma banda de absorção centrada a 960 nm, que indica a presença de algum conteúdo de água [49]. Tal presença de água é confirmada pelos valores de IR medidos com o refratômetro de Abbe

(ver Tabela 3.1), onde se verificou uma pureza para a glicerina de 99 %. Estes dois resultados mostram que durante a preparação ou durante o manuseamento deste líquido, a glicerina pura pode ter captado algumas moléculas de água da humidade presente no ar, levando assim a um decaimento da sua pureza para 99 %. O espectro representado na Figura 4.3(a) apresenta outra banda no UV, cujo pico central ocorre precisamente a 199 nm. Tal banda, que se estende até os 400 nm, não devia existir de acordo com a literatura, pois foi reportado que a transmitância da glicerina pura é 100 % para comprimentos de onda acima de 155 nm [50]. Esta banda de absorção pode estar relacionada com algum depósito de ADN e de proteínas também durante a preparação ou no manuseamento deste líquido, uma vez que o ADN tem a sua banda de absorção centrada a 260 nm [49], e as proteínas apresentam fortes bandas de absorção entre 190 e 230 nm [51, 52]. A falta de cuidado de quem preparou ou manuseou o líquido, nomeadamente a falta de uso de luvas, pode ter levado à queda de proteínas e de ADN da camada *Stratum Corneum* da pele das mãos para o líquido.

O espectro de  $T_c$  do propileno glicol é algo de semelhante ao da glicerina, uma vez que apresenta duas bandas de absorção, uma a 194 nm e outra sensivelmente a 255 nm. Mais uma vez estas bandas de absorção indicam a presença de proteínas e de ADN [49, 51, 52], que podem ter sido adicionados por acidente na preparação ou no manuseamento do líquido. O espectro do propileno glicol não apresenta a banda de absorção da água no infravermelho, o que mostra que nenhuma água foi captada por este líquido.

Considerando o etilenoglicol, verifica-se a presença de alguma água, uma vez que se observa a banda de absorção centrada a 974 nm [49]. Este líquido apresenta também duas bandas no UV, uma centrada a 199 nm e outra centrada a 257 nm. Mais uma vez, a preparação, ou o manuseamento deste líquido proporcionou a contaminação do etilenoglicol com algumas proteínas [51, 52] e com ADN [49], que podem ter caído da pele das mãos de quem preparou ou usou este líquido.

Algo de semelhante ocorre no espectro da solução de glucose-54 %, pois o conteúdo considerável de água nesta solução (46 %) é traduzido numa banda de absorção mais pronunciada a 978 nm [49]. O espectro de  $T_c$  da glucose apresenta também a banda de absorção a 197 nm, que mostra a presença de proteínas [51, 52] e uma outra, centrada a 278 nm, que possivelmente é uma banda específica deste açúcar. Apesar de esta solução ser a que apresenta menor dispersão entre os líquidos estudados (ver Figuras 4.1 e 4.3), o seu potencial de criação de transparência, pelo menos na zona do visível ao infravermelho, foi já demonstrada em alguns tecidos biológicos [3, 25, 28, 32, 34].

O espectro de  $T_c$  do *e-Cig* tem semelhança com os espectros dos líquidos anteriormente analisados, uma vez que apresenta 100 % de transmitância para comprimentos de onda acima de 400 nm. Na zona do UV apresenta também duas bandas de absorção, uma centrada a 200 nm que indica a presença de proteínas [51, 52] e outra a 260 nm que mostra a presença de ADN [49]. Mais uma vez, a presença destas duas bandas de absorção mostra que houve contaminação do líquido por quem o preparou ou durante o manuseamento no laboratório.

Apesar de ocorrerem bandas de absorção no UV para os líquidos analisados até aqui, as suas magnitudes não são muito elevadas, nunca se observando uma queda da  $T_c$  abaixo de 40 %, com a exceção do *e-Cig*, em que a banda a 200 nm apresenta valores de cerca de 30 %. Este facto conjugado com as dispersões fortemente crescentes no UV-profundo (ver Figuras 4.1, 4.2 e 4.3), mostra que estes líquidos são potenciais agentes de transparência, podendo garantir uma forte adaptação de IRs, mesmo no UV. Todos estes líquidos mostraram já o seu potencial de criação de transparência em diferentes tecidos biológicos [3, 11–13, 25, 31, 33], sendo que no caso particular do *e-Cig*, foi recentemente publicado um artigo que demonstra transparência de magnitude fortemente elevada em todo o espectro para um tecido previamente tratado e cuja primeira transparência foi revertida com soro fisiológico [31].

Para passarmos à análise das bandas de absorção dos restantes líquidos, ou seja, dos óleos de produtos naturais, fizemos uma representação comparativa de todos os líquidos estudados na Figura 4.6.

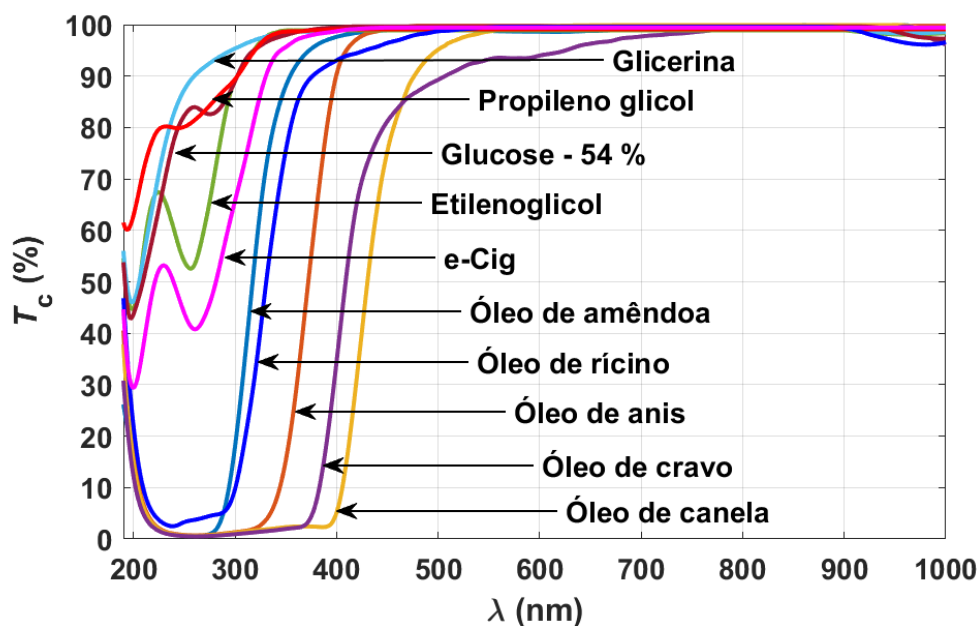


Figura 4.6 - Espectros de T<sub>c</sub> para todos os líquidos em estudo.

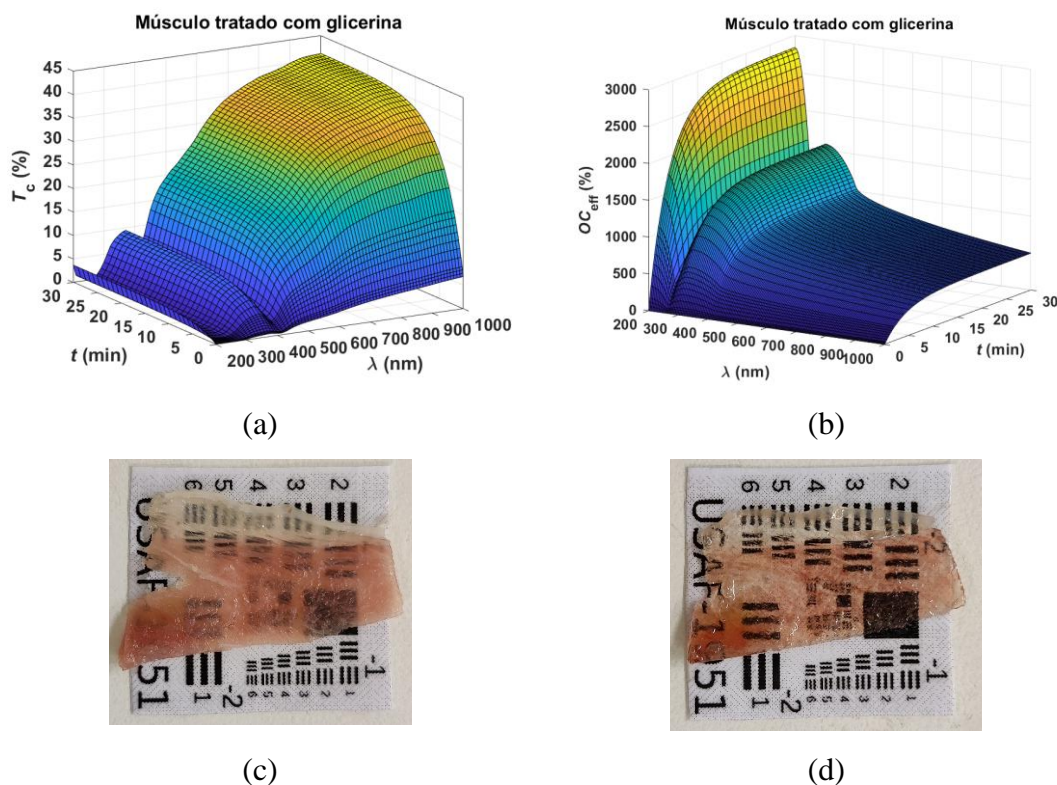
Na Figura 4.4 podemos verificar que há uma diferença significativa entre os líquidos analisados até aqui e os que faltam ainda analisar. As bandas de absorção de todos os óleos estudados têm uma amplitude de aproximadamente 100 %. Para além desta forte absorção, tais bandas são mais largas do que as verificadas para os líquidos que já analisamos e que já demonstraram ser capazes de criar transparência em tecidos biológicos. De facto, para o óleo de canela e para o óleo de cravo, estas bandas estendem-se até comprimentos de onda ainda no UV, mas já próximo do visível (~380-400 nm), uma característica que de nada é benéfica para a criação de transparência em tecidos biológicos.

Com a verificação destas fortes bandas de absorção para os óleos, que apresentam uma largura considerável dentro do UV, mesmo conjugadas com dispersões fortemente crescentes e superiores à dos outros líquidos nessa zona do espectro, não se esperam bons resultados na criação de transparência em tecidos. Para verificar se esta suspeita se verifica, foram feitos estudos de transparência em tecido muscular com todos os líquidos estudados. Nesses estudos, que são apresentados na secção seguinte, fizeram-se também fotografias do tecido antes e depois do tratamento aplicado, para verificar visualmente se a transparência era criada.

### 4.3. Estudos de transparência em músculo-esquelético

Após se ter feito a caracterização ótica dos líquidos que já são reconhecidos como agentes de transparência e ter identificado nos óleos características duais para a criação de transparência em tecidos, falta agora fazer uma verificação factual da capacidade de criação de transparência dos vários líquidos estudados.

Assim, foi adotado o músculo esquelético de coelho para testar todos os líquidos em estudo. A realização de tratamentos de transparência com todos os líquidos permite estabelecer um tratamento de referência com líquidos já reconhecidos como agentes de transparência, como é o caso da glicerina ou do *e-Cig*. Tais tratamentos de referência servirão para avaliar comparativamente e caracterizar os tratamentos a realizar com os outros líquidos que ainda não foram testados, nomeadamente os óleos. Vamos nesta secção apresentar para cada líquido estudado, a variação temporal do espectro de  $T_c$  ao longo de um tratamento de 30 min, a variação temporal da  $OC_{\text{eff}}$ , tal como calculada com a Equação (7) e também as fotos do tecido antes e depois do tratamento aplicado. Conjugando estes três tipos de informação poderemos avaliar e quantificar sobre a capacidade de criação de transparência de cada um dos líquidos estudados. Para fazer esta caracterização, vamos tomar por referência o tratamento realizado com a glicerina num grau de pureza de 99 %, uma vez que é considerado um dos melhores agentes de transparência, senão o melhor [3, 9]. A Figura 4.7 apresenta todos os resultados recolhidos para o tratamento realizado com este agente.

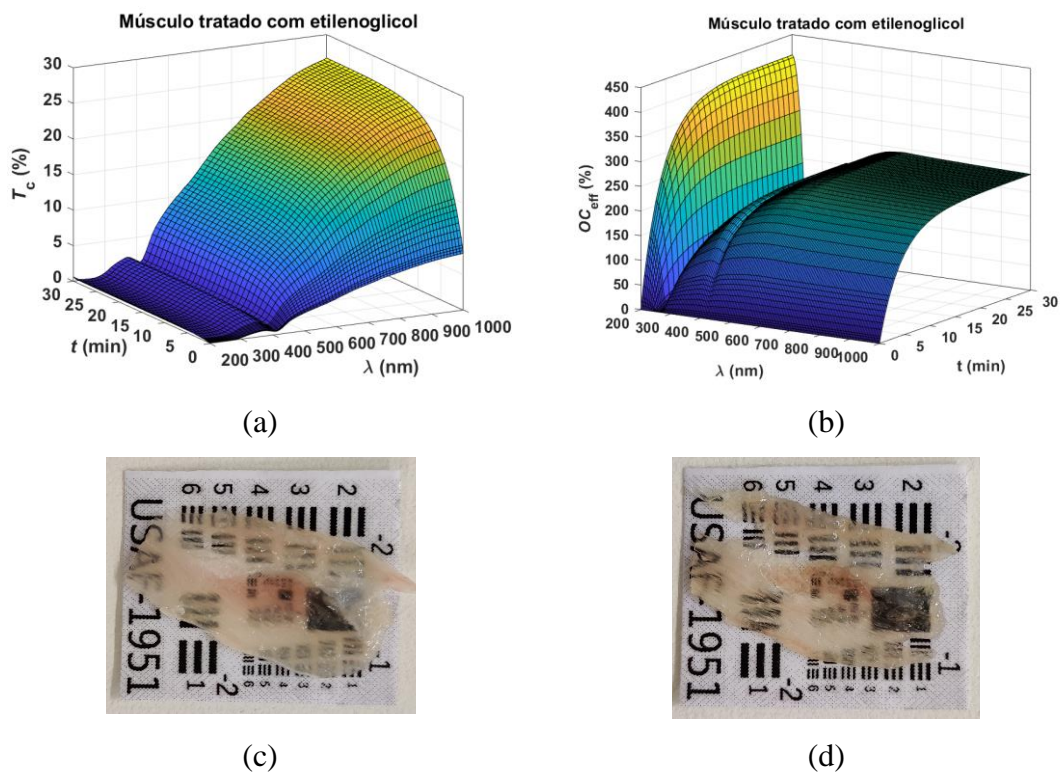


**Figura 4.7** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com uma solução de glicerina – 99 %, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

A Figura 4.7 (a) mostra que a glicerina cria transparência no músculo, de forma significativa e em quase todo o espectro. De facto, na zona espectral estudada, apenas numa banda do UV-profundo ( $220 \text{ nm} < \lambda < 280 \text{ nm}$ ) e na zona da banda de Soret ( $\sim 415 \text{ nm}$ ) é que o crescimento de  $T_c$  é pouco significativo. Este aspeto deve-se à ocorrência das bandas de absorção do ADN e da hemoglobina, componentes biológicos que as moléculas de glicerina não conseguem desidratar com facilidade, pois teria de ocorrer conversão de água ligada em água móvel [3]. Este gráfico, mostra, que devido à inserção de moléculas de glicerina no espaço intersticial, o IR médio do líquido intersticial aumenta, reduzindo assim o espalhamento da luz. Note-se que neste tratamento, devido à elevada concentração de glicerina na solução usada (99 %), o mecanismo de desidratação é muito rápido e impercetível nos gráficos apresentados [3, 10, 32, 33]. Se por outro lado olharmos para o gráfico na Figura 4.7 (b), verificamos que a eficiência do tratamento é muito elevada para comprimentos de onda próximos de 200 nm, criando nessa zona uma janela de transparência devido à ocorrência da adaptação de IRs e da dissociação das proteínas [7, 10, 51, 52]. Ao contrário do que o gráfico da Figura 4.7 (a) pode sugerir, a eficiência de transparência é muito mais elevada na zona do UV do que no visível e no

infravermelho. Isto deve-se ao facto de que para além da ocorrência da dissociação de proteínas, o desfasamento do IR no UV é significativamente superior ao que se verifica no visível [3]. Finalmente, comparando entre as fotografias representadas na Figura 4.7, confirmamos a criação de transparência na zona do visível, visto que depois de tratado o tecido é mais transparente do que o tecido natural. O tratamento estudado para esta solução de glicerina servirá como referência para avaliar a qualidade dos tratamentos produzidos pelos restantes líquidos.

Passando ao estudo feito com o etilenoglicol, a Figura 4.8, mostra resultados semelhantes aos da Figura 4.7, mas para a amostra de músculo tratada com esse líquido.



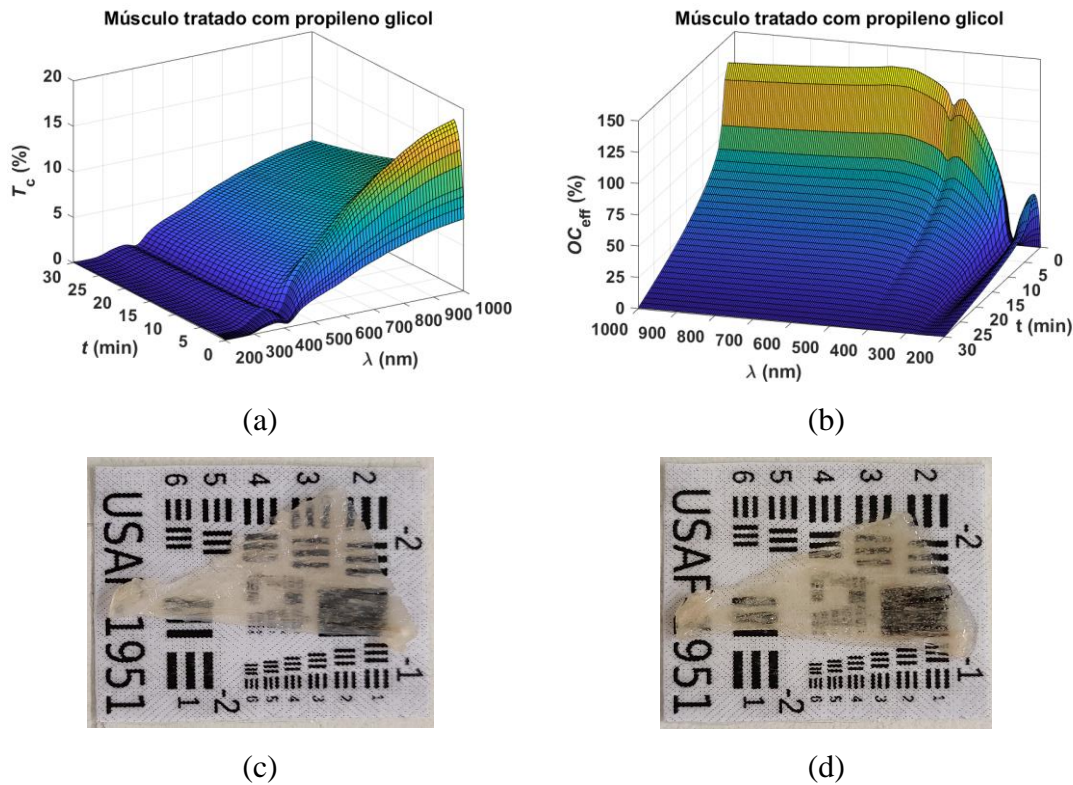
**Figura 4.8** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com etilenoglicol, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

Neste caso, e usando como referência os dados obtidos para a glicerina, o etilenoglicol cria transparência no músculo de forma semelhante à que foi criada pela glicerina, mas com uma magnitude inferior, se compararmos entre as figuras 4.7 (a) e 4.8 (a). Considerando a Figura 4.8 (b), o etilenoglicol cria também uma janela de transparência junto aos 200 nm, mas que apresenta uma magnitude de cerca de 6 a 7×

inferior à observada no tratamento com glicerina. Por outro lado, a magnitude da eficiência nessa janela de transparência é da mesma ordem de grandeza da observada no visível e no infravermelho ( $\lambda > 600$  nm). Estes resultados mostram que o etilenoglicol dissocia também as proteínas no músculo, mas devido a ter uma dispersão inferior à glicerina (ver Figura 4.3), não consegue realizar uma adaptação de IRs tão elevada como a obtida com a glicerina.

Olhando para as fotografias do tecido antes e depois do tratamento, verifica-se que na zona do visível, a transparência criada é inferior à produzida pela glicerina. Analisando todos estes resultados, o etilenoglicol cria transparência em todo o espectro e é capaz de dissociar proteínas. No entanto, a magnitude da transparência criada por este líquido é pequena, quando comparada com a observada para a glicerina. Sabe-se da literatura, que o etilenoglicol é um álcool tóxico para certos tecidos que contenham proteínas [53], como é o caso do músculo-esquelético. Até à data, não se sabe se a dissociação de proteínas criada pelo etilenoglicol é reversível. Por estas razões, e embora alguns estudos de transparência tenham sido feitos com este álcool [33, 47], o etilenoglicol é um líquido a evitar para criar transparência em tecidos biológicos devido à sua toxicidade e baixa eficiência de transparência em todo o espectro.

Passando ao estudo com o propileno glicol, fez-se também um tratamento com uma amostra de músculo, tendo-se obtido os resultados representados na Figura 4.9.



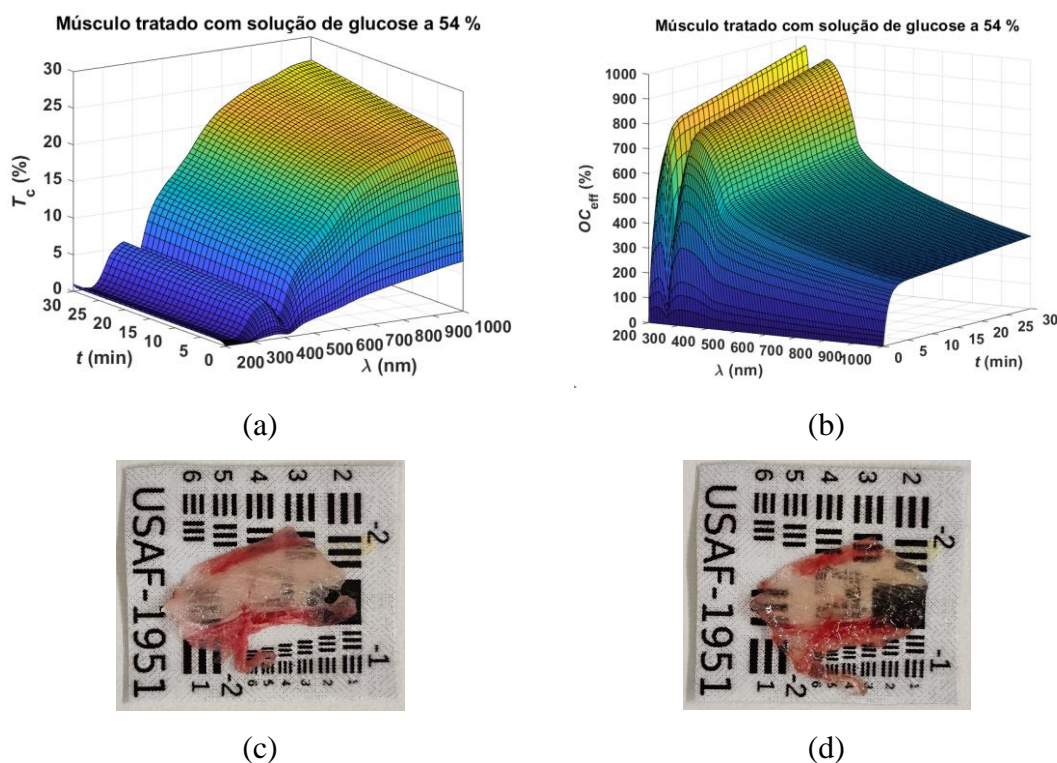
**Figura 4.9** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com propileno glicol, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

Analisando a evolução do espectro de  $T_c$  durante o tratamento com o propileno glicol, verificamos na Figura 4.9 (a) algo de interessante. Ocorre um crescimento forte no espectro durante os primeiros 2 min de tratamento, mas que é seguido de um decréscimo suave ao longo do resto do tratamento. Tal evolução temporal do espectro mostra de forma clara que o propileno glicol apenas induz a desidratação do tecido, uma vez que o crescimento rápido de  $T_c$  nos primeiros 2 min se deve ao fluxo de água para o exterior em consequência da pressão osmótica do agente sobre o tecido [7, 10]. A evolução temporal de  $OC_{eff}$ , que é nula por definição em todo o espectro do tecido natural ( $t=0$ ), comprova os resultados apresentados na Figura 4.9 (a), ou seja, só ocorre o mecanismo de desidratação do tecido, que está contido nos primeiros 2 min da imersão do tecido no líquido. Ao fim do tratamento, verificamos que o espectro de  $OC_{eff}$  volta a ser nulo, ou muito perto disso, o que significa que o tecido voltou ao seu estado natural após ter perdido água. Tal resultado, que é confirmado pela comparação entre as fotografias da Figura 4.9, mostra que após ocorrer o fluxo inicial de água para o exterior devido à pressão osmótica do propileno glicol, a difusão de moléculas deste líquido não ocorre para o interior do tecido. Em vez disso, após a desidratação inicial, e devido a passar a haver um excesso de água

na solução usada em relação à água móvel dentro do tecido, ocorre um fluxo de água da solução para o tecido, impedido a ocorrência do mecanismo de adaptação de IRs e a verificação do potencial deste álcool em dissociar proteínas.

Em face dos resultados obtidos com o propileno glicol, verificamos que este líquido não pode ser considerado como um agente de transparência só por si. No entanto, quando combinado com outro agente, como por exemplo a glicerina, como veremos abaixo no estudo com o *e-Cig*, o propileno glicol ajuda a tornar o processo de desidratação do tecido mais rápido e também a aumentar a permeabilidade das membranas do tecido à introdução das moléculas da glicerina, que irá realizar a adaptação de IRs, tal como descrito na literatura [31].

O tratamento realizado com a solução de glucose a 54 % produziu também transparência como mostram os resultados apresentados na Figura 4.10.



**Figura 4.10** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com solução de glucose a 54 %, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

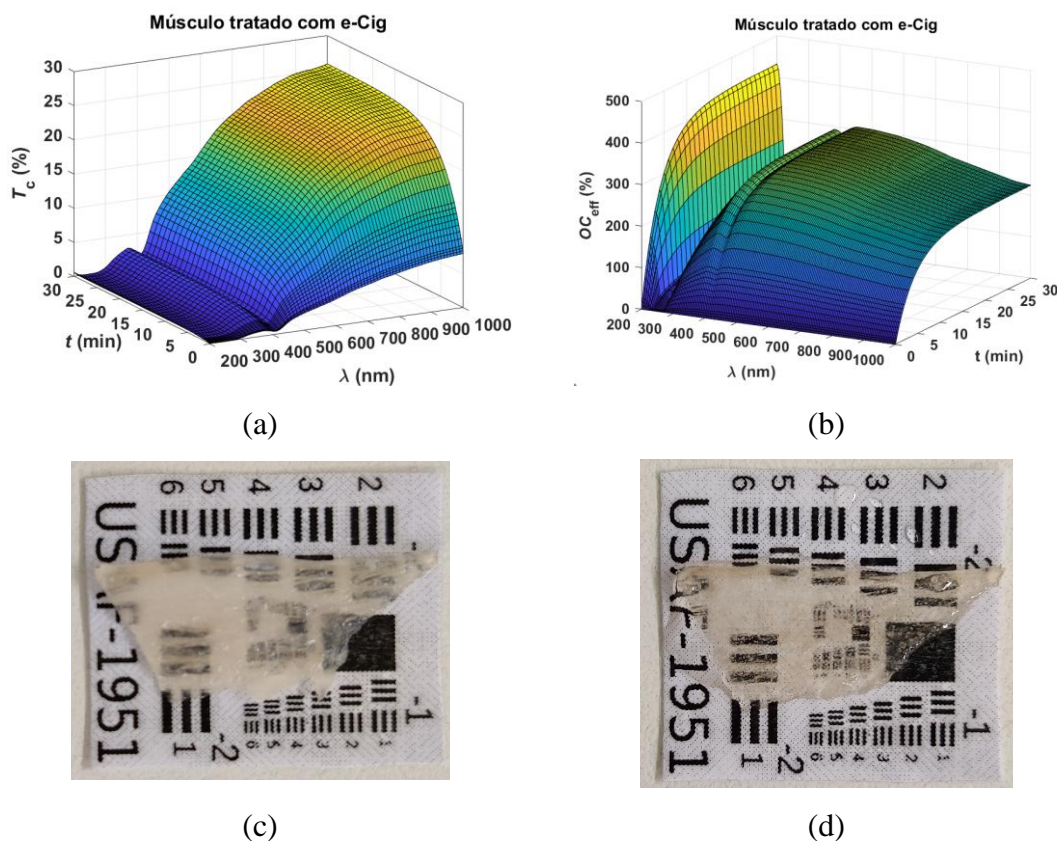
Dado que a solução aquosa usada contém 54 % de glucose, existe mais água móvel dentro do tecido (60 %) do que na solução (46 %) [32]. Este desequilíbrio entre as águas

no tecido e na solução, que corresponde a uma concentração de glucose elevada, induz a ocorrência do mecanismo de desidratação do tecido no início do tratamento, o que é visível nos primeiros 3 min da Figura 4.10 (a). Depois dos 3 min iniciais, o espectro de  $T_c$  cresce apenas ligeiramente, mostrando que as moléculas de glucose que se difundiram para o interior fazem uma adaptação modesta de IRs. A Figura 4.10 (b) confirma os resultados apresentados na Figura 4.10 (a), mas dá outro tipo de informação. Mais uma vez, devido à ocorrência da banda de absorção do ADN a 260 nm [49], surgem duas janelas de transparência, uma à esquerda e outra à direita da banda de absorção do ADN. Dada a ocorrência destas duas bandas, com valores de magnitude semelhantes a 230 e a 300 nm, podemos concluir que ocorre apenas a adaptação de IRs no UV de forma mais eficiente do que no visível e no infravermelho. Não há dissociação de proteínas, uma vez que a janela de transparência centrada a 230 nm não apresenta valores consideravelmente superiores aos observados para a janela centrada a 300 nm.

Apesar de se verificar uma forte desidratação do tecido e uma modesta adaptação de IRs, sem a ocorrência da dissociação de proteínas pela glucose, comparando entre as fotografias da Figura 4.10, verifica-se que existe criação de transparência na zona do visível.

Assim, em face dos resultados obtidos, podemos concluir que a glucose é um bom agente de transparência, que proporciona uma boa desidratação do tecido e uma adaptação significativa de IRs, mas que não é capaz de dissociar as proteínas no tecido. Este agente pode ser usado para criar transparência em tecidos biológicos em várias aplicações, uma vez que pode ser diluído em água até à concentração máxima de 54 % [32]. Concentrações mais elevadas são também possíveis de criar, embora em vez de uma solução aquosa, se produza um gel [3]. Dependendo da transparência que se pretende obter, basta preparar uma solução com uma concentração específica e inferior a 54 % e considerar as propriedades de difusão da glucose no tecido pretendido, embora até à data se conheçam essas propriedades apenas em tecido muscular [32].

Conforme foi referido acima, aquando do estudo do propileno glicol, vamos agora analisar os resultados obtidos no tratamento realizado com o *e-Cig*, que consiste numa mistura de 70 % de glicerina com 30 % de propileno glicol. Os resultados deste estudo encontram-se representados na Figura 4.11.

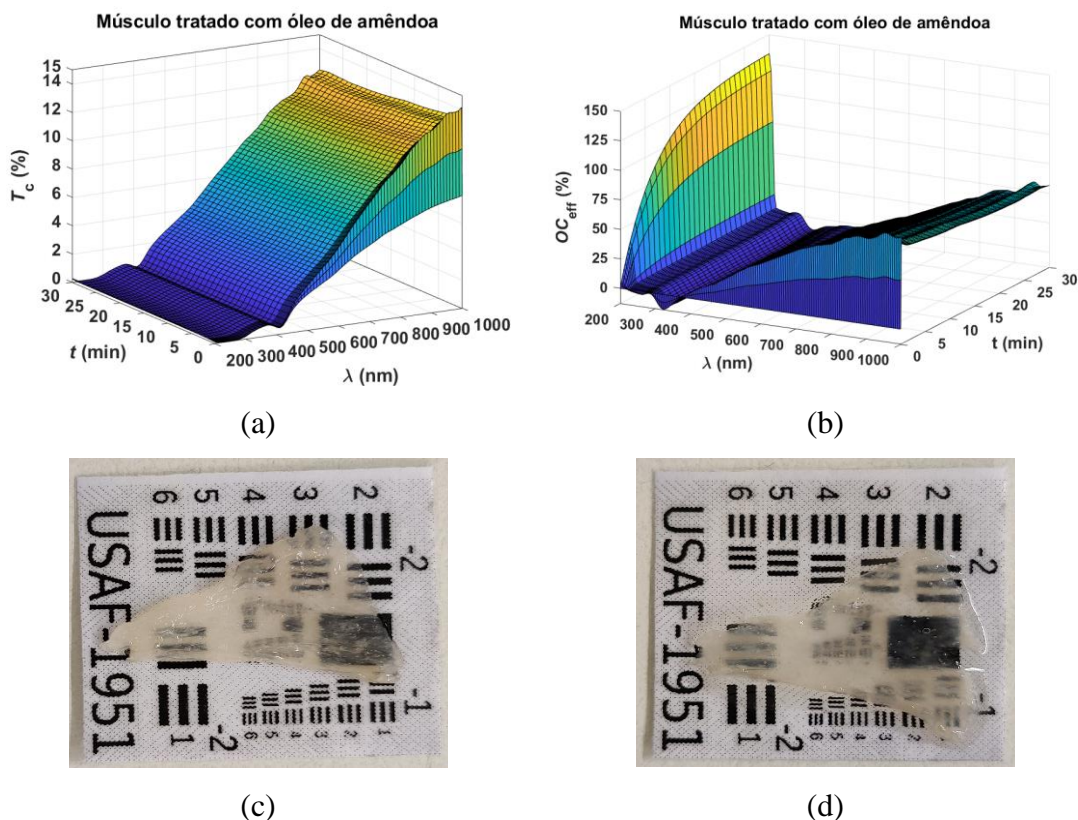


**Figura 4.11** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com *e-Cig*, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

A evolução temporal do espectro de  $T_c$  apresentada na Figura 4.11 (a) mostra um crescimento suave e gradual ao longo de todo o tratamento. Tal resultado mostra que os mecanismos de desidratação do tecido e de adaptação de IRs ocorrem em simultâneo, levando ao crescimento suave do espectro. Tal como já referido, a literatura indica que o propileno glicol induz um aumento da permeabilidade das membranas dos tecidos à passagem das moléculas de glicerina [31]. Por outro lado, o propileno glicol não consegue realizar a adaptação de IRs dentro do tecido, uma vez que não se difunde para o interior deste, como vimos na Figura 4.9 (a), mas como mostra essa figura, é eficaz na criação do mecanismo de desidratação. Assim, combinando 30 % de propileno glicol com 70 % de glicerina, consegue-se a maximização dos dois mecanismos principais da criação de transparência no músculo, como mostra a Figura 4.11 (a). Esta mistura dos dois líquidos é um produto comercial usado em cigarros eletrónicos, o que demonstra que esta combinação não foi feita ao acaso pela indústria tabaqueira, pois proporciona a desidratação rápida das mucosas nasais e da orofaringe para depois otimizar a difusão da nicotina que é transportada pelas moléculas de glicerina. A representação da  $OC_{eff}$  na

Figura 4.11 (b) mostra que esta mistura é eficiente em todo o espectro, com a exceção das bandas do ADN a 260 nm e da hemoglobina a 415 nm (banda de Soret) [49]. A magnitude da  $OC_{\text{eff}}$  também não difere muito em diferentes zonas do espectro, isto porque com apenas 70 % das moléculas de glicerina na solução usada para o tratamento, não se consegue em 30 min uma concentração elevada o suficiente dessas moléculas dentro do tecido para que ocorra a dissociação de proteínas em grande quantidade. No que diz respeito à zona do espectro visível, verificamos pelas fotografias apresentadas na Figura 4.11, que esta combinação de líquidos é boa para tornar o tecido mais transparente. Uma publicação recente, mostra que o tratamento de tecido pulmonar com *e-Cig* é totalmente reversível para comprimentos de onda acima de 220 nm [31]. Todos estes resultados mostram que o *e-Cig* é um bom agente de transparência, que pode ser aplicado com tecidos biológicos.

Passando ao estudo feito com óleo de amêndoa, a Figura 4.12 apresenta os resultados obtidos de uma amostra de músculo sujeita a tratamento.

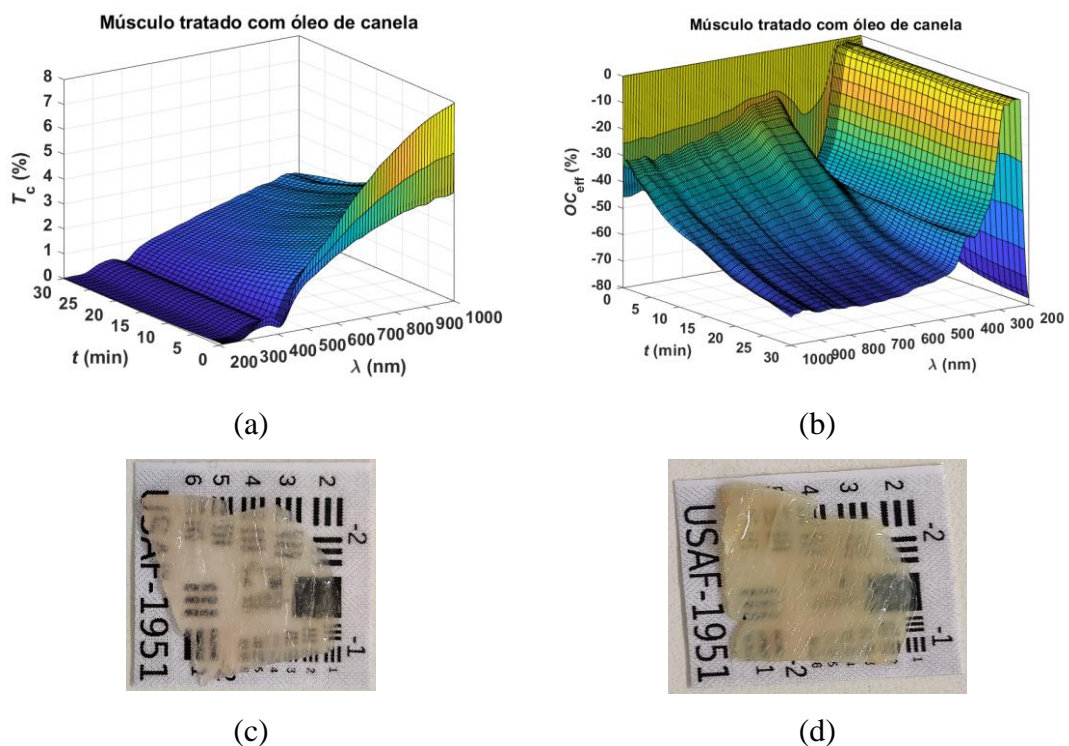


**Figura 4.12** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de amêndoa, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{\text{eff}}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

Analisando os resultados apresentados na Figura 4.12 (a), verificamos que o óleo de amêndoa induz uma desidratação muito rápida do tecido, pois o espectro de  $T_c$  do tecido cresce nos primeiros 10 s. No entanto, após esse crescimento rápido de  $T_c$ , verificamos que o espectro volta a diminuir até cerca dos 2 min, ficando mais ou menos estável a partir daí. Apesar de ocorrer uma diminuição da transparência do tecido até aos 2 min de tratamento, tal diminuição, que se deve à inserção de alguma água de volta para o interior do tecido, não é suficiente para reverter na totalidade a desidratação inicial. Isto mostra que o óleo de amêndoa impede a difusão de grandes quantidades de água para o interior do tecido após a desidratação inicial criada pela pressão osmótica do óleo. Pela Figura 4.12 (b), vemos que a evolução temporal da  $OC_{\text{eff}}$  comprova os efeitos observados no gráfico de  $T_c$ , uma vez que ocorre um crescimento inicial da eficiência, que depois é parcialmente revertido. Este comportamento é observado para comprimentos de onda no visível e no infravermelho, mas no UV, o comportamento é distinto. Embora globalmente não ocorram variações significativas da eficiência na zona do UV, há duas bandas espectrais com comportamentos distintos e interessantes para analisar. A primeira dessas zonas, centrada junto aos 200 nm, mostra a criação de uma janela de transparência limitada superiormente a 240 nm, com um máximo precisamente a 200 nm. A ocorrência desta janela, com valores superiores aos observados para os comprimentos de onda mais elevados, dá a ideia de que ocorreu alguma dissociação de proteínas. No entanto, à falta de verificação da ocorrência de adaptação de IRs, sabe-se que o óleo de amêndoa não se difundiu para o interior do tecido. Assim, a dissociação de proteínas observada na Figura 4.12 (b) teve de ocorrer apenas nas camadas exteriores do tecido, onde existe contacto com o óleo de amêndoa em que o tecido esteve imerso. Por outro lado, numa banda de comprimentos de onda centrada a 320 nm, observamos uma diminuição da  $OC_{\text{eff}}$ , com valores de eficiência negativos ao longo do tratamento. A ocorrência desta “janela de opacidade” não pode ser atribuída a propriedades do tecido, uma vez que nada semelhante ocorreu nos tratamentos já analisados até aqui. Tal eficiência negativa ocorre devido ao espectro de absorção do óleo de amêndoa (ver Figura 4.5 (f)), uma vez que a absorção deste óleo é muito forte entre 200 e 320 nm. Comparando entre as fotografias do tecido antes e depois da aplicação do tratamento, observamos que para a zona visível do espectro, o tecido se torna ligeiramente mais transparente, o que está de acordo com a análise feita aos gráficos de  $T_c$  e de  $OC_{\text{eff}}$ .

Assim, podemos concluir que o óleo de amêndoa, apesar de apresentar uma dispersão elevada, não permite criar efeitos de transparência significativos em todo o espectro considerado no presente trabalho. Tal facto deve-se à sua banda de absorção dentro do UV (ver Figura 4.5 (f)), que apresenta valores de 100 % entre 220 e 280 nm. Apesar da falta de eficiência espectral do óleo de amêndoa, verificamos que apresenta alguns benefícios na criação de transparência. O tecido ficou ligeiramente mais transparente na zona espectral do visível ao infravermelho e ocorreu alguma dissociação de proteínas nas camadas superficiais do tecido em tratamento. São aspetos benéficos a considerar para potenciais aplicações, onde este óleo pode ser combinado com outros agentes para criar transparência em tecidos biológicos.

Passando ao óleo de canela, fez-se um tratamento semelhante numa amostra de músculo, tendo-se obtido os resultados apresentados na Figura 4.13.



**Figura 4.13** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de canela, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

Os resultados apresentados na Figura 4.13 mostram que o óleo de canela não deve ser usado como agente de transparência. Conforme mostra a variação temporal da  $T_c$ , este

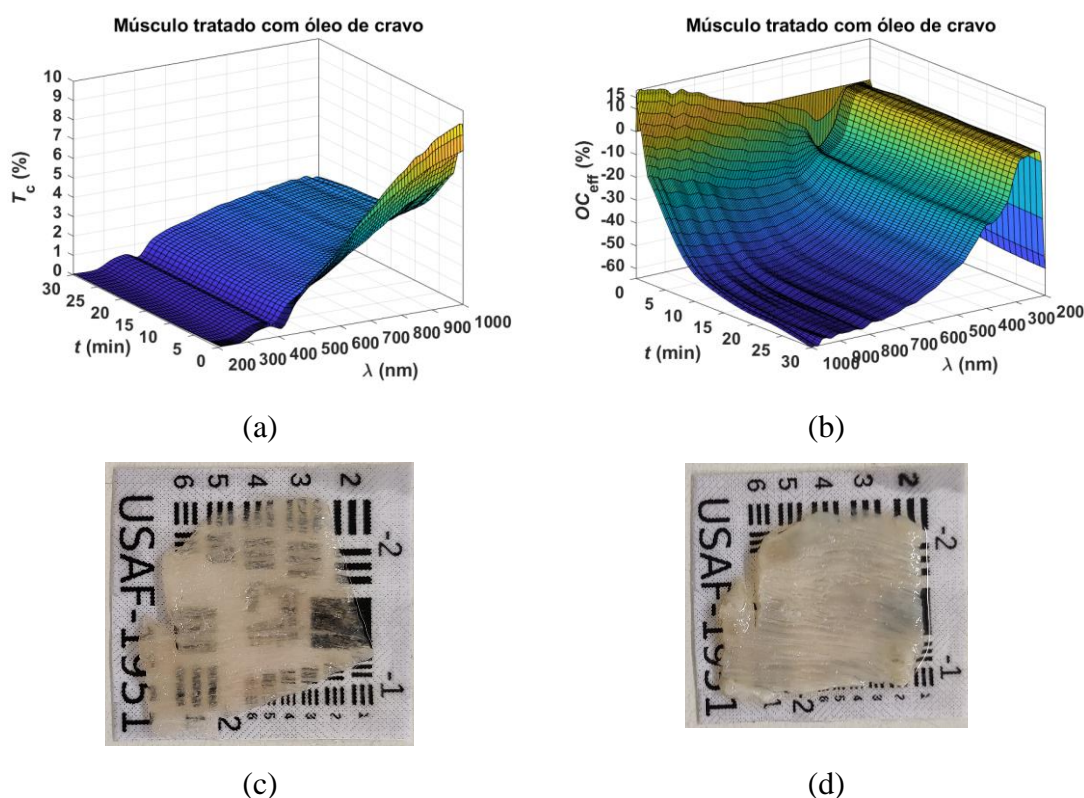
espectro cai drasticamente nos primeiros 10 s de imersão e depois apresenta um decréscimo mais modesto e contínuo ao longo do resto do tratamento. A evolução temporal da  $OC_{\text{eff}}$  comprova as variações observadas na variação temporal da  $T_c$  nas zonas do visível e do infravermelho, mas evidencia um comportamento distinto para a zona do UV. Verifica-se por esse gráfico que entre 230 e 290 nm, o decréscimo é mínimo e restrito aos primeiros 5 s de tratamento, mantendo-se constante a partir daí e até ao fim do tratamento. Este comportamento distinto nessa zona do espectro mostra que não há desidratação das moléculas de ADN/ARN [49]. O decréscimo observado entre 200 e 230 nm, que é mais lento do que o decréscimo observado para comprimentos de onda acima de 290 nm, mostra que também as proteínas sofrem desidratação devido ao estímulo criado pelo óleo de canela. Como consequência, as proteínas aproximam-se lentamente entre si e bloqueiam a passagem da luz nestes comprimentos de onda, facto que é traduzido pela diminuição mais lenta da  $OC_{\text{eff}}$ . Note-se que a falta de valores positivos da  $OC_{\text{eff}}$  nesta zona do espectro indica que não há dissociação de proteínas. Outro aspeto mais grave que a Figura 4.13 (b) parece sugerir é que o tratamento aplicado com o óleo de canela induz uma alteração na forma do espectro do músculo em estudo.

As variações negativas observadas para a  $OC_{\text{eff}}$  são prova de que o óleo de canela provocou unicamente uma desidratação lenta das proteínas e dos restantes componentes do tecido, com a exceção do ADN. Este comportamento leva a uma aproximação entre todos os componentes biológicos do tecido, que deve estar associada a uma diminuição de espessura da amostra estudada. A medição das variações de espessura não foi planeada para o presente trabalho, mas se tivesse sido feita neste caso específico, certamente iria mostrar que ocorreu uma diminuição da espessura da amostra. Analisando e comparando entre as fotografias da amostra apresentadas na Figura 4.13, verificamos que de facto a amostra tratada ficou mais opaca à passagem da luz, o que comprova a perda de água intersticial e a compactação dos restantes componentes biológicos num volume menor. Em face dos resultados obtidos, verificamos que o óleo de canela não apresenta propriedades osmóticas, o que impede a sua difusão para o espaço intersticial libertado pela água móvel do tecido. Este facto impede a ocorrência dos mecanismos de adaptação de IRs e de dissociação das proteínas.

Assim, o óleo de canela, apesar de apresentar uma dispersão com valores elevados (ver Figura 4.2 (g)), não cria transparência no tecido muscular. As razões para tal incapacidade deste óleo prendem-se com a falta de características osmóticas, conforme

verificamos pela análise dos gráficos apresentados na Figura 4.13, e também pela banda de absorção que este óleo apresenta (ver Figura 4.4 (g) e Figura 4.5). Como vimos antes, o óleo de canela apresenta uma absorção de aproximadamente 100 % entre sensivelmente 240 e 400 nm, o que impediria uma boa adaptação de IRs, caso este óleo se difundisse para o interior do músculo.

Passando ao estudo com o óleo de cravo, observamos pela Figura 4.14 resultados semelhantes aos obtidos com o óleo de canela.



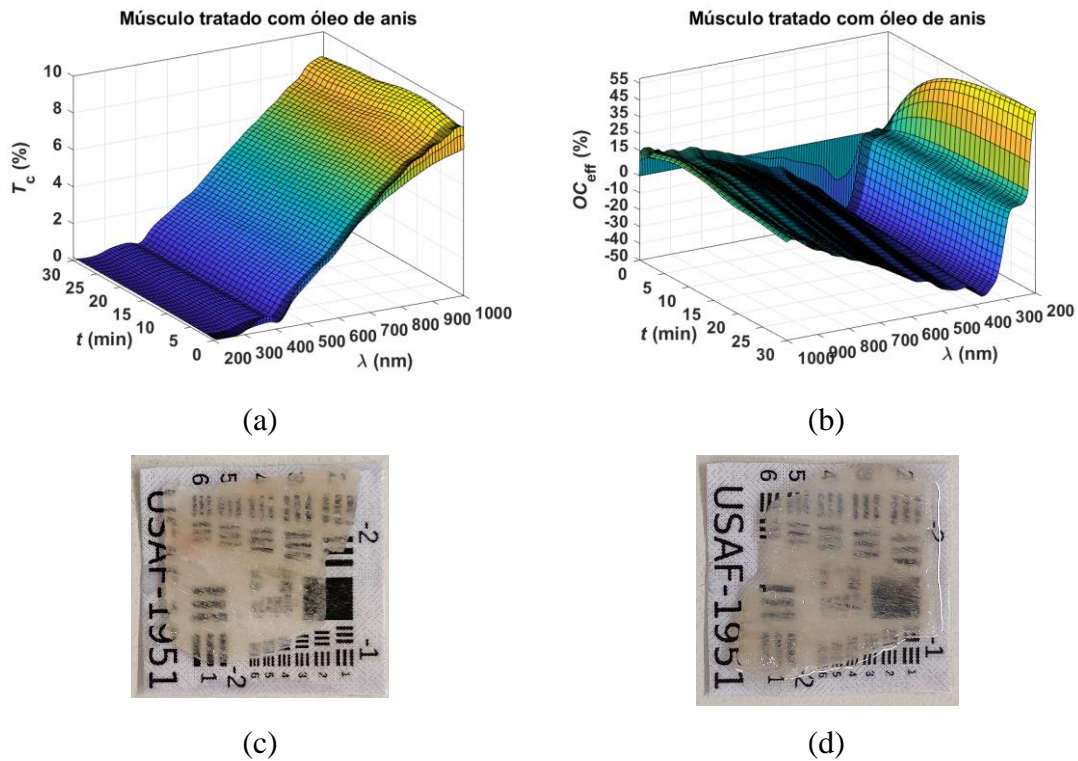
**Figura 4.14** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de cravo, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

Analisando os gráficos e fotografias da Figura 4.14, verificamos semelhanças com os resultados obtidos com o óleo de canela, ou seja, ocorre apenas uma desidratação lenta do tecido. O gráfico da variação temporal de  $T_c$  mostra que apesar de se verificar um crescimento inicial do espectro para comprimentos de onda acima de  $\sim 600$  nm, este crescimento é modesto e restrito aos primeiros 10 s de tratamento. Durante quase toda a extensão do tratamento, o espectro da  $T_c$  cai até estabilizar em valores inferiores aos medidos para o tecido natural. Pelo gráfico da variação temporal da  $OC_{eff}$  verificamos um

comportamento semelhante ao obtido com o tratamento feito com óleo de canela. Neste caso, apesar de vermos uma eficiência crescente nos primeiros 10 s de tratamento para comprimentos de onda acima de 600 nm, o comportamento é decrescente para o restante tempo do tratamento e para todos os comprimentos de onda, com a exceção da zona espectral entre 230 e 290 nm. Mais uma vez, o óleo de cravo faz uma desidratação do tecido, agora mais lenta do que a produzida pelo óleo de canela, o que leva à aproximação entre os componentes biológicos do músculo, tornando o tecido mais opaco à passagem da luz em quase toda a banda espectral considerada. Novamente, a zona entre os 230 e os 290 nm é exceção à regra, pois a  $OC_{\text{eff}}$  mantém-se constante nessa zona do espectro. Isto significa que as moléculas de ADN/ARN não perdem a água que a elas está ligada, ou seja, apenas as moléculas de água móvel participam no processo de desidratação [3, 54, 55], sem ocorrer conversão da água ligada em água móvel.

Tal como analisado para o caso do tratamento com óleo de canela, o tratamento com o óleo de cravo não mostra evidência de que este óleo se difunda para o interior do tecido em estudo, o que impede a ocorrência dos mecanismos de adaptação de IRs e de dissociação de proteínas. Caso ocorresse a difusão do óleo de cravo para o interior do tecido, a adaptação de IRs seria mais uma vez muito reduzida ou praticamente nula, uma vez que a banda de absorção deste óleo é semelhante à do óleo de canela (ver Figura 4.6). A contínua variação da  $OC_{\text{eff}}$  com valores sempre negativos e decrescentes ao longo de todo o tempo de tratamento e para quase toda a banda espectral considerada, mostra que os efeitos produzidos pelo óleo de cravo na amostra tratada devem ser também de uma diminuição da espessura da amostra como consequência da única perda de água móvel por parte do tecido. As fotografias apresentadas na Figura 4.14 são também evidência dessa diminuição de espessura (e do volume como um todo também), uma vez que após tratada a amostra se tornou mais opaca como resultado de um bloqueio da luz visível por parte dos componentes biológicos que agora se encontram agregados de forma uniforme e mais compacta por todo o volume da amostra.

Passando ao tratamento feito com o óleo de anis, observa-se também uma perda de transparência por parte da amostra usada, mas de forma distinta para diferentes zonas do espectro, conforme mostram os resultados apresentados na Figura 4.15.



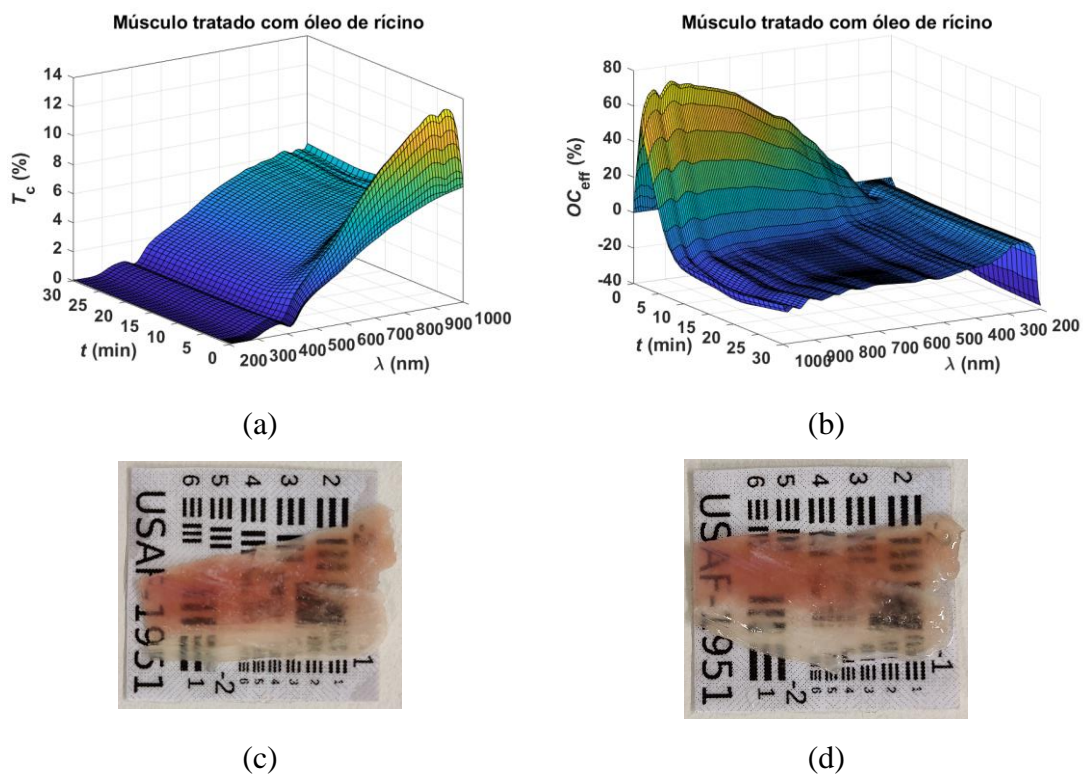
**Figura 4.15** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de anis, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

Conforme podemos ver pelo gráfico de  $T_c$  na Figura 4.15 (a), o óleo de anis apresenta um crescimento inicial modesto do espectro apenas para comprimentos de onda acima de 700 nm. Mais uma vez, este crescimento reduzido está contido nos primeiros 10 s de tratamento. Apesar de no restante tempo de tratamento se verificar um decréscimo da  $T_c$ , esta variação é de menor magnitude do que a que foi observada para os tratamentos com o óleo de canela e com o óleo de cravo. Para termos uma percepção mais detalhada acerca das variações produzidas no tecido em tratamento com o óleo de anis, verificamos pela Figura 4.15 (b) que a variação temporal da  $OC_{eff}$  apresenta comportamentos distintos em diferentes zonas do espectro estudado. Após os primeiros 10 s de tratamento e para comprimentos de onda acima de 370 nm observamos um decréscimo modesto da  $OC_{eff}$ , cuja magnitude diminui com o aumento do comprimento de onda. Tal decréscimo acaba por levar a que o tecido fique menos transparente do que no seu estado natural para todos os comprimentos de onda abaixo de 800 nm. A 370 nm, verifica-se que essa transparência diminuiu mais de 50 %. Para comprimentos de onda inferiores a 370 nm, verificamos que há uma invariância da transparência entre 240 e 290 nm, o que mostra que também o óleo de anis não é capaz de alterar a hidratação das moléculas de ADN/ARN. Entre 200 e 240

nm, vemos que ocorre uma  $OC_{\text{eff}}$  positiva, indicando que este óleo dissocia proteínas, com uma eficiência que chega a 55 % a 200 nm. Tal como no caso do óleo de amêndoa, sem a difusão do óleo de anis para o interior do tecido, tal dissociação de proteínas teve de ocorrer nas camadas exteriores do tecido. O gráfico da  $OC_{\text{eff}}$  mostra que no fim do tratamento, a zona do visível apresenta decréscimos entre 40 % (a 400 nm) e 17 % (a 700 nm), sendo que no pico da sensibilidade do olho humano (a 555 nm) se verifica um decréscimo da transparência na ordem de 30 %. Esta perda de transparência na zona do espetro visível é confirmada pela comparação entre as fotografias apresentadas na Figura 4.15, pois o tecido tratado apresenta uma ligeira diminuição de transparência.

Embora a banda de absorção do óleo de anis seja mais estreita do que as bandas de absorção do óleo de canela e do óleo de cravo, e localizada a comprimentos de onda mais baixos dentro do UV, os resultados obtidos no estudo com este óleo são apenas ligeiramente melhores do que os obtidos com os outros dois óleos. Mais uma vez, ocorre uma rápida desidratação do tecido, provavelmente com uma diminuição reduzida da espessura do tecido, o que leva à aproximação dos componentes biológicos do músculo para bloquear a passagem da luz numa zona significativa do espetro estudado. Em contradição com os resultados obtidos com o óleo de canela e com o óleo de cravo, verificamos aqui que o óleo de anis produz a dissociação de proteínas no músculo, o que pode ser uma mais-valia em certas aplicações futuras, em que este óleo possa ser misturado com outros agentes de transparência para tratar tecidos biológicos específicos.

Para finalizar o nosso estudo, passamos ao tratamento com o óleo de rícino. Os resultados obtidos neste caso mostram maior homogeneidade espectral dos comportamentos observados ao longo do tempo, conforme mostram os gráficos apresentados na Figura 4.16.



**Figura 4.16** - Resultados do tratamento de uma amostra de músculo com óleo de rícino, mostrando a evolução temporal do espectro de  $T_c$  (a), a evolução do espectro de  $OC_{eff}$  (b), uma fotografia do tecido natural (c) e uma fotografia do tecido tratado (d).

Analisando a variação temporal do espectro de  $T_c$ , verificamos que o óleo de rícino induz uma desidratação semelhante à observada em tratamentos com vários agentes de transparência [3], ou seja, contida dentro dos primeiros 2 min de tratamento. No entanto, após os 2 min, verifica-se um decréscimo de  $T_c$ , o que mostra, que não há difusão do óleo para o interior do tecido para realizar a adaptação de IRs ou a desidratação de proteínas. Em vez disso, a água que fluiu para o exterior durante a desidratação, passa agora a difundir-se para o interior, o que faz baixar o espectro de  $T_c$ , durante o restante tempo de tratamento.

Passando à análise da variação temporal da  $OC_{eff}$  verificamos que de facto há a ocorrência da desidratação do tecido nos primeiros 2 min de tratamento, que é depois revertida até ao fim dos 30 min, com a entrada de água. Na realidade, ao fim do tratamento a  $OC_{eff}$  apresenta valores na ordem de  $-20\%$  para comprimentos de onda acima de 400 nm, o que sugere a inserção de alguma água adicional, para além daquela que o tecido perdeu no processo de desidratação. Na verdade, tal é possível, pois estes óleos comerciais são produzidos misturando água com sementes ou plantas secas e alguns outros ingredientes não publicitados na embalagem. Assim, o facto de vermos uma  $OC_{eff}$

final na ordem de  $-20\%$  significa que devido à interação do óleo com o tecido, este foi capaz de absorver alguma água que o óleo continha. Considerando agora a zona do UV na Figura 4.14 (b), verificamos novamente que não ocorre desidratação do ADN, uma vez que entre 240 e 290 nm, a  $OC_{\text{eff}}$  se mantém praticamente constante. Para comprimentos de onda abaixo de 240 nm, verifica-se um decréscimo lento da  $OC_{\text{eff}}$ , o que à semelhança dos resultados observados para os tratamentos aplicados com outros óleos, mostra que ocorre uma desidratação das proteínas no músculo em tratamento, o que leva a que este fique mais opaco à luz do UV profundo. A comparação entre as fotografias do tecido antes e após o tratamento aplicado com o óleo de rícino, comprova que o tecido se tornou ligeiramente menos transparente na zona do espectro visível.

Em face destes resultados, verificamos que o óleo de rícino também não pode ser considerado um agente de transparência por si só. Embora tenha induzido um mecanismo de desidratação de elevada magnitude no início, não produz qualquer efeito na adaptação de IRs nem na dissociação de proteínas. No entanto, dado que a magnitude da desidratação produzida é elevada e que não parece induzir alterações no espectro do tecido, o óleo de rícino poderá ser combinado com outros agentes de transparência para criar bons efeitos de transparência em tecidos biológicos. Uma possível combinação será usar uma mistura semelhante á do *e-Cig*, mas em que o propileno glicol é substituído pelo óleo de rícino, para produzir uma desidratação mais elevada. Estudos com tal mistura poderão verificar se o óleo de rícino produz também um aumento da permeabilidade das membranas de tecidos à passagem de agentes como a glicerina, tal como acontece no caso do propileno glicol [31]. Estas e outras perspetivas futuras de investigação são apresentadas no próximo capítulo, juntamente com as conclusões do presente trabalho.

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO



## 5. Conclusão

Após termos terminado a apresentação de resultados e a respetiva discussão, é altura de tirar conclusões do estudo realizado e apresentar perspectivas para futuros trabalhos de investigação. Conforme pudemos ver no capítulo anterior, certos OCAs, como a glicerina, o etilenoglicol ou o *e-Cig*, apresentam bons resultados na criação de transparência no tecido músculo-esquelético. Por outro lado, embora as dispersões obtidas para estes e outros líquidos estejam em boa concordância com as dispersões publicadas, os espectros de  $T_c$  medidos no decorrer do presente trabalho mostraram que estes líquidos poderão ter sido contaminados com proteínas e ADN durante a sua preparação ou manuseamento. Uma análise separada dos tratamentos produzidos pela glicerina e pelo propileno glicol, mostra que o primeiro induz maioritariamente os mecanismos de adaptação de IRs e de dissociação de proteínas, enquanto o último induz unicamente o mecanismo de desidratação do tecido. Em face destas características percebemos porque a combinação destes dois álcoois, como no caso do *e-Cig* funciona bem na criação de efeitos de transparência numa zona espectral alargada e em particular no UV como demonstrado em estudos anteriores.

Passando aos resultados obtidos com os óleos de produtos naturais, verificamos que o facto de apresentarem valores de IR elevados é apenas uma falsa expectativa para que possam criar efeitos de transparência em tecidos biológicos. Com este estudo foi possível criar as curvas de dispersão para estes óleos, que eram anteriormente desconhecidas entre 200 e 1000 nm. No entanto, a avaliação das suas bandas de absorção, através da medição dos seus espectros de  $T_c$ , mostraram que devido a serem de elevada magnitude (na ordem de 100 %), algumas delas com uma largura espectral elevada e centradas na zona do UV, estes óleos não poderiam ser considerados potenciais OCAs. Tal facto foi confirmado com os tratamentos realizados, mostrando que todos os óleos analisados apresentam globalmente eficiências de transparência que diminuem ao longo do tratamento aplicado. No entanto, o estudo destes tratamentos mostrou que alguns destes óleos poderão ser usados em combinação com outros agentes de transparência para otimizar a desidratação do tecido, aumentar a permeabilidade das membranas de tecidos biológicos à difusão de tais agentes, ou para induzir o mecanismo de dissociação de proteínas se tal for pretendido.

Em face destes resultados, será desejável realizar novos estudos em que tratamentos com misturas de certos agentes de transparência como a glicerina e óleos como o óleo de amêndoa, o óleo de rícino ou mesmo o óleo de anis, em diferentes proporções possam ser testados para avaliar a eficiência da transparência criada num determinado tecido e quantificar a magnitude de cada um dos mecanismos de transparência envolvidos. Os óleos usados no presente estudo foram comprados como produtos comerciais em ervanárias e supermercados. Isto significa que tais óleos devem conter certos ingredientes desconhecidos que podem de alguma forma neutralizar a difusão do óleo para o interior dos tecidos biológicos para produzir a adaptação de IRs. Futuros estudos em que os referidos óleos sejam preparados de forma simples, apenas com a diluição da planta ou da semente em água destilada, sem quaisquer outros aditivos, poderão produzir tratamentos distintos dos obtidos no presente trabalho e que possam ter interesse para a criação de transparência em tecidos biológicos.

A tabela abaixo apresenta, de uma forma sintetizada, as conclusões:

**Tabela 5.1** - Quadro síntese.

<b>Agentes</b>	<b>Transmitância e Eficiência</b>	<b>Conclusão</b>
Glicerina e Etilenoglicol	Transparência significativa em todo o espectro. No entanto, o efeito criado pelo etilenoglicol apresentou menor magnitude.  Ambos criam uma janela de transparência centrada nos 200 nm, mas no tratamento com glicerina verifica-se a adaptação dos IRs e a dissociação de proteínas, enquanto que no tratamento com etilenoglicol se verifica apenas a dissociação de proteínas que tem menor magnitude.	Apesar de comportamentos semelhantes, o efeito criado pelo etilenoglicol é de menor magnitude. Considerando também que o etilenoglicol é um álcool tóxico, não deve ser considerado como agente de transparência.
Propileno glicol	Crescimento rápido e forte seguido de um decréscimo suave ao longo do espectro.	Não deve ser considerado um agente de transparência por si só, mas quando combinado com outros

	Acaba e termina com um eficiência nula devido à reinserção de água.	agentes apresenta bons resultados.
Glucose 54 % e <i>e-Cig</i>	<p>Crescimento suave ao longo de todo o espectro devido à desidratação inicial do tecido e à boa difusão de glucose ou de glicerina para o interior do tecido.</p> <p>A glucose 54 % apresenta duas janelas de transparência de magnitudes semelhantes, o que mostra a glucose só consegue induzir os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs.</p>	O <i>e-Cig</i> é eficiente e, por isso, um bom agente de transparência, que induz todos os mecanismos, enquanto que a glucose não dissocia proteínas. No entanto, a solubilidade da glucose em água permite criar soluções e efeitos de transparência com diferentes amplitudes.
Óleo de amêndoas	<p>Demonstração de uma desidratação rápida do tecido.</p> <p>Apresenta 2 janelas, uma de transparência e outra de opacidade provocada pelo espectro de absorção do agente.</p>	Apesar da fraca eficiência ele cria alguma transparência e a dissociação de proteínas nas camadas exteriores do tecido.
Óleos de canela e cravo	<p>Desidratação lenta do tecido ao longo de todo o tratamento, possivelmente devido a propriedades higroscópicas.</p> <p>A eficiência apresentou valores negativos decrescentes após um impacto rápido nos tecidos.</p>	Não devem ser considerados como agentes de transparência.
Óleo de anis	<p>Crescimento acima dos 700 nm.</p> <p>Tecido torna-se opaco para comprimentos de onda inferiores a 800 nm, o que resulta numa eficiência negativa.</p>	Ligeiramente melhor que os outros óleos e promove a dissociação de proteínas nas camadas exteriores do tecido.

<p>Óleo de rícino</p>	<p>Promove uma boa desidratação do tecido, com elevada magnitude, que é seguida de uma hidratação inversa, devido à incapacidade do agente se difundir para o interior do tecido.</p> <p>Eficiência mostra claramente que a desidratação é revertida e que possivelmente, o tecido captura alguma água adicional do óleo durante a imersão.</p>	<p>Não pode ser considerado como um agente de transparência por si só.</p> <p>No entanto, mostra potencial para ser misturado com outros agentes, possibilitando uma eficiente desidratação do tecido e o aumento da permeabilidade do tecido à passagem de moléculas como da glicerina para obter boa adaptação de IRs.</p>
-----------------------	---	--

## Referências

- [1] A. R. Botelho, “Determinação das propriedades óticas de tecidos e caracterização de tratamentos de transparência em rim humano normal e patológico,” Master, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2021. doi: 10.13140/RG.2.2.18060.03206.
- [2] V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE), 2015. doi: 10.1117/3.1003040.
- [3] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, *The Optical Clearing Method*. Cham: Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-33055-2.
- [4] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Tissue optical immersion clearing,” *Expert Review of Medical Devices*, vol. 7, no. 6, pp. 825–842, Nov. 2010, doi: 10.1586/erd.10.50.
- [5] A. Yu. 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,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 197, pp. 216–229, May 2018, doi: 10.1016/j.saa.2018.01.085.
- [6] V. V. Tuchin, *Optical Clearing of Tissues and Blood*. SPIE, 2005. doi: 10.1117/3.637760.
- [7] T. Yu, D. Zhu, L. Oliveira, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Tissue optical clearing mechanisms,” in *Handbook of Tissue Optical Clearing*, Boca Raton: CRC Press, 2021, pp. 3–30. doi: 10.1201/9781003025252-2.
- [8] L. Oliveira, A. Lage, M. Pais Clemente, and V. V. Tuchin, “Rat muscle opacity decrease due to the osmosis of a simple mixture,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 5, p. 055004, 2010, doi: 10.1117/1.3486539.
- [9] V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, *Handbook of Tissue Optical Clearing*. Boca Raton: CRC Press, 2021. doi: 10.1201/9781003025252.
- [10] L. Oliveira, M. I. Carvalho, E. Nogueira, and V. V. Tuchin, “Optical clearing mechanisms characterization in muscle,” *Journal of Innovative Optical Health*

- Sciences*, vol. 09, no. 05, p. 1650035, Sep. 2016, doi: 10.1142/S1793545816500358.
- [11] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, A. Selifonov, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Enhanced Ultraviolet Spectroscopy by Optical Clearing for Biomedical Applications,” *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 27, no. 4, pp. 1–8, Jul. 2021, doi: 10.1109/JSTQE.2020.3012350.
- [12] A. A. Selifonov, E. I. Selifonova, and V. V. Tuchin, “E-cigarette smoking vape impact on optical properties of porcine gingival mucosa measured ex vivo in the range from 200 to 800 nm,” in *Optical Technologies for Biology and Medicine*, Apr. 2022, p. 48. doi: 10.1117/12.2632629.
- [13] L. M. C. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Typical Optical Clearing Agents,” in *The Optical Clearing Method: A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*, Springer, Cham (Switzerland), 2019, pp. 35-48.
- [14] J. Mobley, T. Vo-Dinh, and V. V. Tuchin, Optical Properties of Tissue, in *Biomedical Photonics Handbook*, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. I, Ed. Tuan Vo-Dihn, Chap. 2, pp. 23-121 (2019).
- [15] S. Carvalho, I. Carneiro, R. Henrique, V. Tuchin, and L. Oliveira, “Lipofuscin-Type Pigment as a Marker of Colorectal Cancer,” *Electronics (Basel)*, vol. 9, no. 11, p. 1805, Oct. 2020, doi: 10.3390/electronics9111805.
- [16] L. R. Oliveira *et al.*, “Invasive and minimally invasive optical detection of pigment accumulation in brain cortex,” *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, vol. 8, no. 1, p. 010304, Mar. 2022, doi: 10.18287/JBPE22.08.010304.
- [17] I. S. Martins, H. F. Silva, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, “Fast Estimation of the Spectral Optical Properties of Rabbit Pancreas and Pigment Content Analysis,” *Photonics*, vol. 9, no. 2, p. 122, Feb. 2022, doi: 10.3390/photonics9020122.
- [18] T. M. Gonçalves, I. S. Martins, H. F. Silva, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, “Spectral Optical Properties of Rabbit Brain Cortex between 200 and 1000 nm,” *Photochem*, vol. 1, no. 2, pp. 190–208, Aug. 2021, doi: 10.3390/photochem1020011.

- [19] L. Oliveira, I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, and V. V. Tuchin, “Optical properties of colorectal muscle in visible/NIR range,” in *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI*, May 2018, p. 122. doi: 10.1117/12.2306586.
- [20] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Measuring optical properties of human liver between 400 and 1000 nm,” *Quantum Electronics*, vol. 49, no. 1, pp. 13–19, Jan. 2019, doi: 10.1070/QEL16903.
- [21] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, M. D. Kozintseva, V. I. Kochubei, S. Yu. Gorodkov, and V. V. Tuchin, “Optical properties of peritoneal biological tissues in the spectral range of 350–2500 nm,” *Optics and Spectroscopy*, vol. 120, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2016, doi: 10.1134/S0030400X16010045.
- [22] 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,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 38, no. 15, pp. 2543–2555, Aug. 2005, doi: 10.1088/0022-3727/38/15/004.
- [23] 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 Electronics*, vol. 44, no. 8, pp. 779–784, Aug. 2014, doi: 10.1070/QE2014v044n08ABEH015613.
- [24] N. M. Gomes, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, “Refractive Index Matching Efficiency in Colorectal Mucosa Treated With Glycerol,” *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 27, no. 4, pp. 1–8, Jul. 2021, doi: 10.1109/JSTQE.2021.3050208.
- [25] 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*, Cham: Springer International Publishing, 2020, pp. 107–131. doi: 10.1007/978-3-030-44594-2\_2.
- [26] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, “Controlling the Optical Properties of Biological Materials,” in *The Optical Clearing Method*, Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 17–34. doi: 10.1007/978-3-030-33055-2.

- [27] J. Hirshburg, B. Choi, J. S. Nelson, and A. T. Yeh, "Collagen solubility correlates with skin optical clearing," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 11, no. 4, p. 040501, 2006, doi: 10.1117/1.2220527.
- [28] A. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, and B. J. Tromberg, "Reversible Dissociation of Collagen in Tissues," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 121, no. 6, pp. 1332–1335, Dec. 2003, doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12634.x.
- [29] L. M. Oliveira and V. V. Tuchin, "Optical clearing for cancer diagnostics and monitoring," in *Handbook of Tissue Optical Clearing*, Boca Raton: CRC Press, 2021, pp. 597–606. doi: 10.1201/9781003025252-37.
- [30] V. V. Tuchin, "Coherent Optical Techniques for the Analysis of Tissue Structure and Dynamics," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 4, no. 1, p. 106, 1999, doi: 10.1117/1.429926.
- [31] L. R. Oliveira, R. Ferreira, M. R. Pinheiro, H. F. Silva, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, "Broadband spectral verification of optical clearing reversibility in lung tissue," *Journal of Biophotonics*, e202200185, 2022, doi: 10.1002/jbio.202200185.
- [32] 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 Physics*, vol. 23, no. 7, p. 075606, Jul. 2013, doi: 10.1088/1054-660X/23/7/075606.
- [33] L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, and V. V. Tuchin, "Errata: Diffusion characteristics of ethylene glycol in skeletal muscle," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 20, no. 5, p. 059801, Feb. 2015, doi: 10.1117/1.JBO.20.5.059801.
- [34] P. Peixoto, L. Oliveira, M. I. Carvalho, E. Nogueira, and V. V. Tuchin, "Software development for estimation of optical clearing agent's diffusion coefficients in biological tissues," *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, pp. 255–269, 2015, doi: 10.18287/JBPE-2015-1-4-255.
- [35] 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,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 22, no. 12, p. 1, Dec. 2017, doi: 10.1117/1.JBO.22.12.125002.
- [36] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Water Content and Scatterers Dispersion Evaluation in Colorectal Tissues,” *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, vol. 3, no. 4, p. 040301, Dec. 2017, doi: 10.18287/JBPE17.03.040301.
- [37] 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,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 22, no. 9, p. 091506, Feb. 2017, doi: 10.1117/1.JBO.22.9.091506.
- [38] L. M. Oliveira *et al.*, “Tissue optical clearing as a diagnostic tool for tissue pathology differentiation,” in *2018 International Conference Laser Optics (ICLO)*, Jun. 2018, pp. 508–508. doi: 10.1109/LO.2018.8435385.
- [39] 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,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, no. 12, p. 1, Dec. 2018, doi: 10.1117/1.JBO.23.12.121620.
- [40] 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,” *Journal of Biophotonics*, vol. 12, no. 4, p. e201800333, Apr. 2019, doi: 10.1002/jbio.201800333.
- [41] L. Fernandes *et al.*, “Tissue Spectroscopy and Optical Clearing of Colorectal Mucosa in the Pursuit of New Cancer Diagnostic Approaches,” *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, vol. 7, no. 4, p. 040302, Sep. 2021, doi: 10.18287/JBPE21.07.040302.
- [42] E. N. Lazareva *et al.*, “Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range,” in *Handbook of Tissue Optical Clearing*, Boca Raton: CRC Press, 2021, pp. 141–166. doi: 10.1201/9781003025252-8.
- [43] “Refractive index database.” <https://refractiveindex.info/> (accessed May 18, 2022).

- [44] I. G. Society, “Refractive Index List of Common Household Liquids.” <https://www.gemsociety.org/article/refractive-index-list-of-common-household-liquids/> (accessed May 18, 2022).
- [45] M. Daimon and A. Masumura, “Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region,” *Applied Optics*, vol. 46, no. 18, p. 3811, Jun. 2007, doi: 10.1364/AO.46.003811.
- [46] V. Singh, B. Jaswal, V. Kumar, R. Prakash, and P. Rai, “Application of He-Ne laser to study the variation of refractive index of liquid solutions with the concentration,” *Integrated Science and Technology*, vol. 1, May 2013.
- [47] L. Oliveira, “The effect of optical clearing in the optical properties of skeletal muscle tissue,” PhD thesis, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2013.
- [48] L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, and V. V. Tuchin, “Skeletal muscle dispersion (400-1000 nm) and kinetics at optical clearing,” *Journal of Biophotonics*, vol. 11, no. 1, p. e201700094, Jan. 2018, doi: 10.1002/jbio.201700094.
- [49] Y. Zhou, J. Yao, and L. V. Wang, “Tutorial on photoacoustic tomography,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 21, no. 6, p. 061007, Apr. 2016, doi: 10.1117/1.JBO.21.6.061007.
- [50] R. D. Birkhoff, L. R. Painter, and J. M. Heller Jr., “Optical and dielectric functions of liquid glycerol from gas photoionization measurements,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 69, no. 9, pp. 4185–4188, Nov. 1978, doi: 10.1063/1.437098.
- [51] G. D. Fasman, “Ultraviolet spectra of derivatives of cysteine, cysteine, histidine, phenylalanine, tyrosine, and tryptophan,” in *Handbook of Biochemistry*, CRC Press, 2018. doi: 10.1201/9780429487378.
- [52] D. B. Wetlaufer, “Ultraviolet spectra Of Proteins and Amino Acids,” 1962, pp. 303–390. doi: 10.1016/S0065-3233(08)60056-X.
- [53] S. R. White, “Toxic alcohols,” in *Rosen’s Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice*, 7<sup>th</sup> ed., Elsevier, 2010, pp. 2001-2009.

- [54] C. Choe, J. Lademann, and M. E. Darvin, “Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum in vivo,” *Analyst*, vol. 141, no. 22, pp. 6329–6337, 2016, doi: 10.1039/C6AN01717G.
- [55] A. Y. Sdobnov, M. E. Darvin, J. Schleusener, J. Lademann, and V. V. Tuchin, “Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents—Quantitative analysis using confocal Raman microscopy,” *Journal of Biophotonics*, vol. 12, no. 5, May 2019, doi: 10.1002/jbio.201800283.