



# ESTUDO DAS PROPRIEDADES ÓTICAS ESPETRAIS DE TECIDOS DO CÓRTEX CEREBRAL DE COELHO

**TÂNIA MANUELA PINTO GONÇALVES**

Fevereiro de 2023

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ÓTICAS ESPETRAIS DE TECIDOS DO  
CÓRTEX CEREBRAL DE COELHO

**Tânia Manuela Pinto Gonçalves**

Licenciada em Engenharia 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

**Fevereiro 2023**



*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

(José de Alencar)



## **Agradecimentos**

O meu agradecimento, é para todos aqueles que permitiram que a conclusão desta etapa fosse possível.

Agradeço ao meu orientador, o caríssimo Professor Luís Oliveira, um excelente profissional, um bom amigo, obrigada pela sua prestação incansável, pelo seu tempo e disponibilidade, dedicação, orientação e força de trabalho, na ajuda do planeamento e objetividade de todo o trabalho elaborado e que sem ele não seria possível realizar e desenvolver toda a investigação.

Não posso esquecer igualmente a equipa que esteve comigo nos trabalhos laboratoriais, incluindo o Luís Fernandes que ao desenvolver o seu projeto sobre Machine learning, ajudou-me a enriquecer o meu trabalho assim como a colega Rosário Pinheiro, pela disponibilidade incansável, no percurso deste mestrado.

A todos os profissionais de saúde, que não me deixaram baixar os braços, o meu muito obrigada pela paciência e incentivo. Sem vocês não teria tido a força necessária para continuar.

Não posso deixar de agradecer aos meus pais, e marido, pelo caminho que trilharam comigo, foram sem dúvida os maiores vencedores desta batalha. Sem eles, jamais estaria neste momento a concluir este percurso.

Um bem-haja a todos que consciente ou inconscientemente, tornaram o meu sonho realidade.



## Resumo

O cérebro é o órgão mais complexo no corpo humano e aquele que nos permite aprender a um ritmo elevado. Dada a sua complexidade interna e a função importante que desempenha, o cérebro é talvez de todos os órgãos o menos explorado e menos estudado. No campo da ótica médica vários estudos foram já realizados com tecidos cerebrais, fornecendo cada um desses estudos informação fisiológica e de diagnóstico de elevada importância. No presente trabalho foram medidos espectros entre 200 e 1000 nm, com diferentes montagens para obter as propriedades óticas espectrais que caracterizam o córtex cerebral do coelho. Após determinado o conjunto fundamental das propriedades óticas que caracterizam o córtex cerebral, uma análise mais cuidada do coeficiente de absorção mostrou que a existência de melanina e de lipofuscina no córtex ocultava os reais conteúdos de ADN e de hemoglobina neste tecido. Construindo o contributo de absorção destes dois pigmentos verificou-se que o córtex continha quase o dobro de melanina em relação à lipofuscina, o que se veio a associar a processos degenerativos nos neurónios do córtex. Subtraindo o contributo de absorção destes pigmentos ao coeficiente de absorção, tornou possível a avaliação do real conteúdo de ADN e de hemoglobina no córtex, tendo-se obtido valores da mesma ordem de grandeza aos observados para outros tecidos biológicos. Numa tentativa de verificar se tais resultados podiam ser reproduzidos com medições feitas numa perspectiva não invasiva, foram aplicadas técnicas de *machine learning* a espectros medidos com uma montagem de reflectância difusa. Os resultados obtidos nestas estimações mostraram limitações relacionadas com o baixo número de espectros que foram medidos. No entanto, tais resultados mostraram-se próximos dos resultados obtidos por cálculo direto a partir de medições invasivas e com características fisiológicas e de diagnóstico semelhantes. O conteúdo de melanina superior no córtex permaneceu nos resultados estimados, tal como os conteúdos de ADN e de hemoglobina. Tais resultados mostram que apesar de se ter usado um baixo número de espectros para desenvolver os algoritmos de estimação do espectro do coeficiente de absorção, estes são capazes de detetar as características fisiológicas de interesse no tecido. O procedimento usado em todo o estudo, mas com um maior número de espectros para estimar o coeficiente de absorção de forma não invasiva, poderá ser usado noutros tecidos saudáveis e com patologias para desenvolver novas técnicas de diagnóstico.

**Palavras-chave:**

Córtex cerebral, índice de refração, coeficiente de absorção, coeficiente de espalhamento, coeficiente de espalhamento reduzido, anisotropia de espalhamento, profundidade de penetração da luz, espectros, melanina, lipofuscina, ADN, hemoglobina, *machine learning*, processos neuro degenerativos, derrame cerebral, Alzheimer, Parkinson.

## **Abstract**

The brain is the most complex organ in the human body and the one that allows us to learn at a high rate. Due to its internal complexity and the important function that it plays, the brain is perhaps the less explored and less studied among the organs of the body. Regarding Biophotonics, several studies have previously been made with brain tissues, providing physiological and diagnostic information of great importance. In the present study, spectra were measured between 200 and 1000 nm, using with different setups to obtain the spectral optical properties of the brain cortex of rabbit. Once the fundamental set of optical properties that characterizes the brain cortex was obtained, a careful analysis of the absorption coefficient showed that the presence of melanin and lipofuscin in the cortex was hiding the real contents of DNA and hemoglobin in this tissue. Constructing the absorption contribution of these two pigments, it was verified that the cortex had almost the double content of melanin in regard to the lipofuscin content, a result that was associated to neurodegenerative processes in the cortex. Subtracting the absorption contribution of these pigments from the absorption coefficient allowed the evaluation of the real DNA and hemoglobin contents in the cortex, showing values in the same order as the ones observed for other biological tissues. In an attempt to check if those results could be reproduced with measurements made with a noninvasive approach, machine learning techniques were applied to diffuse reflectance spectra. The results of those estimations showed some limitations that are directly related to the reduced number of measured spectra. Nevertheless, such estimated results showed to be close to the ones obtained through direct calculation from spectral measurements that were made in an invasive procedure. The estimated results were also able to show similar physiological and diagnostic characteristics as the ones obtained from direct calculations. The higher melanin content remained in the estimated results, as well as the DNA and hemoglobin contents. Such results show that even though a low number of spectra was used to develop the estimation algorithms to obtain the absorption coefficient, the estimated results also contain the interesting physiological characteristics for this tissue. The procedure used in the present study, but considering a higher number of spectra to perform the estimation of the absorption coefficient from noninvasive measurements can be used with other healthy and pathological tissues, so that new diagnostic techniques can be developed.

**Keywords:**

Brain cortex, refractive index, absorption coefficient, scattering coefficient, reduced scattering coefficient, scattering anisotropy, light penetration depth, spectra, melanin, lipofuscin, DNA, hemoglobin, *machine learning*, neurodegenerative processes, brain stroke, Alzheimer, Parkinson.

# Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VII
ÍNDICE.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XV
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO .....	3
1.2. MOTIVAÇÃO .....	7
1.3. OBJETIVOS.....	7
1.4. ESTRUTURA DO DOCUMENTO .....	8
2. ESTADO DA ARTE .....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. RECOLHA DE TECIDOS E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	21
3.2. MEDIÇÕES DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO .....	22
3.3. MEDIÇÕES ESPECTRAIS .....	26
3.4. CÁLCULOS E SIMULAÇÕES REALIZADAS.....	30
3.5. RECONSTRUÇÃO DO $\mu_A$ A PARTIR DAS DOS ESPECTROS DE $R_D$ .....	32
4. RESULTADOS.....	37
4.1. MEDIÇÕES DE IR E CÁLCULO DA DISPERSÃO DO CÓRTEX CEREBRAL .....	37
4.2. MEDIÇÕES ESPECTRAIS .....	41
4.3. CÁLCULO DAS PROPRIEDADES ÓTICAS ESPECTRAIS DO CÓRTEX CEREBRAL .....	43
4.4. RECONSTRUÇÃO DO ESPECTRO DO $\mu_A$ DO CÓRTEX CEREBRAL POR ML.....	50
4.5. ANÁLISE CONTEÚDO DE PIGMENTOS NO CÓRTEX CEREBRAL.....	57
5. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS .....	71



## Lista de Figuras

Figura 1. Montagem experimental baseada no método de reflexão interna total para medir o IR do córtex.	22
Figura 2. Dispersão do prisma de vidro N-SF11.	23
Figura 3. Montagens experimentais para aquisição dos espectros de $T_t$ (A), de $R_t$ (B) e de $T_c$ (C).	26
Figura 4. Montagem experimental para aquisição dos espectros de $R_d$ .	29
Figura 5. Curvas de reflectância obtidas nas medições de IR para 3 amostras de córtex cerebral, usando lasers com emissão a: 401,4 nm (a), 534,6 nm (b), 626,6 nm (c), 782,1 nm (d), 820,8 nm (e) e 850,7 nm (f).	38
Figura 6. Curvas representativas da 1ª derivada das curvas apresentadas na Figura 5 para as medições feitas com lasers com emissão a: 401,4 nm (a), 534,6 nm (b), 626,6 nm (c), 782,1 nm (d), 820,8 nm (e) e 850,7 nm (f).	39
Figura 7. Valores experimentais de IR do córtex cerebral e curva de dispersão calculada.	40
Figura 8. Espectros médios e DP espectral experimentais do córtex cerebral de coelho: $T_t(\lambda)$ (a), $R_t(\lambda)$ (b), $T_c(\lambda)$ (c) e $R_d(\lambda)$ (d).	42
Figura 9. Espectro médio do $\mu_a$ do córtex cerebral de coelho.	43
Figura 10. Curvas de dispersão do córtex cerebral de coelho.	45
Figura 11. Espectros médios do $\mu_s$ e do $\mu'_s$ do córtex cerebral de coelho.	46
Figura 12. Espectro médio da $g$ do córtex cerebral de coelho.	47
Figura 13. Espectro médio da $\delta$ do córtex cerebral de coelho.	48
Figura 14. Espectro médio experimental (EME) e espectro médio gerado (EMG) de $R_d$ (a) e de $\mu_a$ (b) do córtex cerebral de coelho.	51
Figura 15. DE calculada para os modelos: SLP (a), KNN (b) e RFR (c).	52
Figura 16. Comparação entre o EMEx e o EMEs do $\mu_a$ que resulta da estimação com o método LOO.	54
Figura 17. Comparação entre o EMEx e o EMEs do $\mu_a$ que resulta das estimacões com 10 espectros gerados artificialmente: 10–G/E (a), 10–E/G (b) e 10–AT (c).	55
Figura 18. Comparação entre o EMEx e o EMEs do $\mu_a$ que resulta das estimacões com 50 espectros gerados artificialmente: 50–G/E (a), 50–E/G (b) e 50–AT (c).	56
Figura 19. Comparação entre o EMEx e o EMEs do $\mu_a$ que resulta das estimacões com 100 espectros gerados artificialmente: 100–G/E (a), 100–E/G (b) e 100–AT (c).	56

Figura 20. Espectros de absorção do córtex cerebral de coelho, antes (azul) e depois (verde) de subtraída a absorção dos pigmentos (laranja). 59

Figura 21. Espectros de  $\mu_a$  para a combinação da melanina e da lipofuscina (rosa) e para o córtex cerebral de coelho, antes (azul) e depois (verde) de subtraída a absorção dos pigmentos. Resultados obtidos por: cálculos diretos (A), RFR-LOO (B), RFR com 10-AT (C), RFR com 50-AT (D) e RFR com 100-AT (E). 62

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de IR do córtex obtidos das medições com o método de reflexão interna total, valores médios e DP para cada $\lambda$ .....	39
Tabela 2. Combinações das absorções de melanina e de lipofuscina usadas nos vários métodos com o algoritmo RFR para obter o $\mu_a(\lambda)$ corrigido para o córtex cerebral. .....	63
Tabela 3. Razões de absorção para as bandas de absorção principais do ADN/ARN e da hemoglobina para os vários métodos usados na estimação do $\mu_a(\lambda)$ do córtex cerebral .....	64



## Lista de Abreviaturas

IR-Índice de refração

IV-Infravermelho

IVP-Infravermelho próximo

THz-Terahertz

$T_c$ -Transmitância Colimada

UV-Ultravioleta

ML-Machine learning

DP-Desvio Padrão

$g$ -Anisotropia

MCI-Monte carlo inverso

ADI-Adding- doubling inverso

$R_d$ -Refletância difusa

AVC-Acidente vascular cerebral



## Lista de Símbolos

$\mu_a$ -Coeficiente de absorção

$D$ -Coeficiente de difusão

$\mu_s$ -Coeficiente de espalhamento

$\mu_t$ -Coeficiente de atenuação

$\mu'_s$ -Coeficiente de espalhamento reduzido

$\lambda$ -Comprimento de onda

$\delta$ -Profundidade de penetração da luz

$n_{\text{tecido}}$ -Dispersão real do tecido

$\kappa_{\text{tissue}}$ -Dispersão imaginária do tecido

$T_t$ -Transmitância total

$R_t$ -Refletância total

$R_d$ -Refletância difusa

$T_c$ -Transmitância colimada

$d$ -Espessura

$A_b$ -Absorvância amostra

$n''$ -Parte imaginária índice de refração



## 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 Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI) e teve como objetivos estudar as propriedades óticas espectrais do córtex cerebral, desde o ultravioleta até ao infravermelho, assim como avaliar os conteúdos de pigmentos neste tecido e associar tais conteúdos ao desenvolvimento de patologias neuro-degenerativas.

As quatro secções presentes neste primeiro capítulo fazem uma contextualização do assunto a estudar, indicam as motivações e objetivos do trabalho realizado e descrevem a estrutura do presente documento.

## **1.1.Contextualização**

A ótica médica é uma área científica em plena expansão, com um número de publicações fortemente crescente nos últimos 30 anos [1]. O interesse no desenvolvimento de técnicas óticas para procedimentos de diagnóstico e de tratamento de doenças prende-se com a necessidade de substituir as tecnologias atualmente utilizadas, que consistem em processos invasivos ou que são maioritariamente baseados na utilização de radiação ionizante que produz efeitos indesejáveis e irreversíveis nas células. A utilização da luz em procedimentos de diagnóstico e de tratamento apresenta vantagens de grande relevo. Em primeiro lugar, a luz é um tipo particular de radiação eletromagnética para a qual não se conhecem efeitos prejudiciais nos tecidos e nas células do corpo humano, ou quando existem, são pouco significativos em comparação com os criados por outros tipos de radiação, como por exemplo os raios-X. Por outro lado, e considerando a tecnologia atual, a luz pode ser usada para procedimentos de diagnóstico não invasivos ou de tratamento minimamente invasivos. A criação de equipamentos compactos e de uso pessoal, como smartwatches, para monitorização de parâmetros vitais e de diagnóstico, é já uma realidade e que se encontra em forte crescimento.

Com o objetivo de se desenvolverem aplicações de diagnóstico e de tratamento de doenças com recurso às tecnologias óticas, torna-se necessário o estudo das propriedades óticas dos vários tecidos e fluídos que compõe o corpo humano[2]. O corpo humano tem uma grande variedade de tecidos duros e moles, assim como fluídos, sendo que grande parte desses materiais não foi ainda caracterizado em termos das suas propriedades óticas

espectrais. A determinação dos espectros dessas propriedades óticas numa banda espectral larga, não só estabelece a caracterização ótica única para cada tecido biológico, como permite desenvolver modelos de propagação da luz no seu interior para serem usados em procedimentos de diagnóstico ou de tratamento [3]. Como exemplo, dois tecidos iguais, mas em que um apresenta uma patologia, podem apresentar diferenças nas suas propriedades óticas espectrais. Tal facto de ocorrerem diferenças nas propriedades óticas de tecidos saudáveis e com patologias foi já verificada em alguns estudos recentes [4-6]. Dada a grande variedade de tecidos biológicos e dos seus correspondentes com patologias, torna-se fundamental realizar estudos para obter as propriedades óticas espectrais desses materiais biológicos, propriedades essas que constituem o bilhete de identidade de cada material. Apenas depois de obtidos os espectros dessas propriedades óticas para todos os tecidos biológicos se torna possível desenvolver procedimentos clínicos otimizados para diagnóstico e tratamento.

As propriedades óticas fundamentais que caracterizam cada material biológico são várias e todas elas variam com o comprimento de onda ( $\lambda$ ) e com as condições ambientais em que foram medidas, como a temperatura e a humidade [2].

Uma dessas propriedades é o índice de refração (IR), que quantifica a velocidade de propagação da luz dentro do material em estudo [7]. Trata-se de uma propriedade sem dimensões e tal como demonstrado em vários estudos já publicados [8-14], a chamada dispersão de um material, ou seja, a dependência entre o IR e o  $\lambda$ , apresenta um comportamento exponencialmente decrescente com o aumento de  $\lambda$ . A medição direta da dispersão não é possível, uma vez que a instrumentação atual apenas permite realizar medições diretas de IR a valores discretos de  $\lambda$ . Conforme descrito nos estudos publicados sobre este tipo de medição [15-18], há a possibilidade de calcular a dispersão através de equações que descrevem bem o decaimento exponencial de IR com o aumento de  $\lambda$ . Tais equações são várias, mas as mais habitualmente usadas para os tecidos biológicos, são as equações de Cauchy, de Conrady e de Cornu, que serão descritas em detalhe no Capítulo 2 [8, 9, 12-15]. Outra possibilidade de obter uma dispersão mais realista para um tecido, consiste na aplicação das transformações de Kramers-Kronig ao espectro do coeficiente de absorção ( $\mu_a$ ) [19, 20], uma outra propriedade ótica que será descrita de seguida. As transformações de Kramers-Kronig serão também detalhadas no Capítulo 2.

Tal como foi referido no parágrafo anterior,  $\mu_a$  é outra propriedade ótica que quantifica o número de fótons que são absorvidos dentro de um material por unidade de comprimento da direção de propagação de um feixe [2, 4]. Este coeficiente, que é

habitualmente representado em  $\text{cm}^{-1}$ , quando medido em função de  $\lambda$ , apresenta picos locais que correspondem às bandas de absorção dos materiais biológicos que compõe o tecido em estudo. Num espectro de  $\mu_a$  obtido entre 200 e 1000 nm para um tecido biológico, é de esperar observar pelo menos os picos de absorção das proteínas (230 nm) [21, 22], do ADN (260 nm) [23], dos lípidos (762, 830 e 930 nm) [23], da hemoglobina (410 a 415 nm, 540 nm e 570 nm) [23] e da água (980 nm) [23] Dependendo do conteúdo de cada um destes componentes num tecido, pode ocorrer sobreposição de bandas de absorção, o que dificulta a análise e a discriminação entre os conteúdos dos componentes presentes.

Tal como  $\mu_a$  quantifica o número de fótons absorvidos por unidade de comprimento dentro do material em estudo, o coeficiente de espalhamento ( $\mu_s$ ) quantifica o número de fótons que são espalhados por unidade de comprimento dentro do material [2, 4] Este coeficiente, que é também habitualmente representado em  $\text{cm}^{-1}$ , quando medido em função de  $\lambda$ , apresenta um comportamento exponencialmente decrescente com o crescimento de  $\lambda$  [24-34].

Para medir a direccionalidade do espalhamento, existe uma outra propriedade ótica característica, que se designa por fator de anisotropia ( $g$ ) [4, 24-27, 31-34] Esta propriedade não tem dimensões e para tecidos biológicos apresenta normalmente um comportamento exponencialmente crescente com o aumento do  $\lambda$  [4, 35]. De uma forma geral,  $g$  pode tomar valores entre -1 (espalhamento por reflexão total) e +1 (transmitância colimada total), mas no caso dos tecidos biológicos com alguma espessura, é de esperar que  $g$  assuma valores perto de 0 a 200 nm, que crescem para valores da ordem de 0.8 a 0.9 na zona espectral entre 650 e 1000 nm [4] Esta propriedade ótica, tal como  $\mu_a$  e  $\mu_s$  não pode ser medida diretamente. No entanto é facilmente calculada a partir de medições espectrais feitas de forma experimental [1, 4].

Todas as propriedades óticas que foram acima indicadas, constituem o conjunto de propriedades óticas fundamentais que caracterizam um material biológico. No entanto há outras que podem ser calculadas a partir destas, que por vezes são muito úteis. É disso exemplo o coeficiente de espalhamento reduzido ( $\mu'_s$ ), que consiste numa medida combinada do espalhamento e da direccionalidade desse espalhamento, tal como descrito pela Eq. (1) [4, 36]:

$$\mu'_s = \mu_s \times (1 - g). \quad (1)$$

Como  $\mu'_s$  é calculado á custa de  $\mu_s$  e de  $g$ , vai apresentar uma dependência no  $\lambda$ . O que se verifica através dos estudos experimentais já realizados com diferentes tecidos biológicos é que  $\mu'_s(\lambda)$  diminui de forma exponencial com o crescimento de  $\lambda$  [24-27, 31-34, 36].

Outra propriedade muito útil para aplicações de ótica médica é a profundidade de penetração da luz ( $\delta$ ), que mede a profundidade dentro de um tecido a que a intensidade de um feixe ótico se reduz para ~37% (=1/e) do seu valor à entrada [37]. Tal como descrito na literatura [38],  $\delta$  é calculado à custa de  $\mu_a$  e de  $\mu'_s$ . Em zonas do espectro em que a absorção é significativamente inferior ao espalhamento ( $\mu_a \ll \mu'_s$ ),  $\delta$  é calculado como [38]:

$$\delta = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}}, \quad (2)$$

enquanto que nas zonas do espectro em que a absorção é forte e comparável ao espalhamento ( $10\mu_a \geq 3\mu'_s$ ),  $\delta$  é calculado como [38]:

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

Como  $\delta$  depende tanto de  $\mu_a$  como de  $\mu'_s$ , verifica-se que a sua dependência no  $\lambda$  também varia. Vários estudos demonstraram que, para além de apresentar as bandas de absorção características do tecido,  $\delta$  apresenta valores baixos na zona do ultravioleta (UV) e cresce desde o visível até ao infravermelho próximo (IVP).

Com o objetivo de caracterizar os tecidos biológicos para permitir otimizar procedimentos de diagnóstico e de tratamento de patologias, vários estudos das propriedades óticas foram já realizados. Os primeiros desses estudos focaram-se em obter as propriedades óticas de certos tecidos para valores específicos e discretos de  $\lambda$  ou para bandas de  $\lambda$  reduzidas que correspondem à luz usada em certos procedimentos de diagnóstico ou de tratamento. Uma compilação de resultados obtidos nesses estudos iniciais encontra-se compilada em várias tabelas da Ref. [2]. Na atualidade, e sabendo-se que luz de qualquer  $\lambda$  entre o UV e o terahertz (THz) pode ter uma aplicação potencial em medicina, o estudo das propriedades óticas de tecidos biológicos passou a ser realizado para as obter numa banda espectral alargada [4, 39]. Esta linha de investigação é recente, mas já mostrou que a obtenção das propriedades óticas espectrais de tecidos

biológicos tem grande potencial, mesmo para detetar marcadores patológicos em certos casos [5].

Embora já tenha sido feito um número significativo de estudos para caracterizar alguns tecidos biológicos através das suas propriedades óticas espetrais numa banda de  $\lambda$  larga, existem muitos outros tecidos para os quais tal estudo ainda não foi feito. Tais estudos são necessários no sentido de se agilizar o desenvolvimento de procedimentos óticos de diagnóstico e de tratamento para esses tecidos.

## **1.2.Motivação**

Em face do que foi exposto na seção 1.1, existe atualmente a necessidade de se caracterizar uma grande variedade de tecidos biológicos à custa da obtenção das suas propriedades óticas espetrais. No caso particular dos tecidos cerebrais, tal estudo ainda não foi feito, pelo menos na banda espectral entre 200 e 1000 nm, pelo que a determinação das propriedades óticas desses tecidos numa banda espectral larga é de grande interesse. Como complemento, existem já alguns trabalhos publicados sobre a aplicação das tecnologias óticas para a deteção de patologias que se desenvolvem no cérebro [40-43], ou para monitorizar a microcirculação sanguínea no cérebro, como forma de prevenção de ocorrência de acidente vascular cerebral (AVC) [44].

Considerando este interesse atual sobre a aplicação das tecnologias óticas em tecidos cerebrais, torna-se necessário o estudo das propriedades óticas espetrais desses tecidos.

## **1.3.Objetivos**

Considerando que o estudo das propriedades óticas de qualquer tecido biológico é baseado em medições recolhidas de amostras de tecido na sua forma *ex vivo*, torna-se difícil realizar tal estudo com tecidos cerebrais humanos. Uma vez que não existe disponibilidade de utilizar tecidos cerebrais humanos num estudo deste tipo, torna-se necessário considerar alternativas. O estudo dessas propriedades pode ser facilitado se em vez de tecidos cerebrais humanos se considerarem tecidos cerebrais provenientes de animais, nomeadamente de animais de consumo.

Desta forma, a escolha de tecidos cerebrais de coelho apresenta-se como uma solução viável, uma vez que estes tecidos são obtidos com facilidade e a semelhança que apresentam com os tecidos cerebrais humanos é grande.

Assim, os objetivos do presente trabalho consistiram no estudo das propriedades óticas espectrais do córtex cerebral de coelho e identificar potenciais marcadores de doenças neuro-degenerativas.

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

O presente documento encontra-se dividido em cinco capítulos. O primeiro foi usado para fazer uma contextualização sobre o assunto a estudar, apresentar a motivação e indicar os objetivos do presente trabalho de investigação. O segundo capítulo apresenta o atual estado da arte relativo à caracterização de tecidos biológicos através das suas propriedades óticas. Os materiais e métodos usados na investigação experimental, assim como os cálculos realizados para obter as propriedades óticas espectrais do córtex cerebral de coelho e destas obter marcadores de doenças neuro-degenerativas encontram-se descritos no capítulo 3. Os resultados obtidos no presente estudo, assim como a sua discussão, são apresentados no capítulo 4. O capítulo 5 apresenta as conclusões do presente trabalho, juntamente com as perspectivas para futuros trabalhos complementares de investigação.

## CAPÍTULO 2 – ESTADO DA ARTE



## 2. Estado da arte

### 2.1. Propriedades óticas de tecidos biológicos

Tal como foi referido no capítulo 1, as propriedades óticas dos tecidos biológicos são características próprias que estes apresentam, que quando determinadas constituem o seu bilhete de identidade ótico e que condicionam a forma como um feixe de luz se propaga no interior desses tecidos. Foi também referido que não é possível medir diretamente de forma experimental tais propriedades e que estas dependem das condições em que as medições que as permitem determinar foram realizadas, assim como variam com o  $\lambda$ .

As propriedades óticas dos tecidos biológicos são características macroscópicas, mas dependem das particularidades microscópicas internas desses tecidos. Todos os materiais biológicos, sejam tecidos duros ou moles, assim como fluídos como o sangue, apresentam uma composição heterogénea, contendo uma combinação de vários materiais elementares. Esta constituição heterogénea que os materiais biológicos apresentam não pode ser desconsiderada quando se faz propagar um feixe de luz no seu interior, uma vez que os fotões interagem pontualmente com os elementos constituintes do material. Dado que microscopicamente, cada um dos componentes biológicos de um tecido ou fluído tem a capacidade de absorver ou espalhar fotões para novas direções de propagação, um feixe de luz que se propaga no interior sofre atenuação [1]. Tal atenuação ocorre, portanto, devido aos fenómenos locais de absorção e de espalhamento. No que diz respeito ao fenómeno de absorção, os fotões podem ser absorvidos na ocorrência de transições quânticas de átomos ou moléculas dos componentes dos tecidos [1], ou em alternativa por um efeito dissipativo de energia durante a refração dentro do meio, uma vez que existe uma relação entre  $\mu_a$  e a parte imaginária do IR ( $n''$ ) [36]:

$$\mu_a = \frac{4\pi n''}{\lambda}. \quad (4)$$

O espalhamento que ocorre dentro dos materiais biológicos consiste numa combinação de dois regimes, designados por regime de espalhamento de Rayleigh e regime de espalhamento de Mie [45]. O regime de espalhamento de Rayleigh é um tipo de espalhamento da luz que ocorre quando a dimensão das partículas que originam esse espalhamento, ou as flutuações de densidade de massa dentro do meio, são muito menores

do que o  $\lambda$  da luz usada. Por outro lado, o regime de espalhamento de Mie refere-se ao espalhamento criado por partículas de dimensão comparável ou superior ao  $\lambda$  da luz usada [36]. O espalhamento da luz dentro de tecidos biológicos é geralmente muito elevado, particularmente na zona dos baixos  $\lambda$ s, conforme foi já verificado por vários estudos realizados e descrito na literatura [36]. Tal espalhamento elevado é criado não só por colisões localizadas microscopicamente entre os fotões e as partículas do tecido, mas também por refração entre meios de pequeno volume dentro do tecido. Dada a constituição heterogénea dos tecidos biológicos e como cada um dos seus componentes apresenta um índice de refração particular, a refração microscópica entre componentes leva ao espalhamento dos fotões para novas direções. Como exemplo descritivo desta situação, suponhamos que, por simplicidade, um tecido genérico é constituído por uma distribuição de lípidos num material de base, que é o líquido intersticial. Sabendo que o líquido intersticial consiste numa solução muito pouco concentrada (cerca de 5% de volume) de sais, proteínas e minerais em água, o seu IR à temperatura de 25 °C e a 589 nanómetros (nm) toma o valor típico de 1.370 [1], enquanto os lípidos (provenientes do abdómen humano) apresentam ao mesmo  $\lambda$  e para a mesma temperatura um IR de 1.467 [9]. Um feixe que se propaga do líquido intersticial para os lípidos sofre refração (espalhamento) na interface entre estes dois meios de acordo com a lei de Snell-Descartes [46]:

$$n_i \sin \theta_i = n_t \sin \theta_t, \quad (5)$$

sendo que  $n_i$  é o IR do meio de incidência (líquido intersticial),  $\theta_i$  e  $\theta_t$  os ângulos de incidência e de transmissão que os feixes fazem com a normal à interface entre os meios e  $n_t$  o IR do meio para onde é transmitido o feixe (lípidos). Este tipo de refrações pontuais, que ocorrem em grande número dentro de um tecido biológico, contribui para o forte e múltiplo espalhamento que é característico dos tecidos biológicos.

Embora não se conheça uma equação que descreva a dependência no  $\lambda$  para o  $\mu_a$ , existem equações para a dependência no  $\lambda$  para as outras propriedades óticas fundamentais dos tecidos biológicos. No caso do  $\mu_s$  (e também do  $\mu'_s$ ), tal dependência no  $\lambda$  é descrita por Steven Jacques na Ref. [36], de seguinte forma:

$$\mu'_s(\lambda) \equiv (1 - g(\lambda)) \times \mu_s(\lambda) = a \times \left( f_{Ray} \times \left( \frac{\lambda}{500 \text{ nm}} \right)^{-4} + (1 - f_{Ray}) \times \left( \frac{\lambda}{500 \text{ nm}} \right)^{-b_{Mie}} \right), \quad (6)$$

em que  $g(\lambda)$  representa o espectro da anisotropia do tecido,  $a = \mu'_s(\lambda=500 \text{ nm})$ ,  $f_{\text{Ray}}$  é a fração de espalhamento de Rayleigh e  $b_{\text{Mie}}$  é um fator exponencial relacionado com o tamanho médio dos elementos no tecido que criam o espalhamento de Mie [47]. A Eq. (6) mostra que tanto  $\mu_s$  como  $\mu'_s$  apresentam um comportamento exponencial decrescente com o crescimento de  $\lambda$ . Esta equação mostra também que  $g$  apresenta um comportamento exponencial crescente com o aumento do comprimento de onda. Estas dependências no  $\lambda$  foram descritas teoricamente na Ref. [36] e foram já observadas experimentalmente em vários estudos, como por exemplo os que são apresentados na Ref. [35] e na Ref. [48].

Considerando o conjunto de propriedades óticas fundamentais de qualquer tecido biológico, para além do  $\mu_a$ , do  $\mu_s$  e do  $g$ , anteriormente descritos, existe ainda o IR. Ao contrário das restantes propriedades óticas que já foram descritas, o IR pode ser medido diretamente de tecidos biológicos, usando várias montagens experimentais ou instrumentos comerciais. A única limitação destas medições é que são executadas a comprimentos de onda individuais [4], originando valores de IR discretos. Para passar desses valores discretos de IR para a dispersão de um determinado tecido ( $n_{\text{tecido}}(\lambda)$ ), é habitualmente usado o procedimento de ajustar os valores discretos de IR experimentalmente obtidos com curvas de dispersão já conhecidas [49]. Entre essas curvas, as mais comuns e que na maioria dos casos proporcionam o melhor ajuste dos valores experimentais para tecidos biológicos são as curvas de Cauchy (Eq. (7)), de Conrady (Eq. (8)) e de Cornu (Eq. (9)) [7]:

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4}, \quad (7)$$

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda} + \frac{C}{\lambda^{3.5}}, \quad (8)$$

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = A + \frac{B}{(\lambda - C)}, \quad (9)$$

em que A, B e C são os parâmetros de Cauchy, de Conrady ou de Cornu, que são estimados durante o ajuste dos valores experimentais de IR com cada uma das curvas [49, 50]. A obtenção da  $n_{\text{tecido}}(\lambda)$  para um determinado tecido pelo ajuste de uma curva descrita por qualquer uma das três equações anteriores consiste numa estimativa rudimentar da dispersão. Isto porque, como a curva é suave e os pontos experimentais que são usados

no ajuste estão em geral localizados a  $\lambda$ s bem separados, perdem-se detalhes entre esses pontos que podem ser importantes.

Uma forma de ultrapassar esta perda de informação espectral detalhada na dispersão de um tecido biológico consiste na utilização das relações de Kramers-Kronig (K-K) [19, 20], que permite calcular a dispersão a partir do espectro do  $\mu_a$  ( $\mu_a(\lambda)$ ), se este estiver disponível. Se  $\mu_a(\lambda)$  for conhecido para uma banda espectral específica, tal cálculo é feito usando esse espectro na Eq. (10), que é a primeira relação de K-K, para determinar a parte imaginária da dispersão do tecido ( $\kappa_{\text{tecido}}(\lambda)$ ) [19, 20]:

$$\kappa_{\text{tecido}}(\lambda) = \frac{\lambda}{4\pi} \mu_a(\lambda). \quad (10)$$

A parte real da dispersão do tecido ( $n_{\text{tecido}}(\lambda)$ ) é posteriormente calculada a partir de  $\kappa_{\text{tecido}}(\lambda)$ , usando a seguinte relação de K-K [19, 20]:

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = 1 + \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\lambda_1}{\Lambda} \times \frac{\lambda_1}{\Lambda^2 - \lambda_1^2} \kappa_{\text{tecido}}(\Lambda) d\Lambda, \quad (11)$$

onde  $\Lambda$  representa a variável de integração dentro do intervalo espectral de interesse e  $\lambda_1$  é um comprimento de onda fixo que pode ser alterado para se obter um melhor ajuste vertical entre a dispersão calculada pela Eq. (11) e a dispersão calculada por qualquer uma das equações (7), (8) ou (9). Este tipo de procedimento para obter  $n_{\text{tecido}}(\lambda)$  permite obter dispersões mais realistas para tecidos biológicos, tal como foi já demonstrado para tecidos do pâncreas [49] e do rim [5], e como será mostrado para o córtex cerebral no capítulo 3.

Após ter sido feita a descrição das propriedades óticas fundamentais dos tecidos biológicos, há outras propriedades que podem ser calculadas a partir destas e que em determinados casos tem interesse a sua determinação. Dentro dessas propriedades que podem ser calculadas, uma das mais importantes é a profundidade de penetração da luz, cujo cálculo já foi descrito pela Eq. (2) e pela Eq. (3) para zonas distintas do espectro em que a absorção é forte e fraca. Outra também importante é o coeficiente de atenuação ( $\mu_t$ ), que consiste na soma do  $\mu_a$  com o  $\mu_s$  [2]:

$$\mu_t(\lambda) = \mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda). \quad (12)$$

Uma vez que com a exceção do IR, todas as restantes propriedades óticas não podem ser medidas diretamente dos tecidos em estudo, as técnicas para obtenção dessas propriedades e as medições que são usadas para as obter serão descritas na próxima secção.

## **2.2. Técnicas para a obtenção das propriedades óticas de tecidos biológicos**

O interesse na determinação das propriedades óticas de tecidos biológicos surgiu na segunda metade do séc. XX com o desenvolvimento de novas técnicas óticas com potencial aplicação em procedimentos de diagnóstico e de tratamento de patologias. Uma vez que na generalidade tais propriedades não são possíveis de se medir diretamente dos tecidos, tornou-se necessário desenvolver procedimentos de cálculo e de simulação para obter essas propriedades a partir de medições que se possam realizar.

Para descrever tais medições e procedimentos de cálculo consideramos uma amostra de tecido que foi preparada em forma de fatia fina, com uma espessura ( $d$ ) bem definida. Com recurso a montagens experimentais que usam uma esfera integradora é possível medir-se a transmitância total ( $T_t$ ) e a reflectância total ( $R_t$ ) da amostra de tecido, quando irradiada por uma fonte de luz. Dado que quando a luz interage com a amostra ocorrem apenas os fenómenos de transmissão, de reflexão e de absorção da luz, a percentagem de luz absorvida, que se designa por absorvância da amostra ( $A_b$ ) pode ser calculada a partir das medições de  $T_t$  e de  $R_t$ , da seguinte forma [51]:

$$A_b = 1 - (T_t + R_t). \quad (13)$$

Uma vez que  $A_b$  depende da espessura e do  $\mu_a$  da amostra, este coeficiente pode ser calculado da seguinte forma [4, 5, 48, 50, 52]:

$$\mu_a = \frac{A_b}{d}. \quad (14)$$

Depois de calculado o  $\mu_a$  do tecido, o cálculo do  $\mu_s$  pode ser feito usando a lei de Bouguer-Beer-Lambert, se a transmitância colimada ( $T_c$ ) também tiver sido medida da amostra [28, 53-55]:

$$\mu_s = -\frac{\ln(T_c)}{d} - \mu_a. \quad (15)$$

Não existe uma equação direta para calcular o  $\mu'_s$  da amostra a partir das medições experimentais, mas este pode ser estimado por simulação se para o  $\lambda$  do laser usado nas medições se conhecer também o IR.

De facto, no início da década de 1990 foram desenvolvidos códigos de simulação para estimar as propriedades óticas de tecidos biológicos que se baseiam na resolução da equação de transporte da radiação. De todos os códigos que foram desenvolvidos, os mais eficientes são os que tomam as designações de “Monte Carlo inverso” (MCI) e o de “Adding-Doubling inverso” (ADI) [55-59]. Estes algoritmos estimam habitualmente duas ou três propriedades óticas para um  $\lambda$  individual, dependendo da quantidade de medições óticas que foram feitas da amostra em estudo. Embora estes códigos funcionem com algoritmos distintos, o processo de estimação das propriedades óticas consiste em gerar grandezas mensuráveis como a  $T_t$ , a  $R_t$  e a  $T_c$ , a partir de um conjunto de propriedades óticas pré-definido, e posteriormente comparar tais grandezas com as que foram realmente medidas da amostra. Se a diferença entre as grandezas geradas e as medidas for muito elevada, corrigem-se as propriedades óticas pré-definidas e o código de simulação volta a ser executado até que as grandezas óticas geradas se aproximem o necessário das grandezas medidas [60]. Este procedimento de estimação das propriedades óticas de tecidos biológicos apresenta a limitação de que as propriedades estimadas se referem a um  $\lambda$  específico, pelo que para se obter os espectros das propriedades numa zona espectral considerável, torna-se necessário realizar tais simulações a vários comprimentos de onda e depois interpolar os valores das propriedades entre os valores estimados. Trata-se de uma tarefa que demora muito tempo a realizar e que requer elevados recursos computacionais. Apesar de fastidioso e com necessidades computacionais elevadas, o processo de simulação com os códigos de MCI e de ADI era até há poucos anos o único método fiável para estimar o conjunto completo das propriedades óticas de tecidos biológicos. Assim, estudos para estimar os espectros das propriedades óticas de tecidos como o peritónio [24], o músculo colorectal [25], a pele e tecidos subcutâneos [26], ou a mucosa colorectal saudável e com cancro [27] foram feitos, tendo-se feito interpolação dos valores estimados por simulação a diferentes  $\lambda$ s.

Uma vez que na atualidade as tecnologias óticas em saúde utilizam luz de espectro alargado, ou com  $\lambda$ s individuais localizados dentro de zonas espectrais largas entre o UV

e o THz [39], torna-se necessário determinar os espectros das propriedades óticas dos tecidos de forma rápida. A secção 2.3 apresenta e descreve um procedimento, recentemente desenvolvido, que permite calcular os espectros das propriedades óticas de tecidos biológicos de forma rápida, desde que medições espectrais dos tecidos em estudo estejam disponíveis.

### **2.3. Propriedades óticas espectrais de tecidos biológicos**

Dado que, pela teoria da difusão de fotões [50, 52, 61], as equações para cálculo de quase todas as propriedades óticas de um tecido estão disponíveis e podem ser aplicadas a espectros medidos experimentalmente, uma alternativa para determinar de forma rápida os espectros das propriedades óticas dos tecidos, foi implementada recentemente [4, 5, 48, 50, 52]. Tal procedimento consiste em realizar medições espectrais de  $T_t$ , de  $R_t$  e de  $T_c$  de amostras com espessura  $d$ , na zona espectral de interesse, que serão usadas em cálculos, quase todos diretos, para obter os espectros das propriedades óticas. Tais cálculos consistem na seguinte sequência de passos:

- a) Cálculo de  $\mu_a(\lambda)$  a partir de  $T_t(\lambda)$  e de  $R_t(\lambda)$  com a Eq. (13) e a Eq. (14),
- b) Cálculo de  $n_{\text{tecido}}(\lambda)$  a partir de  $\mu_a(\lambda)$  por aplicação sequencial das relações de K-K descritas pela Eq. (10) e pela Eq. (11),
- c) Cálculo de  $\mu_s(\lambda)$  a partir de  $T_c(\lambda)$  e de  $\mu_a(\lambda)$  com a Eq. (15),
- d) Simulação com código ADI a diferentes  $\lambda$ s para estimar valores discretos de  $\mu'_s$  dentro da zona espectral de interesse,
- e) Cálculo de  $\mu'_s(\lambda)$ , por ajuste de uma curva descrita pela Eq. (6) aos pontos estimados com o código ADI,
- f) Cálculo de  $g(\lambda)$  a partir de  $\mu_s(\lambda)$  e de  $\mu'_s(\lambda)$  também pela Eq. (6),
- g) Cálculo de  $\delta(\lambda)$  a partir de  $\mu_a(\lambda)$  e de  $\mu'_s(\lambda)$  pela Eq. (2), ou pela Eq. (3), consoante a zona do espectro tenha absorção forte ou fraca.

Este procedimento foi já usado em alguns estudos e permitiu obter os espectros com a forma prevista teoricamente [36]. Num desses estudos, a análise do espectro de  $\mu_a$  do pâncreas de coelho mostrou que este tipo de tecido acumula melanina e lipofuscina em proporções idênticas como resultado do envelhecimento do pâncreas [50]. Num outro estudo realizado com tecidos saudáveis e com cancro do rim humano, verificou-se que o conteúdo de melanina diminui e o de lipofuscina aumenta quando se passa do tecido

saudável para o tecido com patologia [5]. Em face dos resultados obtidos nesse estudo para a variação de conteúdos destes pigmentos e comparando com estudos análogos, os autores da Ref.[5] concluíram que durante o desenvolvimento do cancro do rim ocorre a formação de grânulos de melanolipofucina, que pode ser um marcador da evolução do cancro no rim.

Embora ainda numa fase de desenvolvimento que pode apenas ser usado com tecidos *ex vivo*, este método de estimação das propriedades óticas espectrais, parece mostrar um elevado potencial para o diagnóstico de patologias. A sua aplicação em exames de rastreio poderá permitir a deteção de diferentes tipos de cancro em estádios de desenvolvimento precoces e ajudar os clínicos a aplicar medidas de irradicação de tumores, antes de estes se espalharem ou metastizarem.

A aplicação do método de deteção dos conteúdos de melanina e de lipofucina em tecidos recolhidos por biópsia para identificação do estágio de desenvolvimento do cancro é apelativa. No entanto, seria de maior interesse poder aplicar este método *in vivo* sem se ter de recolher os tecidos do doente. Tal aplicação poderá ser possível dentro em breve, uma vez que se podem realizar medições de espectros de reflectância difusa ( $R_d$ ) de forma não invasiva ou minimamente invasiva. Embora não exista uma relação direta que permita o cálculo do  $\mu_a(\lambda)$  a partir desses espectros, a utilização de técnicas de *machine learning* (ML) pode dar uma grande ajuda, como demonstrado recentemente para o caso do cancro colorectal [47]. Neste estudo, foi desenvolvido um código de ML que permitiu a reconstrução dos espectros do  $\mu_a$  para tecidos da mucosa colorectal, nas versões saudável e com cancro. Tais espectros foram reconstruídos a partir de espectros de  $R_d$  medidos de amostras dos mesmos tipos de tecido. Um estudo semelhante foi feito também para os tecidos do córtex de coelho [61], sendo que os resultados obtidos serão apresentados no Cap. 4.

Considerando o que foi exposto nas diferentes secções do presente capítulo, verifica-se que há ainda muito trabalho a realizar no que diz respeito à determinação das propriedades óticas espectrais de variados tecidos biológicos. Um desses tecidos, para os quais ainda não se conhecem tais propriedades e que tem um particular interesse devido às patologias a que está associado é o córtex cerebral. Assim, com os objetivos de determinar tais propriedades para o córtex cerebral, analisar os conteúdos de pigmentos e verificar se é possível reproduzir tais conteúdos com uma aproximação não invasiva, escolheu-se o córtex cerebral de coelho para realizar o presente trabalho de investigação.

O próximo capítulo descreve os materiais e métodos usados nesta investigação, sendo os resultados obtidos apresentados no capítulo 4.

## CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

### **3. Materiais e métodos**

Uma vez que o presente trabalho foi muito diversificado, consistindo em diferentes tipos de medições que foram realizadas a partir de tecidos biológicos, cálculos, simulações e análise de espectros para recolha de informação de carácter fisiológico, torna-se conveniente descrever a sequência dos vários trabalhos realizados em detalhe. Desta forma, o presente capítulo encontra-se dividido em várias secções que, da forma que estão organizadas, pretende descrever todos os trabalhos realizados de forma sequencial.

Assim, a secção 3.1 começa por descrever o processo de recolha e preparação das amostras de tecido usadas no presente trabalho. Na secção 3.2 encontra-se descrito o procedimento usado para as medições do IR dos tecidos do córtex a diferentes  $\lambda$ s, sendo o procedimento de medição dos espectros de  $T_t$ , de  $R_t$ , de  $R_d$  e de  $T_c$  descrito na secção 3.3. Os cálculos e simulações realizados para obter os espectros das propriedades óticas do córtex cerebral encontram-se descritos na secção 3.4 e na secção 3.5 é descrito o processo de reconstrução do espectro de  $\mu_a$  a partir dos espectros de  $R_d$  medidos.

#### **3.1. Recolha de tecidos e preparação de amostras**

Foram adquiridos 5 coelhos, já sacrificados, de um supermercado local. A cabeça de cada um destes animais foi separada do corpo, sendo o crânio aberto para retirar o cérebro. Os 5 cérebros foram congelados a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para posterior recolha do córtex e preparação das amostras a utilizar nos estudos, consoante as necessidades.

Dado que foi necessário realizar medições experimentais de IR e de espectros dos tecidos do córtex para este trabalho, várias amostras foram preparadas em diferentes dias para a realização de cada um destes estudos. Para realizar das medições de IR foram preparadas 3 amostras com forma aproximadamente quadrada ( $\sim 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ ) e espessura de aproximadamente 3 mm. A espessura destas amostras foi verificada colocando cada uma das amostras entre duas lamelas de microscópio e medindo a espessura global com um micrómetro de precisão (modelo Digimatic Micrometer – MDC Lite da Mitutoyo<sup>TM</sup>). De forma a garantir que uma das faces de cada amostra fosse perfeitamente plana e também que a espessura seria da ordem dos 3 mm, usou-se um crióstato (modelo CM1860 UV da Leica<sup>TM</sup>, Wetzlar, Alemanha,) para as preparar para as medições. As três amostras foram usadas em todas as medições de IR, com diferentes lasers, conforme descrito na secção 3.2.

Para a realização das medições espectrais, foram usadas 20 amostras de tecido do córtex no total. Numa fase inicial, em que havia apenas o interesse de se medir os espectros de  $T_t$ , de  $R_t$  e de  $T_c$ , foram preparadas apenas 10 amostras. Estas amostras foram preparadas como descrito para as amostras usadas nas medições do IR, mas com forma aproximadamente circular ( $\phi \sim 1$  cm), sendo sujeitas inicialmente às medições dos espectros de  $R_t$ . Depois de medidos estes espectros, as amostras foram novamente desbastadas no crióstato para reduzir a sua espessura para 0.5 mm, que é a espessura adequada às medições dos espectros de  $T_t$  e de  $T_c$  [4], que foram medidos posteriormente.

Mais tarde, quando surgiu o interesse em reconstruir o espectro de  $\mu_a$  com recurso às técnicas de ML, foram preparadas 10 amostras adicionais para medir os espectros de  $R_d$ . Mais uma vez, estas amostras foram preparadas tal como as que foram usadas nas medições dos espectros de  $R_t$ .

### 3.2. Medições do índice de refração

As medições do IR do córtex cerebral foram realizadas a diferentes  $\lambda$ s, utilizando o método da reflexão interna total [16, 18, 49, 62]. A montagem experimental utilizada para realizar essas medições encontra-se representada na Figura 1.

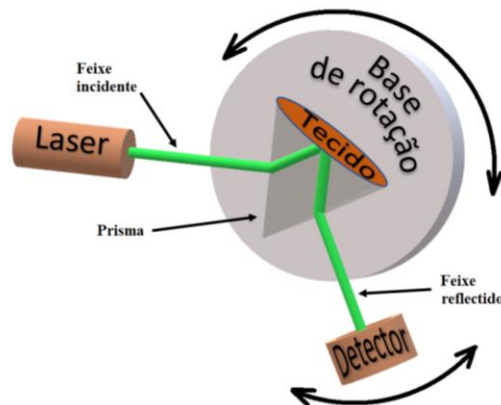


Figura 1. Montagem experimental baseada no método de reflexão interna total para medir o IR do córtex.

De acordo com a Figura 1, a amostra de tecido é colocada na base de um prisma equilátero, sendo o material do prisma feito de vidro N-SF11 da SCHOTT™ (Mainz, Alemanha), que apresenta a dispersão representada na Figura 2.

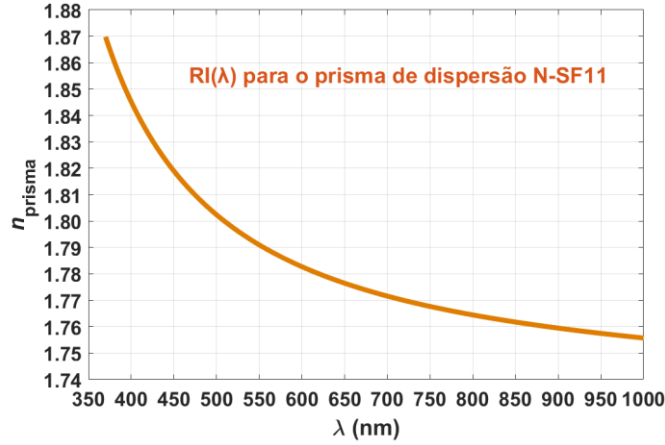


Figura 2. Dispersão do prisma de vidro N-SF11.

A curva de dispersão representada na Figura 2 é descrita pela equação de Sellmeier [63], a 20 °C:

$$n_{prisma}^2 - 1 = \frac{K_1 \lambda^2}{\lambda^2 - L_1} + \frac{K_2 \lambda^2}{\lambda^2 - L_2} + \frac{K_3 \lambda^2}{\lambda^2 - L_3}, \quad (16)$$

onde os coeficientes de Sellmeier apresentam os seguintes valores para o vidro N-SF11:  $K_1=1,7376$ ,  $K_2=0,3137$ ,  $K_3=1,8988$ ,  $L_1=0,0132$ ,  $L_2=0,0230$ ,  $L_3=155,2363$ . De acordo com a Ref. [63], como  $\lambda$  se encontra representado em  $\mu\text{m}$  na Eq. (16),  $K_1$ ,  $K_2$  e  $K_3$  são parâmetros adimensionais, enquanto que  $L_1$ ,  $L_2$ , e  $L_3$  se encontram representados em  $\mu\text{m}^2$ .

Voltando a considerar a montagem experimental representada na Figura 1, seis lasers com diferentes  $\lambda$ s de emissão foram usados para medir o IR do córtex: 401,4 nm, 534,6 nm, 626,6 nm, 782,1 nm, 820,8 nm e 850,7 nm. Estes  $\lambda$ s de emissão dos vários lasers foram verificados com recurso a um espectrofotômetro da marca Avantes<sup>TM</sup> (Apeldoorn, Holanda). Todos os lasers, com a exceção dos que emitem a 534,6 e 626,6 nm são lasers semicondutores comprados à Edmund Optics<sup>TM</sup> (Barrington, NJ, EUA). O laser com emissão a 534,6 nm é da marca Kvant (Bratislava, Eslováquia) e o que emite a 626,6 nm é da marca PASCO (Roseville, CA, EUA). Todos os lasers apresentam uma potência de emissão na ordem dos 5 mW.

Três conjuntos de medições foram feitos com cada um dos lasers a partir de 3 amostras distintas do córtex de coelho, tendo-se mantido a temperatura ambiente a  $20 \pm$

1 °C para realizar tais medições. O procedimento de medição adotado para cada um dos lasers foi o seguinte:

- a) A amostra de tecido foi colocada em contacto perfeito com a base do prisma (ver Figura 1),
- b) Fez-se incidir o feixe laser por uma das faces laterais do prisma, fazendo um ângulo de incidência,  $\alpha$ , com a normal à face do prisma,
- c) O feixe refletido foi recolhido da face lateral oposta do prisma por uma fotocélula (designada por laser power meter, da marca Coherent<sup>TM</sup>, com banda de deteção entre 0,15 e 11  $\mu\text{m}$ ), ligado a um voltímetro (da marca Meterman) para medir o potencial elétrico,
- d) Este procedimento foi repetido para vários valores de  $\alpha$ , separados de 1 °.

Dado que em cada conjunto de medições feitas com um determinado laser, os ângulos de incidência do feixe e os ângulos a que as tensões são detetadas são medidos fora do prisma, estes não correspondem aos ângulos de incidência e de reflexão na amostra, dentro do prisma. Assim, torna-se necessário converter os ângulos ( $\alpha$ ) externos ao prisma através da lei de Snell-Descartes para se obter os ângulos de incidência e de reflexão na amostra no interior do prisma ( $\theta$ ) [46, 49]:

$$\theta = \beta - \arcsin \left[ \frac{1}{n_{\text{prisma}}} \times \sin(\alpha) \right], \quad (17)$$

onde  $\beta$  representa o ângulo interno do prisma (60° para o prisma usado) e  $n_{\text{prisma}}$  representa o IR do prisma para o mesmo  $\lambda$  do laser usado nas medições, um valor que pode ser retirado da Figura 2.

Para obter a curva de reflexão na interface prisma/tecido para cada conjunto de medições, o seguinte cálculo foi feito [8, 49]:

$$R(\theta) = \frac{V(\theta) - V_{\text{ruído}}}{V_{\text{laser}} - V_{\text{ruído}}}, \quad (18)$$

com  $V(\theta)$  representado a tensão elétrica medida para um ângulo de incidência (ou de reflexão) na interface prisma/tecido igual a  $\theta$ ,  $V_{\text{ruído}}$  representado o potencial elétrico que corresponde à luz ambiente sem o laser ligado e  $V_{\text{laser}}$  representando o potencial elétrico medido diretamente do laser usado.

As curvas de reflectância obtidas para de cada conjunto de medições, tais como calculadas pela Eq. (18), contém informação acerca do ângulo crítico de reflexão no tecido, mas para obter tal ângulo com precisão, torna-se necessário calcular a primeira derivada de cada curva  $R(\theta)$ . Tal cálculo foi feito de acordo com a seguinte relação [8, 49]:

$$\text{deriv}(\theta) = \frac{R(\theta_i) - R(\theta_{i-1})}{\theta_i - \theta_{i-1}}, \quad (19)$$

em que  $\theta_i$  e  $\theta_{i-1}$  representam os ângulos consecutivos de medição e  $R(\theta_i)$  e  $R(\theta_{i-1})$  representam as reflectâncias correspondentes que foram medidas a esses ângulos. Tal como observado anteriormente em outros estudos [14, 49, 64], tais derivadas apresentam um pico de forte magnitude, cujo ângulo central corresponde ao ângulo crítico de reflexão ( $\theta_c$ ) na interface prisma/tecido.

Para cada conjunto de medições realizadas com um laser em particular, representando a curva da primeira derivada da reflectância em função do ângulo  $\theta$ , foi possível identificar o valor de  $\theta_c$ , que foi depois usado na Eq. (20) para calcular o IR do tecido que corresponde ao  $\lambda$  do laser [7, 49].

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = n_{\text{prisma}}(\lambda) \times \sin(\theta_c). \quad (20)$$

Na Eq. (20),  $n_{\text{tecido}}(\lambda)$  representa o IR do tecido correspondente ao  $\lambda$  do laser e  $n_{\text{prisma}}(\lambda)$  representa o IR do prisma ao mesmo  $\lambda$  (retirado da Figura 2). Este procedimento foi repetido para os restantes lasers e dado que se fizeram medições de 3 amostras de córtex com cada laser, foi possível calcular os valores médios e de desvio padrão (DP) para  $n_{\text{tecido}}$  correspondentes a cada  $\lambda$ . Considerando os valores médios obtidos, fez-se o ajuste com as curvas descritas pelas Eqs. (7) a (9), verificando-se que a curva de Cauchy (Eq. (7)) permitiu obter o melhor ajuste ( $R^2=0.9793$ ) dentro da zona do espectro em que se encontram as emissões dos lasers usados nas medições, ou seja, sensivelmente entre

400 e 850 nm. Ao fazer-se tal ajuste, foram obtidos os parâmetros de Cauchy para o córtex cerebral do coelho, como se descreve na Eq. (21):

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = 1.353 + \frac{5420}{\lambda^2} + \frac{0.3521}{\lambda^4}. \quad (21)$$

Todos os gráficos que resultam das medições e deste processo de estimação da dispersão do córtex serão apresentados no capítulo 4, tal como os cálculos adicionais para obter a dispersão mais realista a partir do espectro de  $\mu_a$  com as relações de K-K.

A próxima seção descreve o procedimento adotado em cada uma das medições espectrais realizadas para obter as restantes propriedades óticas do córtex cerebral.

### 3.3. Medições espectrais

Conforme foi dito anteriormente, foi necessário realizar 3 tipos de medições espectrais para calcular as propriedades óticas espectrais do córtex. Tais medições foram feitas com as montagens experimentais de  $T_t$ , de  $R_t$  e de  $T_c$ , que se encontram representadas na Figura 3.

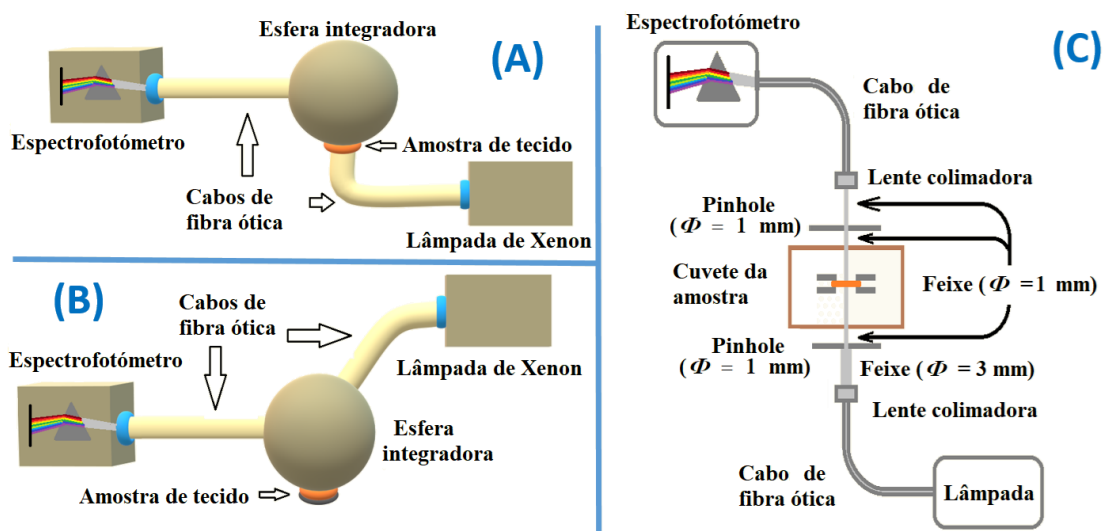


Figura 3. Montagens experimentais para aquisição dos espectros de  $T_t$  (A), de  $R_t$  (B) e de  $T_c$  (C).

Para a medição dos espectros de  $T_t$ , a amostra de tecido com espessura de 0,5 mm é colocada na porta da amostra da esfera integradora, fazendo-se a inserção do feixe da

lâmpada de xénon para o interior da esfera através da amostra de tecido. O feixe transmitido pela amostra é refletido um número elevado de vezes na parede interior da esfera integradora (processo de integração), antes de ser enviado para o espectrofotómetro, que se encontra ligado a um computador, onde o espectro é registado pelo software. Para este tipo de medições, os espectros de 10 amostras de córtex cerebral foram medidos entre 200 e 1000 nm. O software do espectrofotómetro calcula automaticamente  $T_t(\lambda)$  para a amostra da seguinte forma [4]:

$$T_t(\lambda) = \frac{T_{t-amostra}(\lambda) - T_{t-ruído}(\lambda)}{T_{t-lâmpada}(\lambda) - T_{t-ruído}(\lambda)}, \quad (22)$$

em que  $T_{t-amostra}(\lambda)$  é o espectro registado pelo espectrofotómetro após ter sido transmitido pela amostra de tecido para o interior da esfera integradora e passado pelo processo de integração,  $T_{t-ruído}(\lambda)$  é o espectro de ruído que foi inicialmente medido com a montagem experimental na situação da lâmpada desligada e  $T_{t-lâmpada}(\lambda)$  é o espectro de referência da lâmpada medido com a montagem, mas sem a amostra de tecido.

Relativamente à medição dos espectros de  $R_t$ , a montagem experimental e o processo de medição são semelhantes ao que foi descrito para as medições de  $T_t$ . Existem, no entanto, duas diferenças entre as duas montagens. A primeira é que na montagem para medir o espectro de  $R_t$ , o feixe de excitação da amostra entra pela parte superior da esfera integradora a um ângulo de  $8^\circ$  com o seu eixo vertical. A segunda diferença é que as amostras de tecido usadas para medir os espectros de  $R_t$  tem uma espessura de 3 mm para garantir que o espectro refletido para o interior da esfera integradora é de facto refletido pela amostra de tecido e não pelo material de suporte desta, que se encontra por baixo.  $R_t(\lambda)$  da amostra é calculado pelo software do espectrofotómetro da seguinte forma [4]:

$$R_t(\lambda) = \frac{R_{t-amostra}(\lambda) - R_{t-ruído}(\lambda)}{R_{t-lâmpada}(\lambda) - R_{t-ruído}(\lambda)}, \quad (23)$$

em que  $R_{t-amostra}(\lambda)$  é o espectro registado pelo espectrofotómetro após ter sido refletido pela amostra de tecido para o interior da esfera integradora e passado pelo processo de integração,  $R_{t-ruído}(\lambda)$  é o espectro de ruído que foi inicialmente medido com a montagem experimental na situação da lâmpada desligada e  $R_{t-lâmpada}(\lambda)$  é o espectro de referência da

lâmpada medido com a montagem e com um padrão de reflectância de 100% colocado na porta da amostra.

Tanto no caso das medições de espectros de  $T_t$  como de  $R_t$  foi usada uma lâmpada de xénon de potência elevada e com emissão pulsada (modelo Avalight-XE-HP da Avantes<sup>TM</sup>, Apeldoorn, Holanda) para garantir que a intensidade do feixe durante o processo de integração no interior da esfera é suficiente para registrar um espectro bem definido. Tal lâmpada já não é adequada para a medição de espectros de  $T_c$  devido à sua elevada potência, que pode saturar o espectrofotómetro. Assim, para medir os espectros de  $T_c$  foi usada uma outra lâmpada, também de espectro largo, mas com uma potência de emissão mais baixa. A lâmpada usada neste caso foi a designada por Avalight-D(H)-S, também fabricada pela Avantes<sup>TM</sup> (Apeldoorn, Holanda), que na realidade tem duas lâmpadas no seu interior, uma de deutério e outra de halogénio, para garantir um espectro que cobre toda a zona espectral entre os 200 e os 1000 nm [4].

Para realizar as medições dos espectros de  $T_c$ , a amostra é colocada dentro de uma cuvete própria, que foi construída em material de cor preta para evitar a entrada de luz indesejável. Esta cuvete tem duas janelas de vidro transparente para garantir que todo o espectro de luz entre 200 e 1000 nm do feixe de iluminação entra no interior da cuvete, assim como do feixe transmitido pela amostra sai da cuvete. Para garantir que se mede realmente um feixe colimado e que se pode considerar a lei de Bouguer-Beer-Lambert para o cálculo do espectro do  $\mu_s$  da amostra, duas lentes colimadoras são colocadas nas extremidades dos cabos de fibra ótica e dois pinholes de 1 mm de diâmetro são posicionados imediatamente à entrada e à saída da cuvete [65]. O espectro de  $T_c(\lambda)$  da amostra é calculado pelo software do espectrofotómetro da seguinte forma [4]:

$$T_c(\lambda) = \frac{T_{c-amostra}(\lambda) - T_{c-ruído}(\lambda)}{T_{c-lâmpada}(\lambda) - T_{c-ruído}(\lambda)}, \quad (24)$$

em que  $T_{c-amostra}(\lambda)$  representa o espectro que foi transmitido pela amostra de tecido e recolhido pela ótica de deteção,  $T_{c-ruído}(\lambda)$  representa o espectro de ruído que foi medido com a montagem experimental, mas com a lâmpada desligada e  $T_{c-lâmpada}(\lambda)$  representa o espectro de referência da lâmpada que foi medido com a montagem experimental, mas sem a amostra de tecido. Deve notar-se que apesar de terem sido usadas duas lâmpadas distintas nas medições com e sem esfera integradora, os espectros calculados pelas Eqs.

(22), (23) e (24) representam os espectros característicos das amostras de tecido usadas nas medições, sendo que não dependem nem da intensidade nem da forma espectral das lâmpadas usadas em cada caso.

Tal como foi já referido, foram usadas inicialmente 10 amostras de córtex cerebral de coelho, com espessura de 3 mm, para medir os 10 espectros de  $R_t$ . Posteriormente, tais amostras foram desbastadas no crióstato para passarem a ter uma espessura de 0,5 mm e serem usadas nas medições dos espectros de  $T_t$  e de  $T_c$ . Foram também feitas 10 medições de espectros com cada uma dessas montagens. Todos os espectros medidos respeitam à banda entre 200 e 1000 nm.

Embora fora do plano de trabalhos desta tese de mestrado, mas devido à colaboração com o colega de mestrado Luís Fernandes e dado o interesse em avaliar a aplicabilidade de algoritmos de ML para reconstruir o espectro do  $\mu_a$  do córtex cerebral, foram feitas mais tarde medições de espectros de  $R_d$  de amostras similares. A montagem experimental usada para tais medições encontra-se representada na Figura 4.

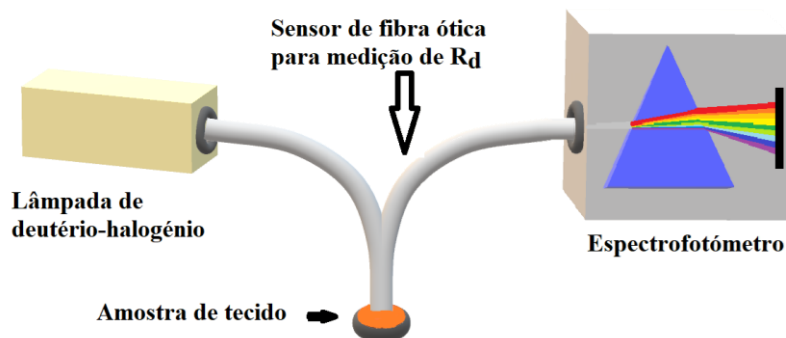


Figura 4. Montagem experimental para aquisição dos espectros de  $R_d$ .

De acordo com a montagem representada na Figura 4, o feixe proveniente da lâmpada de deutério-halogénio incide verticalmente sobre a amostra de tecido. O feixe que é refletido de forma difusa pela superfície da amostra é colectado por um conjunto de fibras óticas individuais, que rodeiam a fibra de iluminação dentro do cabo. Este sensor de fibra ótica é propriedade pessoal do Professor Luís Oliveira e foi-lhe oferecido pela empresa ArtPhotonics<sup>TM</sup> (Berlin, Alemanha) para ser usado na sua investigação. Tal como no caso das restantes medições espectrais, o espectro de  $R_d$  do tecido é calculado pelo software do espectrofotómetro da seguinte forma [47, 61]:

$$R_d(\lambda) = \frac{R_{d-amostra}(\lambda) - R_{d-ruído}(\lambda)}{R_{d-lâmpada}(\lambda) - R_{d-ruído}(\lambda)}, \quad (25)$$

sendo que  $R_{d-amostra}(\lambda)$  representa o espectro registado pelo espectrofotómetro após ter sido refletido pela amostra de tecido,  $R_{d-ruído}(\lambda)$  representa o espectro de ruído que foi inicialmente medido com a montagem experimental na situação da lâmpada desligada e  $R_{d-lâmpada}(\lambda)$  representa o espectro de referência da lâmpada medido com a montagem e com um padrão de reflectância de 100% colocado na posição da amostra.

Usando as medições feitas com a montagem experimental representada na Figura 4, foram obtidos 10 espectros de  $R_d$  entre 200 e 1000 nm. Estes espectros, juntamente com os 10  $\mu_a(\lambda)$  calculados para o córtex cerebral do coelho a partir dos espectros medidos com as montagens de  $T_t$  e de  $R_t$ , foram usados pelo colega Luís Fernandes para desenvolver os algoritmos de ML para reconstruir o espectro médio do  $\mu_a$  a partir de medições que simulam o procedimento não invasivo, ou seja, os espectros de  $R_d$  [61]. Uma breve descrição do procedimento usado na construção destes algoritmos será feita na secção 3.5, mas primeiro será descrito na secção 3.4 todo o procedimento de cálculo usado para obter os espectros das propriedades óticas do córtex a partir dos espectros de  $T_t$ , de  $R_t$  e de  $T_c$ .

### 3.4. Cálculos e simulações realizadas

Dado que o objetivo do presente trabalho consistiu na determinação dos espectros das propriedades óticas do córtex cerebral, esta secção apresenta a sequência de cálculos realizados. Todos os cálculos realizados para obter essas propriedades óticas espectrais foram feitos considerando a teoria da difusão de fótons dentro de meios materiais [50, 52, 61].

A primeira propriedade ótica espectral calculada foi o  $\mu_a$ . Dado que foram medidos 10 espectros de  $T_t$  e 10 espectros de  $R_t$ , utilizaram-se as Eqs. (13) e (14) para calcular 10 espectros do  $\mu_a$ . Após esse cálculo determinou-se o espectro médio e respetivo DP espectral para o  $\mu_a$  do córtex [50, 61].

De forma a calcular o espectro do  $\mu_s$  do córtex, usaram-se os 10 espectros do  $\mu_a$  já calculados, juntamente com os 10 espectros de  $T_c$  medidos na Eq (15). Com este cálculo

foram obtidos 10 espectros do  $\mu_s$  do córtex, tendo-se posteriormente calculado o espectro médio e o DP espectral respetivos [50, 61].

Usando novamente os 10 espectros do  $\mu_a$  que já estavam calculados, aplicaram-se as Eqs. (10) e (11) para obter 10 espectros de dispersão ( $n_{\text{tecido}}(\lambda)$ ) do córtex cerebral. O programa usado para realizar este cálculo inclui também o cálculo do espectro médio e do DP espectral correspondentes. Durante este processo de cálculo, fez-se a otimização do mesmo com a correção do parâmetro  $\lambda_1$  na Eq. (11), para que o espectro médio final se ajuste o melhor possível à curva de dispersão determinada a partir das medições discretas de IR do córtex, que é descrita pela Eq. (21) [50].

Para dar seguimento à determinação das restantes propriedades óticas espectrais do córtex cerebral, passou-se à determinação do espectro do  $\mu'_s$ . Como foi referido anteriormente, não existe nenhuma equação que permita o cálculo direto desta propriedade a partir de medições experimentais, tornando-se necessário obter tal propriedade por simulação computacional. Desta forma, foi usado o código de simulação IAD, criado por Scott Prahl, que se encontra disponível online no endereço da Ref. [58]. Este código faz a estimação de um conjunto de propriedades óticas de um tecido para um  $\lambda$  individual. Como parâmetros de entrada para a simulação são necessários os valores do IR, da  $T_t$ , da  $R_t$  e da  $T_c$  da amostra, gerando como resultados da simulação os valores do  $\mu_a$ , do  $\mu'_s$  e do  $g$  para esse  $\lambda$ . Dado que o espectro do  $\mu_a$  já tinha sido calculado de forma rápida e o espectro do  $g$  pode ser calculado rapidamente a partir dos espectros do  $\mu_s$  e do  $\mu'_s$ , não se perdeu tempo a recolher os valores gerados para esses parâmetros nas simulações realizadas. Uma vez que nesta fase do trabalho já se dispunham de 10 espectros de  $n_{\text{tecido}}$ , de  $T_t$ , de  $R_t$  e de  $T_c$  resultantes de medições com 10 amostras de córtex, foram feitos 10 conjuntos de simulações com o código IAD para diferentes  $\lambda$ s discretos entre 200 e 1000 nm. Neste processo, considerou-se que realizar as simulações a cada 50 nm no intervalo espectral pretendido era suficiente. Isto porque, após a estimação dos valores discretos do  $\mu'_s$ , cada conjunto de valores gerados foi ajustado por uma curva como a descrita pela Eq. (6), obtendo assim 10 espectros do  $\mu'_s$  [50]. Considerando os 10 espectros obtidos nesta fase do trabalho, foram calculados o espectro médio e o DP espectral para  $\mu'_s$ .

Uma vez calculados os 10 espectros do  $\mu'_s$ , estes foram utilizados juntamente com os 10 espectros do  $\mu_s$  na primeira parte da Eq. (6) para calcular os espectros da  $g$  para as 10 amostras estudadas. Novamente, determinou-se o espectro médio e o DP espectral da  $g$  [50].

Para terminar a determinação das propriedades óticas espectrais do córtex cerebral, foi também calculada a  $\delta$ . Utilizando os 10 espectros do  $\mu_a$  e os 10 espectros do  $\mu'_s$  nas Eqs. (2) e (3), foram obtidos 10 espectros da  $\delta$ , tendo-se depois obtido o espectro médio e o DP espectral da  $\delta$  para o córtex cerebral [50]. Considerando os espectros do  $\mu_a$  e do  $\mu'_s$  obtidos neste estudo, verificou-se que entre 200 e 600 nm a absorção é comparável ao espalhamento e que acima de 600 nm, o espalhamento é mais forte. Assim, entre 200 e 600 nm, o espectro de  $\delta$  foi calculado pela Eq. (3), enquanto que acima de 600 nm, se utilizou a Eq. (2) para fazer esse cálculo.

Todos os resultados destes cálculos e simulações estão apresentados no Capítulo 4, onde se fará uma discussão dos mesmos.

### **3.5. Reconstrução do $\mu_a$ a partir dos dos espectros de $R_d$**

Após se ter calculado o  $\mu_a(\lambda)$  do córtex cerebral diretamente a partir das medições espectrais realizadas, verificou-se a presença dos pigmentos melanina e lipofuscina, cujos conteúdos se conseguiu discriminar. Com a verificação da presença destes pigmentos, que estão associados ao desenvolvimento de alterações degenerativas dos neurónios do cérebro e são percussores das doenças de Alzheimer e de Parkinson [66-68], surgiu o interesse de verificar se esta informação pode ser acedida a partir de medições realizadas sem a biópsia dos tecidos cerebrais.

Para realizar este estudo, foram utilizados 10 espectros de  $R_d$  medidos também entre 200 e 1000 nm de novas amostras do córtex cerebral como dados de entrada em algoritmos de ML, tendo-se otimizado tais algoritmos por comparação entre os espectros de  $\mu_a$  gerados e os que foram calculados com as medições espectrais realizadas. Dado que 10 espectros consistem num número reduzido de amostras para treinar os algoritmos de ML para reconstruir os espectros de  $\mu_a$  do cérebro, procedeu-se inicialmente a um incremento de amostras de treino ( $R_d(\lambda)$ ) e de validação ( $\mu_a(\lambda)$ ) através da geração artificial de novos espectros, a partir dos medidos experimentalmente, com recurso a algoritmos designados por “Generative Adversarial Networks” (GANs). O objetivo deste incremento de amostras consistiu em aumentar a robustez dos modelos de ML a usar e diminuir a sua tendência de sobre ajuste para os resultados gerados para  $\mu_a(\lambda)$ . O procedimento de incremento digital de amostras consistiu nos passos seguintes:

- a) Geração de um novo espectro artificial a partir de ruído aleatório usando o gerador,
- b) Treino do discriminante usando tanto o espectro experimental como o artificial,
- c) Ajuste de parâmetros do gerador usando a perda do discriminador (erro métrico).

Dada a dinâmica entre o gerador e o discriminador, a convergência do modelo das GANs não é um estado estável. Tal facto ocorre devido à existência de um ponto no processo de treino em que o gerador é tão bom que o discriminador começa a adivinhar se os novos dados são reais ou artificiais. Isto significa que o gerador passa a receber dados enganosos. Para evitar que tal aconteça, o processo de treino foi parado quando a média dos espectros gerados artificialmente se aproximou significativamente do espectro médio que resulta das medições experimentais. Outro aspeto importante quando se treinam modelos gerados por GANs é a taxa de aprendizagem do gerador e do discriminador.

Como exemplo, se o discriminador converge mais cedo que o gerador, aumentam as hipóteses de ocorrência de colapso do modelo, em que o gerador apenas produz um tipo de amostra numa tentativa de enganar o discriminador. A taxa de aprendizagem foi testada com valores entre 0.001 e 0.000001 e depois fixa a 0.0001 devido ao facto que diminuições adicionais não contribuía para uma melhor performance do modelo das GANs. Adicionalmente, as redes neuronais que compõe o modelo das GANs foram definidas com arquiteturas distintas. O discriminador tinha cinco camadas, sendo que as duas primeiras eram compostas por 801 nodos (cada unidade de  $\lambda$  entre 200 e 1000 nm), a terceira com 600 nodos, a quarta com 400 nodos e a quinta com um nodo. O gerador tinha cinco camadas, sendo que cada uma tinha 801 nodos, com a exceção da terceira, que tinha apenas 600 nodos. Durante o processo de treino, um dos modelos das GANs foi treinado para gerar novos espectros de  $R_d$  e o outro foi treinado para gerar novos espectros de  $\mu_a$ . Dado que estes dois modelos das GANs convergem a diferentes instantes de tempo, o número de épocas para o modelo das GANs que gera novos espectros de  $R_d$  foi fixo em 7901, enquanto que para o modelo das GANs que gera espectros de  $\mu_a$ , o número de épocas foi fixo em 1301. Após o treino e ajuste fino dos modelos das GANs, os novos espectros gerados foram representados graficamente e comparados com os espectros

experimentais, mostrando boa concordância (resultados apresentados no final do Capítulo 4) [50].

Depois de treinados e afinados os modelos das GANs, estes foram usados para gerar conjuntos de 10, 50 e 100 espectros para treinar os outros modelos de ML no processo de resolver o problema de regressão da criação de espectros de  $\mu_a$  a partir dos espectros de  $R_d$ . Para melhorar a forma global dos espectros gerados, foi aplicado um filtro de Savitzky-Golay para suavizar os espectros. Para cada grupo de espectros gerados, três experiências foram realizadas:

- a) Na primeira experiência, os modelos de ML foram treinados com os espectros gerados e testados com os espectros experimentais (G/E),
- b) Na segunda experiência, os modelos de ML foram treinados com os espectros experimentais e testados com os espectros gerados (E/G),
- c) Na terceira experiência, tanto os espectros gerados como os experimentais foram combinados todos juntos (*altogether*, AT) para serem usados no treino e no teste do modelo de ML.

Nesta última experiência, os espectros gerados e experimentais foram repartidos em proporções de 80/20 para serem usados no processo de treino e de teste, respectivamente, para avaliar a performance do modelo de ML. Como exemplo, para o grupo de 10 espectros gerados, foi garantido que os espectros usados no teste continham 8 espectros experimentais e 2 gerados.

Uma experiência adicional foi realizada para o modelo de ML, em que nenhum espectro gerado foi utilizado nos processos de treino e de teste. Neste caso, o método designado por *Leave One Out* (LOOO) foi usado para obter um ponto de referência para a performance, tal como foi feito num estudo realizado anteriormente com dados da mucosa colorectal humana [47].

De forma semelhante ao que foi feito durante a geração de espectros artificiais com os modelos das GANs, os algoritmos designados por *Single Layer Perceptron* (SLP), *K-Nearest Neighbor* (KNN) e *Random Forest Regressor* (RFR) foram afinados para produzir a melhor performance possível. Estes algoritmos foram os que mostraram a melhor performance no estudo anterior com tecidos coloreticais [47]. Por essa razão, estes três algoritmos foram selecionados para o presente estudo. O algoritmo SLP foi preparado com duas camadas, tendo 10 nodos a primeira e 801 a segunda. O processo de

aprendizagem foi estabelecido a 0.001 e o número de épocas foi estabelecido em 50 durante a execução das três experiências acima descritas. Para os algoritmos KNN e RFR, o número de vizinhos (*neighbors*) e o número de árvores (*trees*) foi estabelecido em 3 e 4, respetivamente. Incrementos adicionais nestes hiper-parâmetros aumentam o custo computacional dos modelos de ML sem qualquer aumento aparente na performance.

Para quantificar a performance dos modelos de ML usados na estimação do espectro do  $\mu_a$ , a distância euclidiana (DE) entre o espectro médio estimado (EMEs) e o espectro médio de referência resultante dos cálculos diretos com dados experimentais (EMEx) foi calculada usando a Eq. (26) [69]:

$$DE = |a - b|, \quad (26)$$

onde  $a$  representa o valor do  $\mu_a$  no EMEs e  $b$  representa o valor do  $\mu_a$  no EMEx, com o EME calculado a partir dos espectros gerados artificialmente e EMEx calculado a partir dos espectros experimentais.

Os resultados obtidos pelas estimações com as GANs e com os algoritmos de ML, assim como os gráficos comparativos da DE para selecionar o melhor algoritmo de geração do espectro do  $\mu_a$  a partir dos espectros de  $R_d$  são apresentados no final do Capítulo 4. Os cálculos para recolher os conteúdos dos pigmentos do espectro do  $\mu_a$  gerado pelo método que apresentou melhor performance são também apresentados para mostrar que a avaliação do conteúdo de pigmentos no córtex cerebral é possível com um método minimamente invasivo.

## CAPÍTULO 4 -RESULTADOS

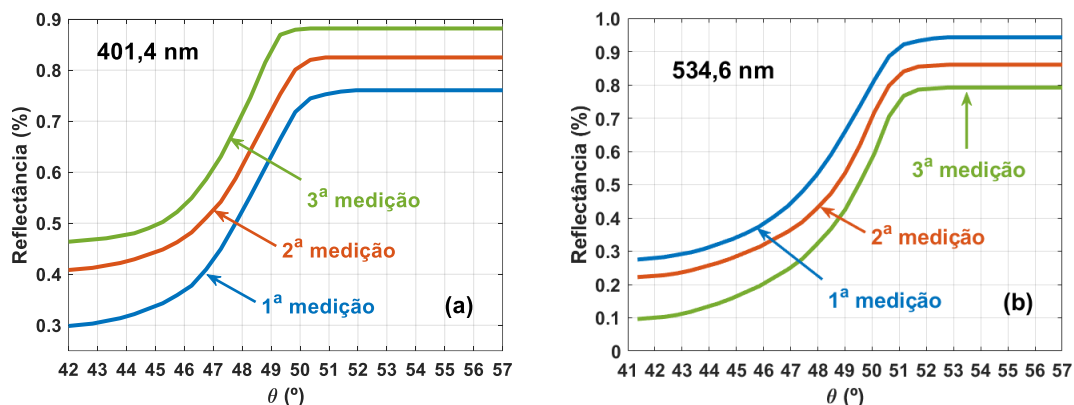
## 4. Resultados

Após ter sido descrito o procedimento experimental adotado para a realização do trabalho de investigação, o presente capítulo servirá para apresentar os resultados obtidos, assim como a discussão dos mesmos.

Na secção 4.1 serão apresentadas as medições do IR, assim como os resultados obtidos nas diferentes fases de cálculo para se obter a dispersão do córtex cerebral. Na secção 4.2 serão apresentados espectros médios que resultam das medições, passando a apresentar-se na secção 4.3 o cálculo das propriedades óticas espectrais para este tecido biológico. Na secção 4.4 serão apresentados os resultados obtidos no estudo de ML e na secção 4.5 será feita a análise do conteúdo de pigmentos no córtex cerebral, assim como uma interpretação desses resultados.

### 4.1. Medições de IR e cálculo da dispersão do córtex cerebral

De acordo com o procedimento descrito na secção 3.1, foram realizadas medições de IR a  $\lambda$ s discretos entre sensivelmente 400 e 850 nm. De acordo com tal procedimento experimental, foram feitas 3 medições com cada laser a partir de 3 amostras de tecido distintas. Para cada conjunto de medições feito com cada amostra, foi inicialmente calculada a curva de reflectância em função do ângulo de incidência do feixe laser. A Figura 5 apresenta tais curvas de reflectância, tal como calculadas com a Eq. (18) para cada laser usado.



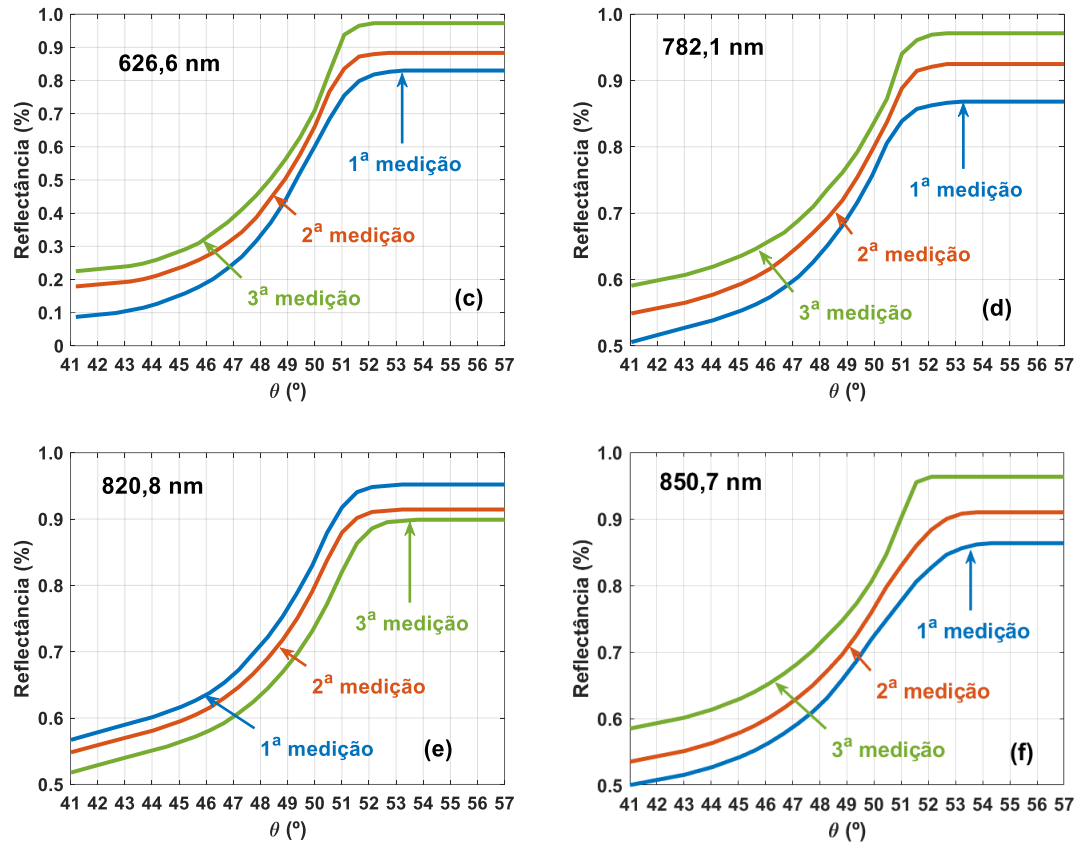
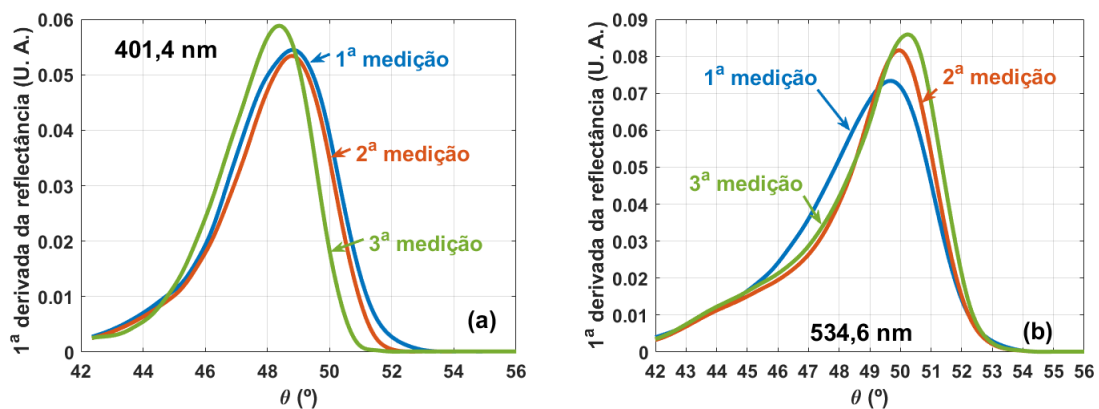


Figura 5. Curvas de reflectância obtidas nas medições de IR para 3 amostras de córtex cerebral, usando lasers com emissão a: 401,4 nm (a), 534,6 nm (b), 626,6 nm (c), 782,1 nm (d), 820,8 nm (e) e 850,7 nm (f).

Seguindo o procedimento descrito na secção 3.1, para identificar em cada conjunto de medições o ângulo crítico de reflexão, foi necessário calcular a primeira derivada de cada uma das curvas representadas nos gráficos da Figura 5. Tal cálculo das curvas derivadas foi feito através da Eq. (19) e os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 6.



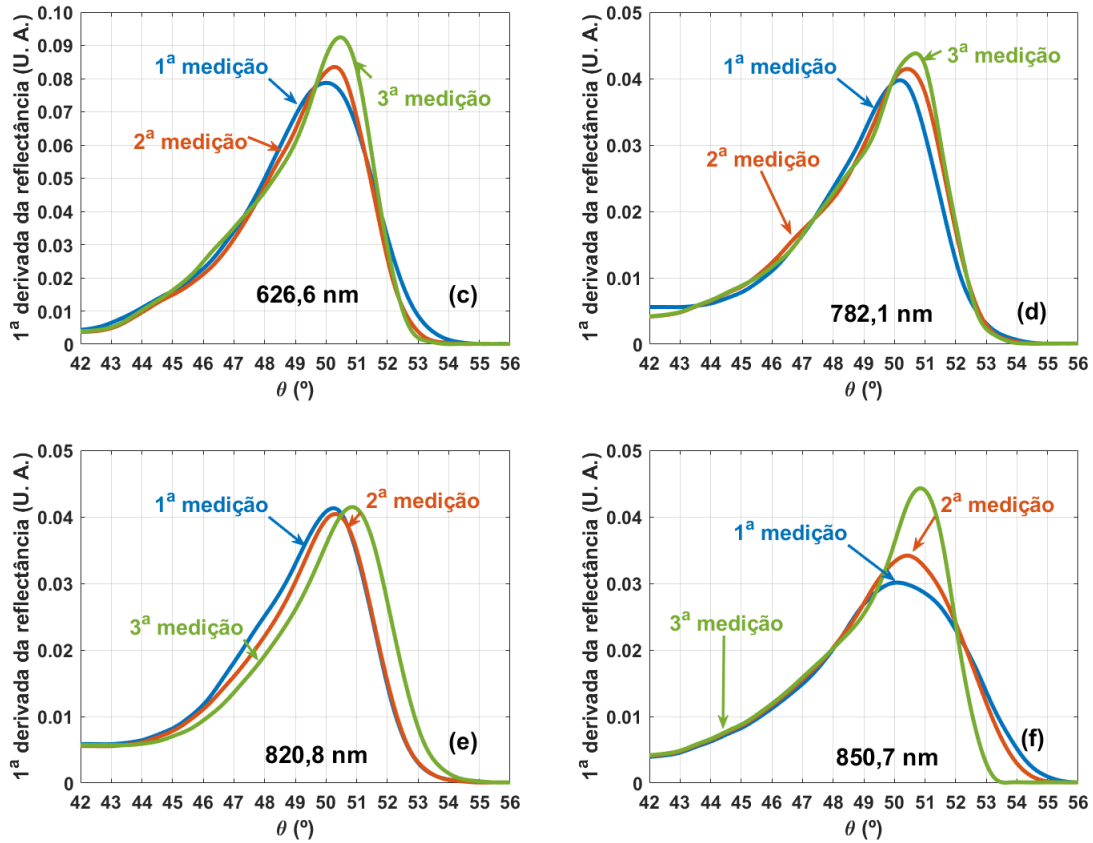


Figura 6. Curvas representativas da 1ª derivada das curvas apresentadas na Figura 5 para as medições feitas com lasers com emissão a: 401,4 nm (a), 534,6 nm (b), 626,6 nm (c), 782,1 nm (d), 820,8 nm (e) e 850,7 nm (f).

Analisando cada curva dos gráficos representados na Figura 6, identificaram-se os ângulos a que se observam os picos. Tais ângulos, correspondem aos ângulos críticos de reflexão para cada conjunto de medições e foram usados na Eq. (20) para calcular o IR do córtex cerebral para cada conjunto de medições com os diferentes lasers. Nesses cálculos usaram-se os valores correspondentes de  $n_{\text{prisma}}$ , que foram retirados da curva representada na Figura 2. Tais resultados de IR, assim como a média e DP a cada  $\lambda$  encontram-se representados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de IR do córtex obtidos das medições com o método de reflexão interna total, valores médios e DP para cada  $\lambda$ .

Laser ( $\lambda$ )	$n_{\text{tecido}}$	média	DP
401,4 nm	1,3883	1,3850	0,0053
	1,3877		
	1,3789		
534,6 nm	1,3679	1,3736	0,0058
	1,3735		

	1,3794		
626,6 nm	1,3632 1,3686 1,3721	1,3680	0,0045
782,1 nm	1,3562 1,3609 1,3662	1,3611	0,0050
820,8 nm	1,3552 1,3566 1,3673	1,3597	0,0066
850,7 nm	1,3516 1,3583 1,3667	1,3589	0,0076

Considerando os valores médios de  $n_{\text{tecido}}$  fez-se uma representação dos mesmos em função do  $\lambda$  dos lasers usados, tendo-se ajustado esses pontos com a curva de dispersão de Cauchy (Eq. (7)), conforme representado na Figura 7.

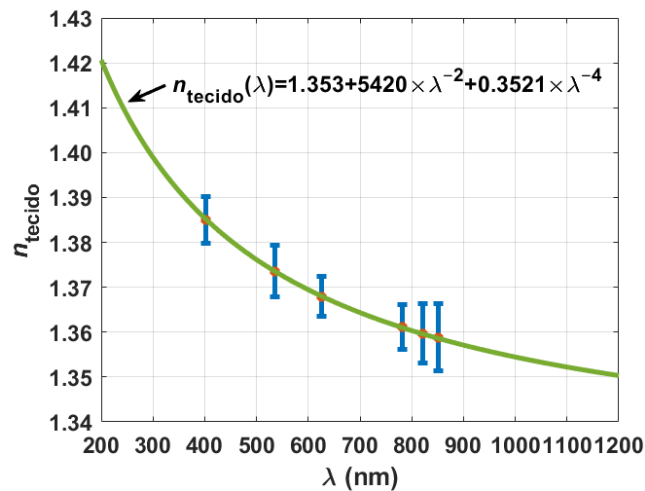


Figura 7. Valores experimentais de IR do córtex cerebral e curva de dispersão calculada.

Tal como foi já referido, a curva de Cauchy representada na Figura 7 foi a que permitiu um melhor ajuste aos pontos experimentais, apresentado um valor de  $R^2$  de 0,9793. Tal curva é descrita pela Eq. (21), que está também representada na Figura 7.

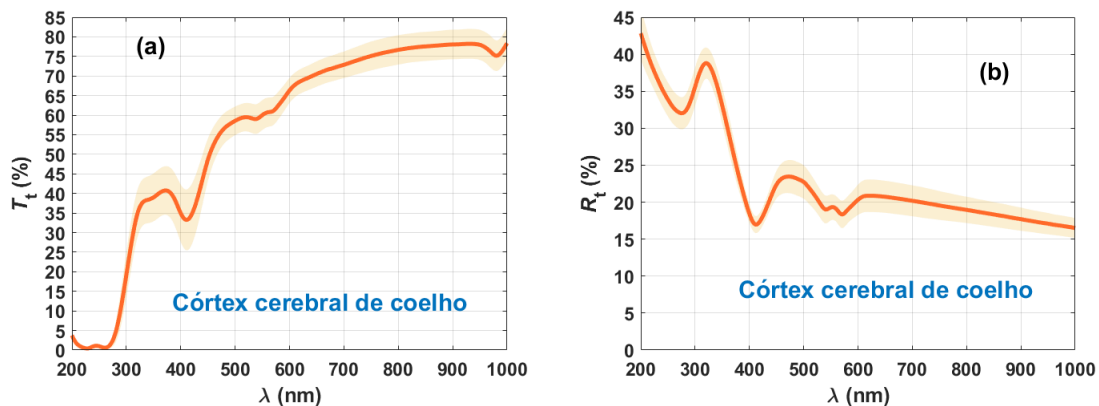
De forma a comparar este resultado com outros na literatura e posteriormente usar tais dados no cálculo da dispersão do córtex cerebral entre 200 e 1000 nm através das relações de K-K, a curva representada na Figura 7 já se encontra representada entre 200 e 1200 nm.

A Ref. [70] indica que o IR da matéria cinzenta do cérebro humano (que inclui o córtex) toma o valor constante de 1.36 entre 456 e 1064 nm. No caso do presente estudo e considerando a mesma zona espectral, verifica-se que o IR do córtex cerebral de coelho se encontra entre 1.35 e 1.38. Por outro lado, foi publicado pelos autores da Ref. [71] que o córtex cerebral de rato apresenta um IR constante de 1.3526 na zona de  $1100\pm 100$  nm. Olhando para a curva da Figura 7, verifica-se que o IR do córtex de coelho apresenta um valor médio de 1.3525 nessa zona do espectro. Os autores da Ref. [72] indicaram que o IR do córtex cerebral de rato apresenta um valor médio de IR de 1.3690, mas não indicaram a que zona do espectro se refere esse valor. No caso do presente trabalho, este valor é observado a aproximadamente 600 nm.

Considerando que os resultados experimentais para obter o IR do córtex cerebral do coelho aqui apresentados são válidos e precisos e assumindo também que a dispersão calculada é válida em toda a extensão representada na Figura 7, passaremos a apresentar na secção 4.2 as medições espectrais realizadas para obter os espectros das propriedades óticas do córtex cerebral do coelho.

## 4.2. Medições espectrais

Para se proceder ao cálculo das propriedades óticas espectrais do córtex cerebral do coelho entre 200 e 1000 nm, foram feitas várias medições espectrais de 10 amostras deste tipo de tecido. Tal como descrito na secção 3.3, mediram-se 10 espectros com cada uma das montagens experimentais representadas nas Figuras 3 e 4, sendo que os espectros médios e o DP espectral resultantes dessas medições se encontram apresentados na Figura 8.



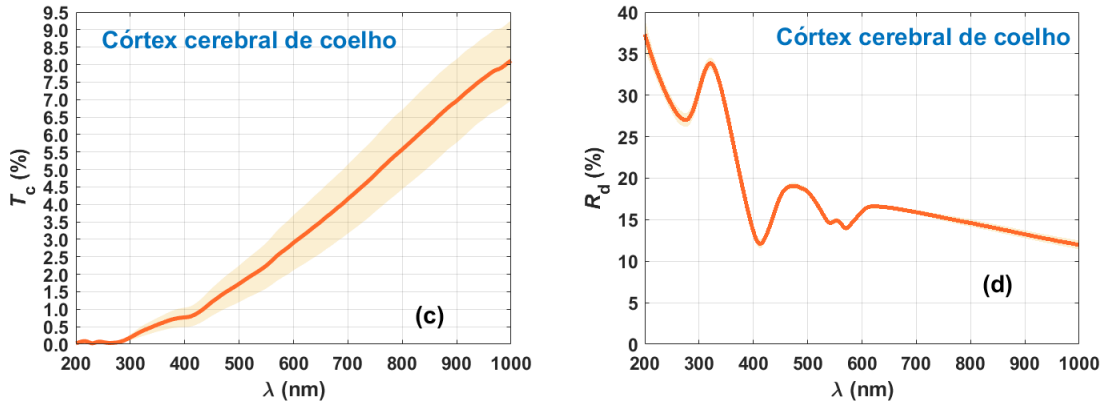


Figura 8. Espectros médios e DP espectral experimentais do córtex cerebral de coelho:  $T_t(\lambda)$  (a),  $R_t(\lambda)$  (b),  $T_c(\lambda)$  (c) e  $R_d(\lambda)$  (d).

Conforme mostram os espectros médios representados na Figura 8, a dependência no  $\lambda$  para cada uma das grandezas medidas é particular, embora se verifiquem semelhanças entre os espectros de  $R_t$  e de  $R_d$ . Todas estas formas espectrais estão de acordo com as observadas para as mesmas medições realizadas a partir de outros tecidos biológicos [4], mas contém informação que depois de retirada permite distinguir o córtex cerebral dos restantes tecidos. Para retirar essa informação é necessário calcular os espectros das propriedades óticas do córtex, o que será feito na próxima secção.

Analisando os espectros médios representados na Figura 8 e começando pelo  $T_t(\lambda)$ , verifica-se que a transmitância tende a crescer com o  $\lambda$ , sendo evidentes várias bandas de absorção relativas às proteínas (230 nm), ao ADN/ARN (260 nm), à hemoglobina (411 nm e 540/570 nm) e à água (980 nm) [21-23]. Deve notar-se que as proteínas e o ADN/ARN apresentam bandas de absorção muito fortes, o que faz com que entre 200 e 300 nm, a  $T_t$  seja praticamente nula. No caso de  $R_t(\lambda)$  e de  $R_d(\lambda)$ , observam-se também as bandas de absorção do ADN/ARN e da hemoglobina, mas as bandas características das proteínas e da água desapareceram, mostrando que este tipo de medições não tem a sensibilidade suficiente para as detetar. No caso do  $T_c(\lambda)$ , encontra-se novamente a forte absorção entre 200 e 300 nm como no caso do  $T_t(\lambda)$ , mas não se observa a banda característica da água e relativamente à hemoglobina, apenas aparece uma banda muito dissimulada a 411 nm (banda de Soret). No caso do espectro médio de  $R_d$ , observa-se um DP praticamente nulo entre 200 e 1000 nm, o que se deve ao facto de que todas as amostras usadas na medição dos 10 espectros de  $R_d$  foram todas recolhidas do mesmo animal. Conforme mencionado anteriormente, a recriação do espectro de  $\mu_a$  do córtex não fazia parte dos objetivos do presente trabalho, pelo que a necessidade de

realizar a medição de espectros de  $R_d$  foi apenas criada mais tarde e sujeita a amostras de um único animal.

Depois de medidos todos os espectros passou-se ao cálculo das propriedades óticas espectrais do córtex. Tais resultados são apresentados na secção seguinte.

### 4.3. Cálculo das propriedades óticas espectrais do córtex cerebral

De acordo com o procedimento descrito na secção 3.4, procedeu-se ao cálculo dos espectros das várias propriedades óticas do córtex cerebral do coelho. A primeira propriedade a ser calculada foi o  $\mu_a$ . Para realizar esse cálculo e dispondo de 10 espectros medidos de  $T_t$  e de  $R_t$ , utilizou-se a Eq. (13) para calcular 10 espectros de  $A_b$ . De seguida, através da Eq. (14), estes espectros foram divididos pela espessura da amostra para calcular 10 espectros do  $\mu_a$ . A Figura 9 apresenta o espectro médio e o DP espectral que resulta deste cálculo.

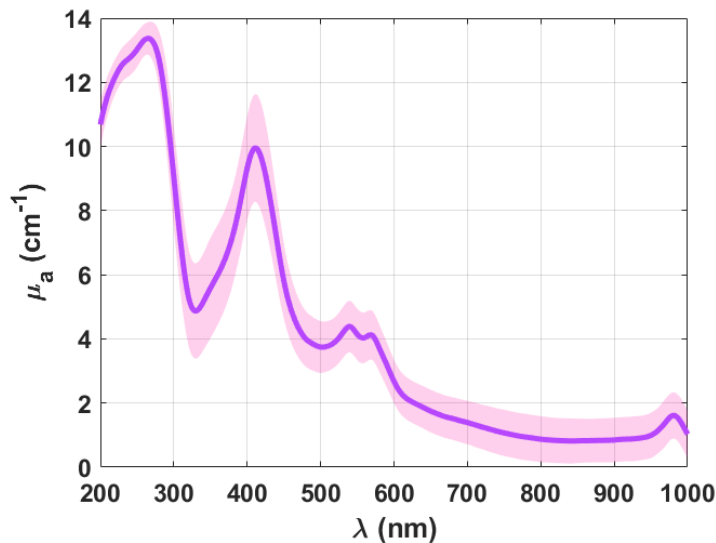


Figura 9. Espectro médio do  $\mu_a$  do córtex cerebral de coelho.

O espectro médio do  $\mu_a$  que se encontra representado na Figura 9 apresenta muita informação de interesse fisiológico. Em primeiro lugar e considerando os picos de absorção existentes, são bem visíveis as bandas de absorção da água, centrada a 980 nm e da hemoglobina, compostas pela banda de Soret a 411 nm, e pelas bandas Q centradas a 540 nm e 570 nm [21-23]. Por outro lado, observa-se uma dupla banda de elevada magnitude que apresenta dois picos na zona do UV. O pico mais proeminente desta dupla banda encontra-se centrado a 267 nm como resultado da combinação dos picos de

absorção do ADN/ARN a 260 nm e da hemoglobina a 274 nm [23]. O segundo pico, centrado a 230 nm, é mais modesto e corresponde à combinação das bandas de absorção das ligações dos aminoácidos aromáticos nas proteínas: a fenilalanina, a tirosina e o triptofano [21, 22]. Sabe-se que vários tipos de proteínas, como a actina, a albumina, a  $\alpha$ -tubulina, a  $\beta$ -tubulina, a enolase específica neuronal e a vimentina, fazem parte dos tecidos cerebrais, em especial do córtex [73], e todas estas proteínas apresentam tais ligações entre as suas hélices [74].

Para além de mostrar a presença de todos estes componentes biológicos no tecido do córtex, o espectro médio do  $\mu_a$  que está representado na Figura 9 dá ainda outra informação fisiológica adicional de elevada importância. Este espectro apresenta uma linha de base que decresce de forma aproximadamente exponencial com o crescimento do  $\lambda$ . Tal como explicado na literatura [4, 48], a presença de uma linha de base deste tipo no espectro do  $\mu_a$  indica a presença de pigmentos, cujo espectro de absorção cobre toda a extensão desde os 200 até aos 1000 nm. Tais pigmentos foram já identificados e são a melanina e a lipofuscina [75, 76]. Na secção 4.5 será feito um cálculo para obter os conteúdos desses pigmentos no córtex cerebral e depois de retirada a sua contribuição do espectro do  $\mu_a$ , serão analisados os conteúdos dos restantes componentes.

Seguindo o procedimento descrito na secção 3.4, recorreu-se às relações de K-K para calcular a dispersão real do córtex cerebral do coelho. Na primeira fase deste cálculo, cada um dos 10 espectros do  $\mu_a$  foi usado na Eq. (10) para obter os 10 espectros de  $\kappa_{\text{tecido}}$ , que posteriormente foram usados na Eq. (11) para obter os espectros de  $n_{\text{tecido}}$ . A Figura 10 apresenta o espectro médio de  $n_{\text{tecido}}$  e o DP espectral resultante, assim como os valores médios de IR medidos experimentalmente e a curva de Cauchy que tinha sido calculada anteriormente.

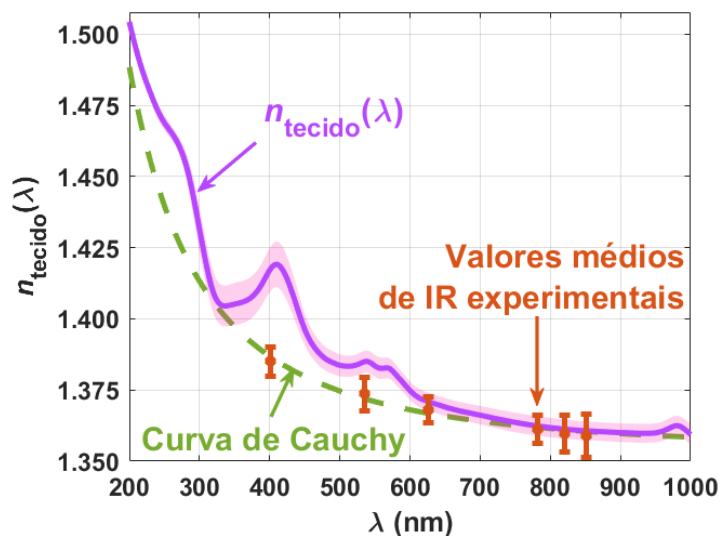


Figura 10. Curvas de dispersão do córtex cerebral de coelho.

Conforme mostra a Figura 10, a dispersão do córtex cerebral do coelho, tal como outras obtidas anteriormente para outros tecidos [4, 48, 52], não apresenta uma dependência suave no  $\lambda$ . Embora a curva de Cauchy tenha ajudado na otimização do ajuste vertical da dispersão calculada pelas relações de K-K, tal curva não mostra a realidade espectral da dispersão do córtex, onde as bandas de absorção dos componentes que fazem parte do tecido têm contribuição significativa. Tal como noutros estudos para avaliar a dispersão espectral do sangue [19, 20], ou de tecidos [4, 48, 52], a dispersão do córtex apresentada na Figura 10 mostra que a presença do ADN/ARN, da hemoglobina e da água influencia a forma da dispersão do tecido. Por outro lado, este resultado mostra também que o seu cálculo permite identificar de imediato os componentes biológicos que compõe o tecido e a avaliação da magnitude de cada pico de absorção existente poderá dar uma estimativa do conteúdo desses componentes no tecido.

Depois de calculada a dispersão do córtex, procedeu-se à determinação dos espectros dos dois coeficientes de espalhamento. Esta tarefa foi realizada em duas fases, tal como descrito na secção 3.4. Na primeira fase, utilizando os 10 espectros de  $T_c$  medidos e os 10 espectros do  $\mu_a$  anteriormente calculados foram obtidos pela Eq. (15) 10 espectros do  $\mu_s$  para o córtex cerebral do coelho. Neste cálculo com a Eq. (15) usou-se também a espessura das amostras de córtex estudadas, ou seja,  $d = 0.05$  cm. Na segunda fase deste cálculo, realizaram-se simulações ADI para obter os valores do  $\mu'_s$  a cada 50 nm entre 200 e 1000 nm. Tal como explicado na secção 3.4, para cada um desses  $\lambda_s$  foram feitas 10 simulações, em que os parâmetros de entrada foram os valores da  $T_t$ , da  $R_t$ , da

$T_c$  e do IR retirados de cada um dos 10 conjuntos de dados disponíveis. No caso dos valores do IR, estes foram retirados do espectro médio de  $n_{\text{tecido}}$  que está representado em cor rosa na Figura 10. Depois de obtidos os 10 conjuntos de valores de  $\mu'_s$  para cada um dos  $\lambda$ s considerados nas simulações ADI, construíram-se 10 espectros deste coeficiente com recurso ao ajuste dos pontos estimados por curvas como a descrita pela Eq. (6). Considerando os 10 espectros criados com estes ajustes, calculou-se o espectro médio de  $\mu'_s$ , assim como o respetivo DP espectral. A Figura 11 apresenta os espectros médios de  $\mu_s$  e de  $\mu'_s$ , assim como os DP espectrais correspondentes que resultam destes cálculos.

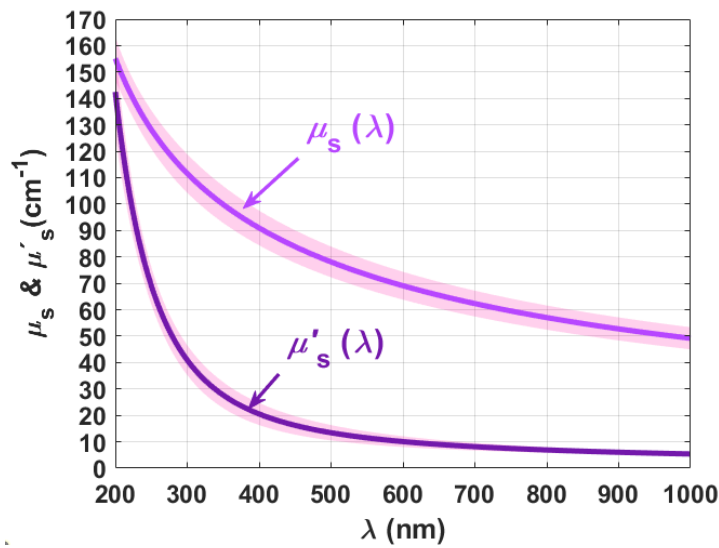


Figura 11. Espectros médios do  $\mu_s$  e do  $\mu'_s$  do córtex cerebral de coelho.

Os espectros representados na Figura 11 apresentam informação diversa quanto ao espalhamento da luz no córtex cerebral. Em primeiro lugar, apesar de ambos os coeficientes de espalhamento dependerem do  $\lambda$  de acordo com a mesma lei (Eq. (6)), a sua forma é distinta. No caso do  $\mu_s$  verifica-se um decaimento mais suave com o crescimento de  $\lambda$  do que o que é apresentado para  $\mu'_s$ . Lembrando que ambos os coeficientes estão relacionados através de  $g$  (Eq. (6)), a diferença entre as dependências no  $\lambda$  observadas para os dois coeficientes mostra que a direccionalidade do espalhamento varia fortemente para  $\lambda$ s abaixo de 350 nm, ou seja, na zona espectral onde a absorção é forte (ver Figura 9). Por outro lado, os dois coeficientes tendem a tomar o mesmo valor nas proximidades dos 200 nm. Tal concordância entre  $\mu_s$  e  $\mu'_s$  nos baixos  $\lambda$ s já foi observada para outros tecidos [35, 52], sejam tecidos saudáveis ou com patologia [5].

Podemos concluir que este resultado mostra que para  $\lambda_s$  na ordem dos 200 nm, o espalhamento da luz nos tecidos biológicos é isotrópico.

Uma forma de visualizar diretamente tal isotropia do espalhamento da luz perto dos 200 nm será pela representação do espectro de  $g$ . Seguindo o procedimento descrito na secção 3.4, utilizando os 10 espectros calculados para  $\mu_s$  e os 10 espectros estimados para  $\mu'_s$  na Eq. (6), foram calculados 10 espectros para  $g$  do córtex cerebral do coelho. A Figura 12 apresenta o espectro médio e o DP espectral de  $g$  para o córtex resultantes deste cálculo.

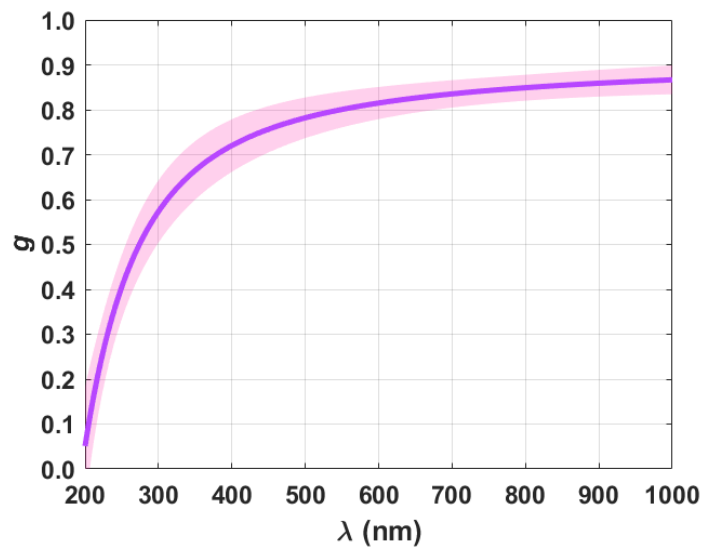


Figura 12. Espectro médio da  $g$  do córtex cerebral de coelho.

Tal como mostra o gráfico representado na Figura 12, no caso do córtex,  $g$  cresce desde valores muito baixos a 200 nm até valores na ordem de 0,9 a 1000 nm. Este comportamento foi previsto por Steven Jacques em 2013 [36], tendo sido depois comprovado por diferentes técnicas experimentais e de cálculo para vários tecidos [5, 35, 48, 50, 52]. Observando a Figura 12, embora  $g$  não seja exatamente nulo a 200 nm, verifica-se que se aproxima bastante desse valor, a menos do DP apresentado nessa zona do espectro. Tal resultado mostra que para esta gama de  $\lambda_s$ , a luz é espalhada isotropicamente, ou muito próximo disso, podendo utilizar-se esta característica do córtex para o desenvolvimento ou implementação de aplicações de diagnóstico ou de tratamento.

Para concluir a determinação das propriedades óticas espectrais do córtex cerebral, falta apresentar o espectro da  $\delta$ . Tal como foi descrito na secção 3.4, esta propriedade é calculada a partir do  $\mu_a$  e do  $\mu'_s$ , usando duas equações distintas, a Eq. (2)

ou a Eq. (3), conforme a absorção é baixa ou elevada [38]. Assim, após análise do espectro do  $\mu_a$ , apresentado na Figura 9, o valor de 600 nm foi considerado como o  $\lambda$  de transição entre as zonas de elevada absorção (entre 200 e 600 nm) e de baixa absorção (entre 600 e 1000 nm). Considerando os 10 espectros do  $\mu_a$  e os 10 espectros do  $\mu'_s$ , calcularam-se os espectros da  $\delta$  entre 200 e 600 nm com a Eq. (3) e repetiu-se este processo de cálculo entre 600 e 1000 nm com a Eq. (2). A Figura 13 apresenta o espectro médio e o DP espectral de  $\delta$  para o córtex resultantes deste cálculo.

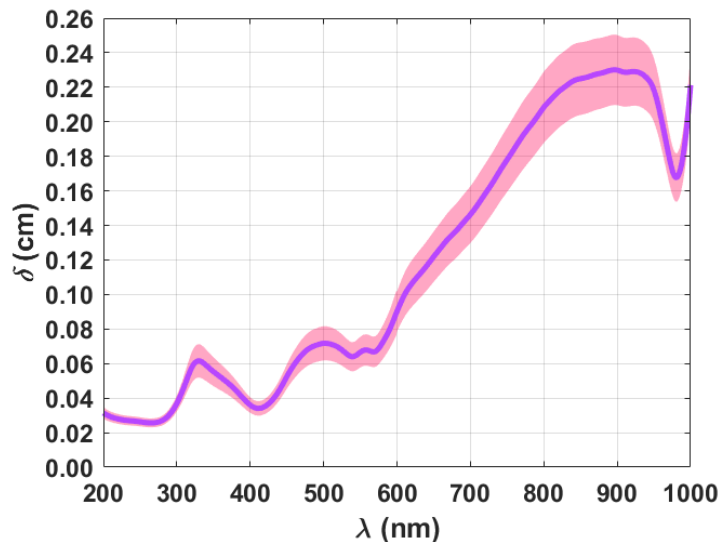


Figura 13. Espectro médio da  $\delta$  do córtex cerebral de coelho.

Tal como foi já demonstrado para outros tecidos biológicos [4, 5, 52], a  $\delta$  do córtex cerebral apresenta valores crescentes com o aumento do  $\lambda$ , sem perder as características de absorção dos seus componentes biológicos. No caso do córtex pode ver-se no espectro representado na Figura 13 a presença das bandas de absorção da hemoglobina centradas a 411 nm, a 540 nm e a 570 nm e da água centrada a 980 nm [23], que nesta representação é a banda de absorção que aparenta ter maior amplitude. De forma pouco evidente na Figura 13, há que considerar também neste espectro as bandas de absorção das proteínas (a 230 nm) do ADN (a 260 nm) e da hemoglobina (a 274 nm) [23], que por se sobreporem entre si levam a que  $\delta$  apresente um comportamento quase linear e quase horizontal para  $\lambda$ s inferiores a 280 nm. Estas bandas são na realidade as de maior amplitude, tal como foi demonstrado pelo espectro de  $\mu_a$  na Figura 9. Tal como mostra o espectro da Figura 13, apesar de se conseguirem maiores profundidades de penetração da luz para a zona do

infravermelho ( $750 \text{ nm} < \lambda < 980 \text{ nm}$ ), na realidade não se conseguem valores significativos, pois o valor máximo observado é de 2.3 mm nas proximidades de 900 nm.

Esta baixa profundidade de penetração da luz consiste numa forte limitação à aplicação da luz em procedimentos de diagnóstico e de tratamento nos tecidos biológicos. No entanto, tal penetração da luz pode ser melhorada com recurso à aplicação de tratamentos de transparência por imersão dos tecidos em agentes de transparência inócuos, como a glicerina ou a glucose [77]. O estudo dos efeitos de transparência em tecidos biológicos tem sido alvo de intensa investigação nos últimos 20 anos e vários estudos tem demonstrado que é possível aumentar a transparência e a  $\delta$  dos tecidos de forma muito significativa em todo o espectro da luz, desde o UV até ao infravermelho [4, 78, 79]. Embora nos objetivos do presente trabalho não estivessem incluídos estudos de transparência para o córtex cerebral, será de grande interesse realizar no futuro tais estudos com tecidos cerebrais, uma vez que em outros tecidos se tem observado variados resultados positivos, quer para aplicação em imagiologia [39, 77, 80], quer para a determinação de parâmetros fisiológicos diferenciadores de doenças [6, 61, 81-87], ou para caracterizar a difusão de agentes químicos ou medicamentos em tecidos biológicos [4, 57, 81, 83, 88-90]. Na realidade, alguns trabalhos recentes mostraram que certos agentes de contraste radiológico, como o Gadovist<sup>TM</sup>, o Magnevist<sup>TM</sup>, o Dotarem<sup>TM</sup> ou o Visipaque<sup>TM</sup> são capazes de criar transparência em tecidos biológicos [91, 92]. A sua aplicação em determinados tecidos pode ter um caráter multimodal, uma vez que aumentam o contraste nas imagens de diagnóstico e aumentam a  $\delta$ , permitindo assim adquirir tais imagens radiológicas ou óticas de profundidades mais elevadas dentro dos tecidos.

Após a determinação dos espectros das propriedades óticas fundamentais para a caracterização do córtex cerebral, é agora possível realizar uma análise mais detalhada do espectro do  $\mu_a$  para recolher informação fisiológica adicional que esteja associada ao desenvolvimento de doenças neurológicas. Tal espectro, que se encontra representado na Figura 9, apresenta uma linha de base decrescente com o aumento de  $\lambda$ . Este comportamento da linha de base do  $\mu_a$  foi anteriormente identificado como indicador da presença de melanina e de lipofuscina noutros tecidos biológicos [4, 5, 48, 50, 88]. No caso do pâncreas, foi verificado que uma acumulação destes dois pigmentos em proporções muito semelhantes estava associada ao processo de envelhecimento [4, 52], enquanto que uma acumulação diferenciada destes pigmentos em tecidos normais e com cancro de rim foi associada ao desenvolvimento desta patologia [4, 5]. Desta forma, será

de grande importância tentar ver que informação dá o conteúdo de tais pigmentos no córtex do cérebro.

Antes de se passar a essa análise do conteúdo de melanina e de lipofuscina no córtex cerebral, e uma vez que não é desejável realizar biópsias de tecidos cerebrais, será apresentado na secção 4.4 o estudo de reconstrução do espectro do  $\mu_a$  do córtex a partir de espectros de  $R_d$ , com recurso a técnicas de ML. Depois de apresentados esses resultados, será feita na secção 4.5 a análise do conteúdo de melanina e de lipofuscina, assim como do ADN/ARN e da hemoglobina no córtex cerebral e interpretação desses resultados, para verificar se há informação de interesse para o diagnóstico de patologias.

#### **4.4.Reconstrução do espectro do $\mu_a$ do córtex cerebral por ML**

Tal como foi descrito na secção 3.5, foram medidos 10 espectros de  $R_d$  para estimar os espectros do  $\mu_a$  do córtex cerebral do coelho com recurso a técnicas de ML. Os 10 espectros de  $R_d$  medidos deram origem ao espectro médio que se encontra representado na Figura 8(d) e os 10 espectros do  $\mu_a$  que foram calculados deram origem ao espectro médio que se encontra representado na Figura 9. De acordo com a descrição apresentada na secção 3.5, apesar dessas representações mostrarem apenas o espectro médio e o respetivo DP espectral que resultam de medições experimentais, nesta reconstrução do espectro do  $\mu_a$  que aqui será feita foram usados não só 10 espectros de cada (de  $R_d$  e de  $\mu_a$ ), como outros gerados digitalmente.

O procedimento de geração dos espectros digitais foi o primeiro a ser executado neste estudo, tendo-se ajustado e otimizado os modelos das GANs para gerar tanto os espectros de  $R_d$  como os de  $\mu_a$  que posteriormente foram usados no processo de treino e de validação dos algoritmos de ML. A Figura 14 apresenta tais espectros digitalmente gerados, juntamente com os espectros experimentais, ou calculados de medições experimentais, para comparação.

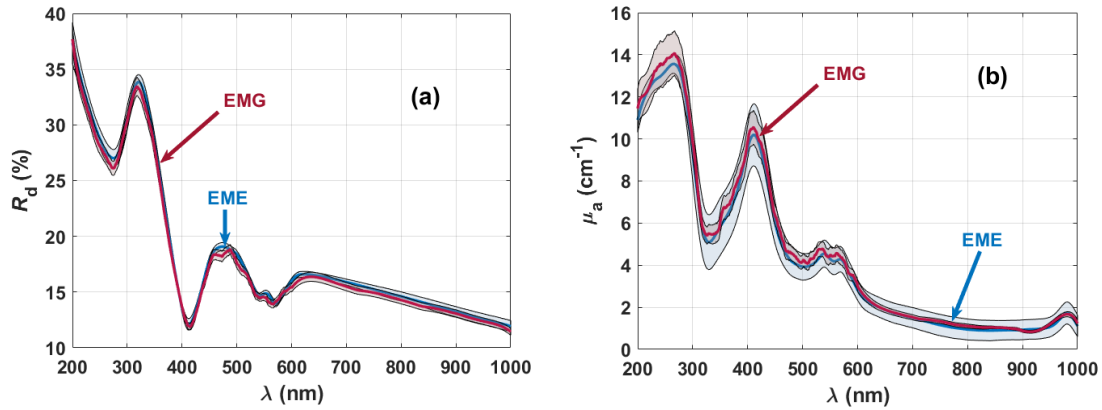


Figura 14. Espectro médio experimental (EME) e espectro médio gerado (EMG) de  $R_d$  (a) e de  $\mu_a$  (b) do córtex cerebral de coelho.

Conforme pode verificar-se pelos espectros representados na Figura 14, para alguns  $\lambda$ s observam-se certas discrepâncias de pequena magnitude entre o EME e o EMG. Se desprezarmos estas pequenas discrepâncias locais, a amplitude e a dependência no  $\lambda$  para os espectros gerados são muito semelhantes aos observados nos espectros experimentais de  $R_d$  e nos espectros de  $\mu_a$  que foram calculados diretamente a partir dos espectros experimentais de  $T_t$  e de  $R_t$ .

Após este treino e ajuste dos modelos das GANs, estes foram usados para gerar novos grupos de 10, de 50 e de 100 espectros artificiais. Tais grupos de espectros foram usados no treino dos algoritmos de ML para recriar espectros de  $\mu_a$  a partir dos espectros de  $R_d$ , tal como descrito na secção 3.5. Este treino foi executado de quatro formas [61]:

- Na primeira usaram-se apenas os 10 espectros experimentais com o método Leave-One-Out (LOO),
- Na segunda usaram-se 10 espectros experimentais e 10 espectros gerados digitalmente,
- Na terceira usaram-se 10 espectros experimentais e 50 espectros gerados digitalmente,
- Na quarta usaram-se 10 espectros experimentais e 100 espectros gerados digitalmente.

Ao realizarem-se estas quatro formas de treino, esperava-se conseguir identificar tanto as características de sobre ajuste, como as de ajuste insuficiente dos algoritmos de ML, assim como verificar se o aumento de amostras digitalmente geradas impede a

ocorrência de sobre ajuste. Estes quatro testes foram realizados com todos os algoritmos de ML.

O primeiro algoritmo de ML que foi usado para recriar espectros de  $\mu_a$  a partir dos espectros de  $R_d$  foi o *Single Layer Perceptron* (SLP). O segundo foi o *K-nearest neighbors* (KNN) e o terceiro foi o *Random forest regressor* (RFR). De acordo com o procedimento descrito na secção 3.5, em todas as estimações com cada algoritmo usando o método AT, os espectros gerados pelas GANs foram combinados com os espectros experimentais, sendo que 80% do total de espectros foram usados no processo de treino e os restantes 20% foram usados no processo de validação do algoritmo. É importante indicar que o fazer esta distribuição de espectros, foram incluídos espectros experimentais tanto no processo de treino como no processo de validação dos três algoritmos com o método AT. Para avaliar qual dos algoritmos gerava os melhores espectros de  $\mu_a$ , a Eq. (26) foi usada para calcular a DE como uma medida da performance do algoritmo. A Figura 15 mostra os resultados destes cálculos para quatro casos, de acordo com o número de espectros gerados pelas GANs nas estimações: nenhum, 10, 50 e 100.

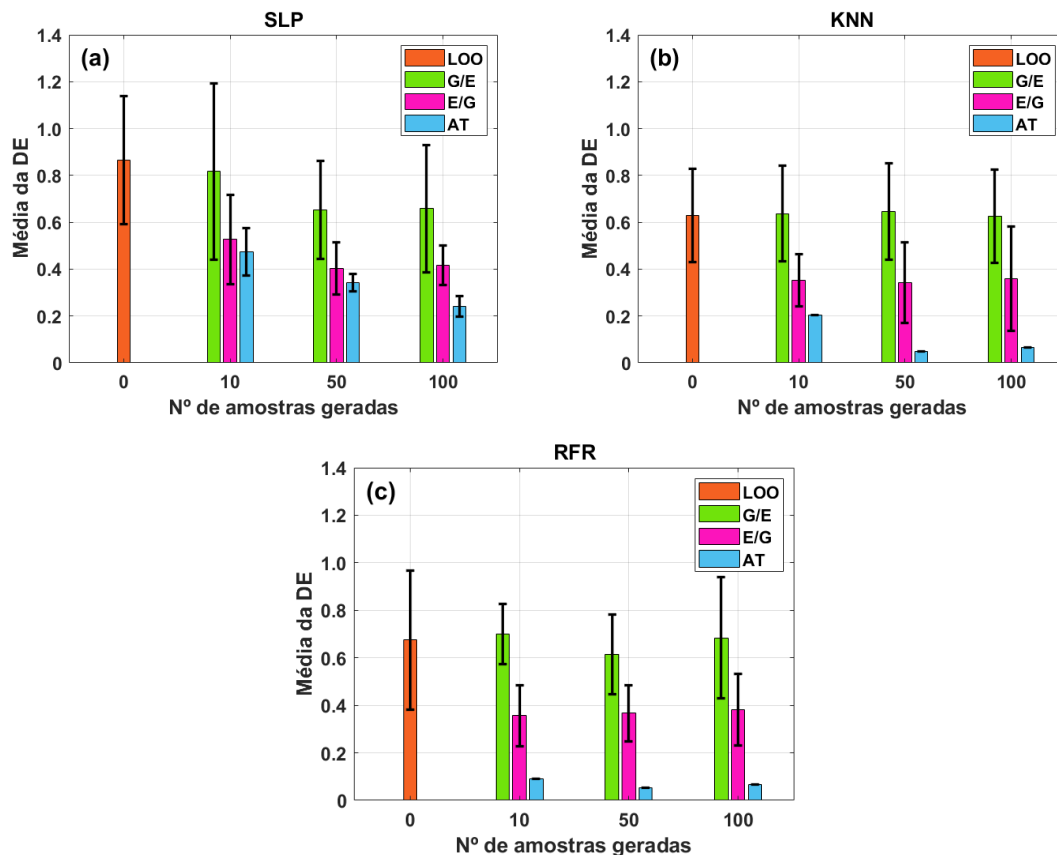


Figura 15. DE calculada para os modelos: SLP (a), KNN (b) e RFR (c).

Analisando os gráficos na Figura 15, pode recolher-se informação diversa. Em primeiro lugar, a DE obtida para o método LOO apresenta um valor elevado para todos os algoritmos, indicando que a utilização de apenas 10 espectros experimentais leva a estimações enganadoras.

Considerando o algoritmo SLP, verifica-se que o método G/E apresenta valores semelhantes entre o método LOO e o método em que se usou 10 espectros gerados. Ao passar para um número de 50 espectros gerados, consegue-se uma diminuição do valor médio da DE, mas se aumentar o número de amostras geradas para 100 não se consegue diminuir mais. Passando agora ao método E/G, quando 10 espectros gerados são usados no processo de treino, verificamos um decréscimo significativo da DE, quando comparada com a obtida pelo método do LOO. Passando ao caso em que se usaram 50 espectros gerados, consegue-se um decréscimo adicional da DE. No entanto, aumentando o número de espectros gerados para 100 não se verificam variações significativas mais uma vez. O método AT é aquele que apresenta um decréscimo contínuo da DE com o aumento de espectros gerados no caso do algoritmo SLP. No entanto, comparando entre os diferentes algoritmos usados, o SLP é o que apresenta valores de DP mais elevados.

No caso do algoritmo KNN, o valor médio da DE obtido pelo método G/E permanece praticamente igual em todos os casos estudados ao obtido pelo método LOO. Esta invariância significa que este método não apresenta melhoramento de performance na recriação dos espectros de  $\mu_a$  com o aumento do número de espectros gerados artificialmente. No caso do método E/G, foram obtidas variações semelhantes às observadas com o algoritmo SLP, mas agora com maiores valores de DP. Mais uma vez, não se observa melhoramento de performance deste método com o aumento do número de espectros gerados artificialmente. No caso do método AT, observam-se os maiores decréscimos para o valor médio da DE entre os casos estudados com o algoritmo KNN. Neste estudo, os casos em que se usaram 50 ou 100 espectros gerados artificialmente, são os que apresentam valores muito baixos, tanto para o valor médio da DE, como para o DP. No entanto, embora estes valores sejam baixos, o valor médio da DE observado para o estudo com 10 espectros gerados é ainda comparativamente elevado.

Passando ao estudo com o algoritmo RFR, observam-se variações para o valor médio da DE que são comparáveis às que foram obtidas no estudo com o algoritmo KNN. Considerando a magnitude do DP, e com a exceção da estimação pelo método G/E com 100 espectros gerados artificialmente, observam-se valores menores do que os observados com os outros algoritmos. No estudo com o método G/E, o valor médio da

DE permanece quase inalterado entre estudos com diferentes números de espectros gerados artificialmente, e muito semelhante ao obtido com o método LOO. O valor médio da DE obtido com o método E/G decresce para cerca de metade do obtido com o método LOO, quando o número de espectros gerados artificialmente é 10, mas mantém-se inalterado para números superiores de espectros gerados artificialmente. No estudo com o método AT, observam-se os melhores resultados, uma vez que em todos os casos estudados com o algoritmo RFR, se observa um decréscimo significativo, obtendo-se valores médios da DE sempre abaixo de 0.1.

Uma avaliação global dos resultados apresentados na Figura 15 mostra que o algoritmo RFR é o que apresenta os melhores resultados de performance. Não só se verifica o maior decréscimo do valor médio da DE para o método AT, mas todos os métodos de estimação testados com este algoritmo apresentam os menores valores do DP. Considerando estes resultados, serão apresentados nas próximas quatro figuras todos os espectros médios estimados (EMEs) de  $\mu_a$  que foram obtidos através do algoritmo RFR para comparar com o espectro médio experimental (EMEx) de  $\mu_a$ , que resulta de cálculos diretos a partir das medições experimentais (representado na Figura 9). Esta comparação entre os EMEs e o EMEx é feita pelo método LOO na Figura 16, pelo método com 10 espectros gerados artificialmente na Figura 17, pelo método com 50 espectros gerados artificialmente na Figura 18 e pelo método com 100 espectros gerados artificialmente na Figura 19.

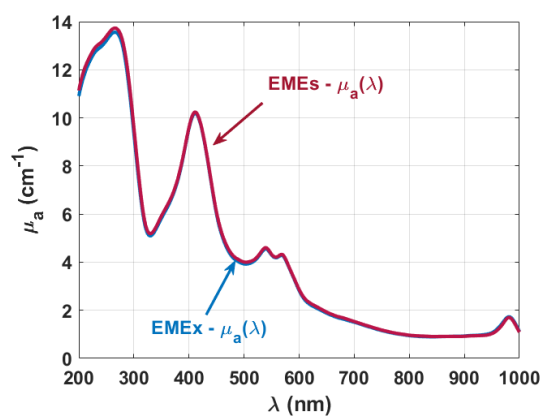


Figura 16. Comparação entre o EMEx e o EMEs de  $\mu_a$  que resulta da estimação com o método LOO.

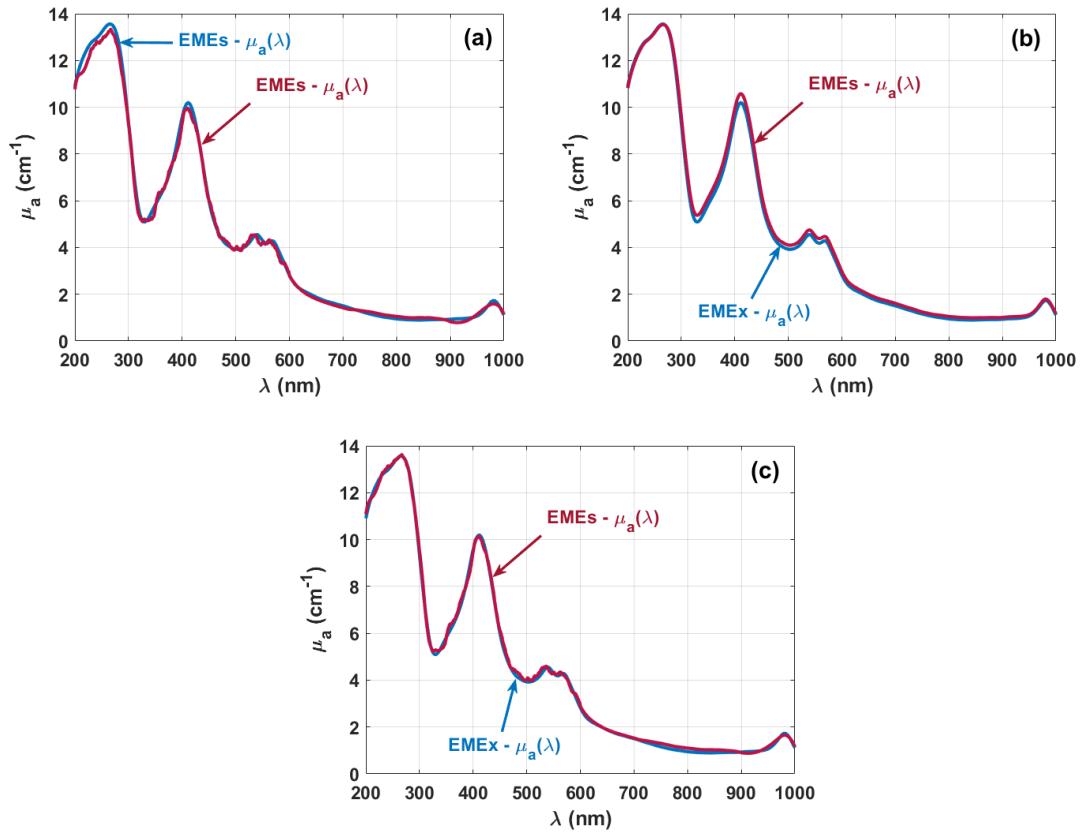


Figura 17. Comparação entre o EMEx e o EMEs do  $\mu_a$  que resulta das estimções com 10 espectros gerados artificialmente: 10-G/E (a), 10-E/G (b) e 10-AT (c).

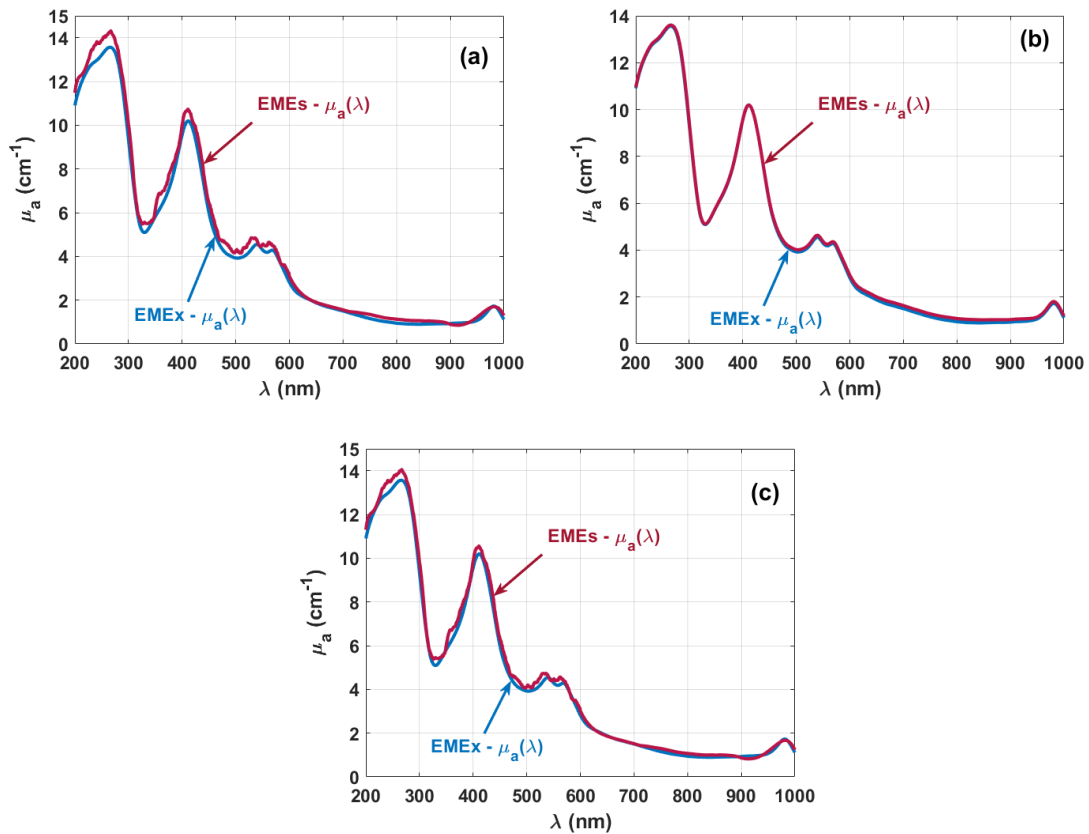


Figura 18. Comparação entre o EMEx e o EMEs do  $\mu_a$  que resulta das estimações com 50 espectros gerados artificialmente: 50-G/E (a), 50-E/G (b) e 50-AT (c).

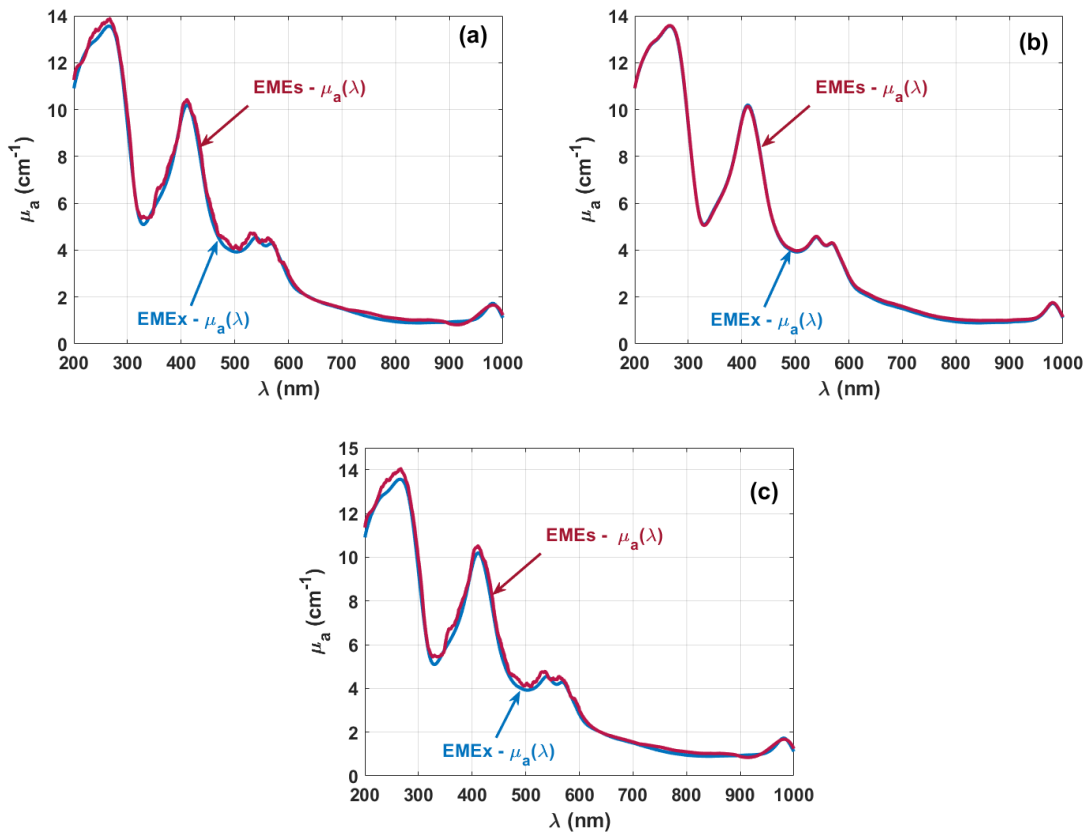


Figura 19. Comparação entre o EMEx e o EMEs do  $\mu_a$  que resulta das estimações com 100 espectros gerados artificialmente: 100-G/E (a), 100-E/G (b) e 100-AT (c).

Comparando entre os EMEs e os EMEx nas várias representações das figuras anteriores, verifica-se que em geral são todos muito próximos, apresentando os mesmos níveis de  $\mu_a$  em toda a banda do espectro representado, dependências no  $\lambda$  semelhantes e mostrando as mesmas bandas de absorção. A melhor concordância entre o EMEs e o EMEx foi obtida com o método LOO (Figura 16), mas tal concordância é enganadora, como já referimos, uma vez que foi usado um número reduzido de espectros experimentais tanto no processo de treino como no processo de validação do algoritmo RFR para obter o EMEs. Outros casos que, apesar das discrepâncias locais nos EMEs já mencionadas, apresentam boa concordância com o EMEx, seja na amplitude, na dependência em  $\lambda$ , como na suavização, são os que foram obtidos com o método E/G (ver Figuras 17(b), 18(b) e 19(b)). Embora estas estimações sejam apenas superadas pela que foi feita com o método LOO, mais uma vez estes resultados, aparentemente bons, são novamente enganadores. Uma vez que os espectros experimentais foram usados no

processo de treino e os espectros gerados artificialmente foram usados no processo de validação, este não é um procedimento fiável do ponto de vista do ML [61]. Mesmo assim, a análise dos gráficos correspondentes nas figuras anteriores mostra que este método também melhora com o aumento do número de espectros gerados artificialmente que são usados no processo de validação.

Quando analisamos os EMEs gerados pelo método G/E (ver Figuras 17(a), 18(a) e 19(a)), verifica-se que ocorre uma perda de suavização nos espectros gerados. No entanto, apesar desse facto, os EMEs gerados pelo método G/E apresentam também uma boa concordância com os EMEx em termos de magnitude, de dependência em  $\lambda$  e de localização das bandas de absorção. Comparando entre os três casos de EMEs pelo método G/E, verifica-se que o caso pior ocorre quando 50 espectros estimados pelas GANs foram usados na estimação do EMEs. Tal resultado mostra que se estivesse disponível um elevado número de espectros experimentais para a estimação de espectros com as GANs, poderia obter-se uma performance melhor com este método. No caso dos EMEs que foram obtidos com o método AT também se verifica uma perda de suavização (ver Figuras 17(c), 18(c) e 19(c)), mas tais EMEs são mais aproximados ao EMEx, tal como indicado pelos baixos valores da ED no gráfico da Figura 15(c). Mais uma vez, os resultados obtidos pelo método AT mostram a necessidade de mais espectros experimentais para melhorar tanto a qualidade dos espectros gerados artificialmente com as GANs, como a performance dos algoritmos utilizados para recriar  $\mu_a(\lambda)$  a partir dos  $R_d(\lambda)$  medidos. Se o aumento de espectros experimentais fosse possível, os resultados apresentados nas figuras anteriores apresentariam maior suavidade espectral, que aparentemente é a maior falha nas estimações com os métodos G/E e AT. Apesar das deficiências apontadas nos EMEs obtidos pelos vários métodos, podemos dizer que apesar da limitação de um baixo número de espectros experimentais disponíveis, todos os casos de estimação estudados apresentam resultados aceitáveis.

Como tarefa final deste trabalho, a próxima secção é dedicada à avaliação do conteúdo de pigmentos, de sangue e de ADN/ARN nos tecidos do cérebro e respetiva interpretação desses conteúdos.

#### **4.5. Análise conteúdo de pigmentos no córtex cerebral**

Depois de todas as propriedades óticas espectrais terem sido calculadas e de se ter feito uma análise à possibilidade de utilizar técnicas de ML para reconstruir  $\mu_a(\lambda)$  a partir

de espectros de  $R_d$ , vamos agora analisar o espectro de absorção para quantificar o conteúdo de pigmentos, de sangue e de ADN/ARN no córtex cerebral do coelho. Tal análise será feita, quer para o espectro de  $\mu_a$  obtido por cálculo direto, como para os espectros de  $\mu_a$  que resultam das melhores estimações feitas com as técnicas de ML. Neste caso, serão considerados para análise do conteúdo de componente biológicos os EMEs obtidos pelos métodos que deram melhor performance com o algoritmo RFR. O objetivo nesta fase do trabalho consiste em avaliar se os EMEs obtidos com as técnicas de ML permitem obter os mesmos resultados para o conteúdo de pigmentos, de sangue e de ADN/ARN que o EMEx de  $\mu_a$  que resulta de cálculos diretos.

Tal como foi escrito na análise da Figura 9, o espectro médio de  $\mu_a$  que foi calculado diretamente de medições experimentais para o córtex apresenta uma linha de base decrescente com o aumento de  $\lambda$ . A ocorrência de tal linha de base é evidência da presença de pigmentos, tal como observado para outros tecidos [4, 5, 48]. Tais pigmentos são a melanina e a lipofuscina [75, 76], que apresentam um espectro de absorção mais forte na zona do UV, mas que cobre toda a banda de  $\lambda$ s considerada no presente estudo. Recolhendo dados gráficos publicados na literatura [75, 76], foram reconstruídos por interpolação os espectros de absorção da melanina e da lipofuscina, que aqui se reproduzem na Figura 20.

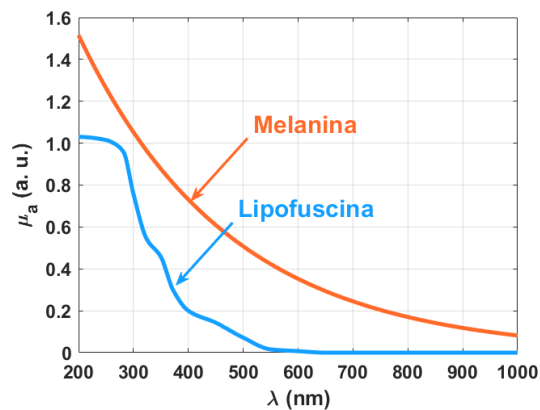


Figura 20. Espectros de absorção da melanina e da lipofuscina.

Analisando os dois espectros de absorção representados na Figura 20 verificamos que no caso da melanina o espectro é suave em toda a extensão, mas tal comportamento não se verifica para o espectro da lipofuscina. Assim, sem estabelecer qualquer equação matemática para descrever os dois espectros representados na Figura 20, utilizaram-se nos cálculos seguintes os dados numéricos de cada espectro representado. Ambos os

espectros representados na Figura 20 tem uma resolução de 1 nm e para os cálculos a realizar, designou-se o espectro da melanina por  $M(\lambda)$  e o da lipofuscina por  $L(\lambda)$ . Fazendo tentativas de combinação de  $M(\lambda)$  com  $L(\lambda)$  para reconstruir a linha de base presente na Figura 9, verificou-se que a combinação ótima era descrita pela Eq. (27) [50]:

$$\mu_{a-pigmentos}(\lambda) = 3.5 \times M(\lambda) + 1.9 \times L(\lambda), \quad (27)$$

em que  $\mu_{a-pigmentos}(\lambda)$  representa a linha de base no espectro de  $\mu_a$  do córtex, ou seja, a contribuição combinada das absorções da melanina e da lipofuscina no espectro de absorção do córtex.

Subtraindo a linha de base descrita pela Eq. (27) ao espectro de  $\mu_a$  do córtex da Figura 9, obteve-se uma linha de base horizontal como era de esperar se não existissem pigmentos. A Figura 21 apresenta o espectro de  $\mu_a$  do córtex, antes e depois de subtraída a linha de base, assim como o espectro de absorção dos pigmentos, descrito pela Eq. (27).

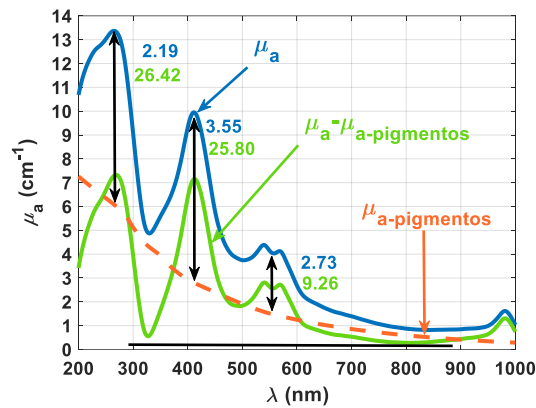


Figura 20. Espectros de absorção do córtex cerebral de coelho, antes (azul) e depois (verde) de subtraída a absorção dos pigmentos (laranja).

Ao subtrair a linha de base que foi construída a partir dos espectros de absorção da melanina e da lipofuscina, começamos por verificar que o espectro de  $\mu_a$  do córtex passa a ter uma linha de base horizontal, como é habitual se não existirem pigmentos no tecido [24, 26, 29, 32, 33]. Ao otimizar a construção da linha de base a subtrair ao  $\mu_a(\lambda)$  do córtex, verificamos que o fator multiplicativo da melanina na Eq. (27) é superior ao da lipofuscina (quase o dobro). Dado que o espectro de absorção de qualquer material heterogéneo é uma soma ponderada dos espectros de absorção elementares dos seus componentes [2], estes fatores multiplicativos são medidas diretas do conteúdo de cada

um dos pigmentos no córtex cerebral. Um estudo recente com pâncreas de coelho mostrou, que devido ao processo de envelhecimento dos tecidos, a acumulação de melanina e de lipofuscina ocorre na mesma proporção, ou muito perto disso [50]. Ao verificar uma acumulação de melanina no córtex, que é quase o dobro da acumulação de lipofuscina, tentamos procurar uma explicação. De acordo com Double et al. [67], tanto a melanina como a lipofuscina são produzidos nos tecidos cerebrais e aí se acumulam a um ritmo lento desde os primeiros anos de vida. Segundo o estudo de Moreno-García et al. [68], verifica-se no cérebro humano que os neurónios catecolaminérgicos são caracterizados pela acumulação de melanina devido ao envelhecimento. De acordo com estes autores, a melanina e outros produtos, como componentes celulares e lípidos, são libertados por estes neurónios quando entram num processo degenerativo. Outros autores reportaram que tal degeneração de neurónios e consequente morte destas células cerebrais está na base da ocorrência das doenças de Alzheimer, Parkinson e de derrames cerebrais [66]. Estas evidências literárias mostram que ao detetarmos quase o dobro de melanina em relação à lipofuscina no córtex cerebral do coelho estamos perante animais onde não só o envelhecimento do cérebro ocorreu, mas também a degeneração de neurónios.

Para além da análise ao conteúdo de pigmentos, e após a subtração do contributo de absorção destes no cérebro, podemos agora fazer uma análise ao conteúdo de ADN/ARN e de sangue no córtex do cérebro. Conforme descrito em estudos anteriores [48, 52], o conteúdo de um determinado componente num tecido é feito pelo cálculo da razão entre o valor de  $\mu_a$  do pico de absorção na banda desse componente e a linha de base do espectro de absorção do tecido. Desta forma, considerando as bandas de absorção do ADN/ARN (260 nm, mas deslocada para 267 nm devido à banda da hemoglobina a 274 nm) e da hemoglobina (411 nm e 540/570 nm), foram calculadas as razões para estes dois componentes no córtex, antes (valores numéricos a azul na Figura 21) e depois (valores numéricos a verde na Figura 21) de eliminada a absorção dos pigmentos. No caso do cálculo dos números representados a azul, a linha de base é a linha descrita pela Eq. (27) que está representada na Figura 21 como uma linha tracejada a laranja. No caso dos números representados a verde, a linha de base é a linha horizontal representada a preto na Figura 21. Por outro lado, para o caso da hemoglobina, como as bandas Q (540/570 nm) são habitualmente consideradas como uma banda dupla, calculou-se apenas o valor da razão para o  $\lambda$  intermédio – 555 nm.

Comparando entre os valores das razões calculadas e que estão representados na Figura 21 a azul e a verde, verificamos que com a eliminação da absorção dos pigmentos

no espectro de  $\mu_a$  do córtex, ocorre um crescimento muito significativo em todas as razões calculadas para as diferentes bandas de absorção. Este crescimento mostra que a absorção combinada da melanina e da lipofuscina estava a camuflar o real conteúdo de ADN/ARN e de sangue nos tecidos do córtex. Como exemplo desta camuflagem podemos verificar que antes da eliminação da absorção da melanina e da lipofuscina, a banda de Soret da hemoglobina (411 nm) apresentava uma razão superior à obtida para o ADN/ARN (267 nm). Após subtrair a absorção dos pigmentos verificamos que a razão calculada para a banda do ADN/ARN é superior à que foi calculada para a banda de Soret [48, 50, 52], tal como seria de esperar.

Depois de terminada esta análise sobre os conteúdos de ADN/ARN e de hemoglobina no córtex a partir do espectro de  $\mu_a$  que foi calculado diretamente dos espectros medidos experimentalmente, vamos agora fazer uma análise semelhante, mas baseada nos espectros de  $\mu_a$  do córtex que foram gerados por ML. Tal análise será feita para verificar se os espectros de  $\mu_a$  do córtex criados por ML com o algoritmo RFR mostram conteúdos de ADN/ARN e de hemoglobina aceitáveis [61], depois de subtraída a absorção dos pigmentos de cada um dos espectros médios de  $\mu_a$  gerados. Para avaliar a qualidade dos resultados a obter nesta fase final, serão considerados como referência os valores apresentados na Figura 21 para as razões obtidas para as bandas de absorção do ADN/ARN e da hemoglobina que resultam dos cálculos diretos das medições experimentais.

O primeiro passo desta análise comparativa final consistiu em subtrair a linha de base dos espectros médios de  $\mu_a$  que foram gerados pelo algoritmo RFR com os diferentes métodos que apresentaram a melhor performance. Tais métodos foram o AT com 10, o AT com 50 e o AT com 100 espectros gerados digitalmente pelas GANs. Nesta análise iremos também considerar o espectro médio que foi gerado pelo método LOO, de forma a avaliar a capacidade deste algoritmo em gerar informação fisiológica com um número reduzido de espectros experimentais. Em todos estes casos, a linha de base a subtrair a cada um dos espectros médios consiste numa combinação dos espectros de absorção da melanina e da lipofuscina, tal como descrito pela Eq. (27), mas em que os fatores multiplicativos de  $M(\lambda)$  e de  $L(\lambda)$  são ajustados a cada caso particular. A utilização de novos fatores multiplicativos prende-se com o objetivo de que a linha de base horizontal resultante da subtração da absorção dos pigmentos seja semelhante à que foi obtida na Figura 21. De forma a comparar entre os resultados obtidos por cálculo direto (Figura 21) e os obtidos com o algoritmo RFR pelos métodos LOO, 10-AT, 50-AT e 100-AT, que

foram os que apresentaram melhor performance, a Figura 22 representa os espectros de  $\mu_a$  do córtex antes e depois de subtraída a contribuição dos pigmentos nos cinco casos.

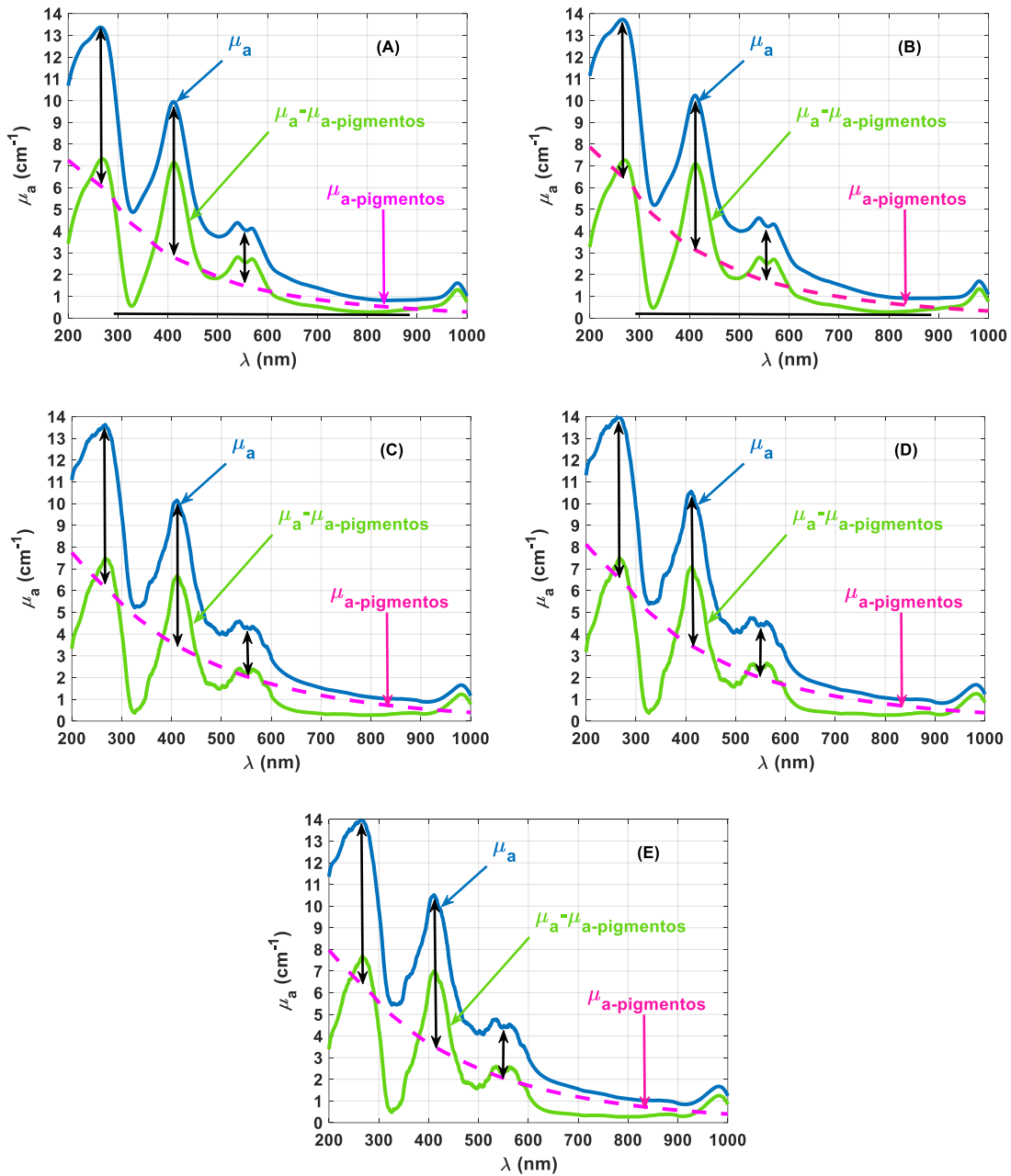


Figura 21. Espectros de  $\mu_a$  para a combinação da melanina e da lipofuscina (rosa) e para o córtex cerebral de coelho, antes (azul) e depois (verde) de subtraída a absorção dos pigmentos. Resultados obtidos por: cálculos diretos (A), RFR-LOO (B), RFR com 10-AT (C), RFR com 50-AT (D) e RFR com 100-AT (E).

Comparando entre os vários gráficos apresentados na Figura 22, verifica-se que o espectro de  $\mu_a$  inicial do córtex que resulta de cálculos diretos (espectro azul na Figura 22(A)) e o correspondente que foi gerado pelo método LOO são muito semelhantes.

Relativamente aos espectros de  $\mu_a$  iniciais do córtex gerados pelos três métodos AT, não se verifica tanta semelhança com o que foi obtido por cálculos diretos, uma vez que não apresentam suavidade. Por outro lado, em termos de amplitude, todos os gráficos gerados pelo algoritmo RFR apresentam diferenças em relação ao que foi obtido por cálculos diretos. Como exemplo deste tipo de diferença, no caso do espectro inicial obtido pelo método LOO, a banda de Soret (411 nm) apresenta um pico mais elevado do que no caso do espectro obtido por cálculos diretos. Diferenças de amplitude nos picos a 267 nm e a 411 nm podem também ser observadas entre o espectro inicial obtido por cálculos diretos e os espectros iniciais obtidos pelos restantes métodos AT.

Dada a forma aproximadamente exponencial decrescente da linha de base que todos os espectros iniciais apresentam nos diferentes gráficos da Figura 22, verificamos que há conteúdo de pigmentos em todos os espectros que foram gerados pelo algoritmo RFR. Desta forma, o próximo passo foi construir essa linha de base de forma otimizada a partir de  $M(\lambda)$  e de  $L(\lambda)$ , tal como foi feito para o espectro de  $\mu_a$  obtido por cálculos diretos. Tal construção da linha de base foi feita para cada caso estudado ajustando novos fatores multiplicativos de  $M(\lambda)$  e de  $L(\lambda)$  na Eq. (27) para otimizar a linha de base. A Tabela 2 apresenta as diferentes combinações que foram obtidas para se construir a linha de base ótima em cada caso.

Tabela 2. Combinações das absorções de melanina e de lipofuscina usadas nos vários métodos com o algoritmo RFR para obter o  $\mu_a(\lambda)$  corrigido para o córtex cerebral.

<b>Método</b>	<b>Conteúdo de pigmentos</b>
Cálculo direto	$3,50 \times M(\lambda) + 1,90 \times L(\lambda)$
RFR - LOO	$4,04 \times M(\lambda) + 1,70 \times L(\lambda)$
RFR – 10AT	$4,84 \times M(\lambda) + 0,40 \times L(\lambda)$
RFR – 50AT	$4,68 \times M(\lambda) + 1,00 \times L(\lambda)$
RFR – 100AT	$4,85 \times M(\lambda) + 0,60 \times L(\lambda)$

Conforme podemos observar as diferentes combinações apresentadas na Tabela 2, para todos os casos gerados pelo algoritmo RFR, implicam conteúdos de melanina superiores ao conteúdo obtido no caso dos cálculos diretos. Por outro lado, o aumento do conteúdo de melanina está associado a um decréscimo do conteúdo de lipofuscina. É

importante salientar que apesar de os tecidos usados para recolher os espectros de  $R_d$  usados na estimação do  $\mu_a(\lambda)$  do córtex pelo algoritmo RFR não serem os mesmos que foram usados para obter esse espectro por cálculos diretos, todos os tecidos são provenientes de animais da mesma espécie e raça e com idades muito próximas. Assim, as diferenças presentes na Tabela 2 entre os fatores numéricos que quantificam o conteúdo de melanina e de lipofuscina no córtex, entre o cálculo direto e os estimados pelo algoritmo RFR estão relacionadas com o número reduzido de espectros que foram usados nas estimações e consequentes limitações das técnicas de ML. No entanto, o aspeto positivo que foi conseguido com todas as estimações feitas pelos diferentes métodos é que todos eles originaram um conteúdo de melanina significativamente superior ao de lipofuscina, tal como tinha sido obtido pelo método de cálculo direto. Este resultado mostra, que apesar das limitações já apontadas à estimação do  $\mu_a(\lambda)$  do córtex pelo algoritmo RFR, seja qual for o método usado, este consegue chegar a um conteúdo de melanina superior ao de lipofuscina neste tipo de tecido.

Para terminar a análise dos espectros de  $\mu_a$  do córtex gerados por técnicas de ML, vamos agora avaliar o conteúdo de ADN/ARN e de hemoglobina nos espectros médios de  $\mu_a$  gerados em cada caso estudado, após a eliminação da absorção dos pigmentos. Assim e tal como foi feito no caso do  $\mu_a(\lambda)$  obtido por cálculos diretos (ver Figura 21), as linhas verticais com dupla-seta apresentadas em todos os gráficos da Figura 22 referem-se às razões de  $\mu_a$  calculadas para as bandas de absorção principais, do ADN/ARN (267 nm) e da hemoglobina (411 nm e 555 nm). Mais uma vez, em cada caso apresentado na Figura 22, foi calculada essa razão de absorção para cada um destes  $\lambda$ s de duas formas: antes e depois de se subtrair a absorção dos pigmentos, ou seja, antes e depois de se subtrair a linha de base representada a rosa em cada um dos gráficos da Figura 22. A Tabela 3 apresenta os valores das razões de absorção calculadas.

Tabela 3. Razões de absorção para as bandas de absorção principais do ADN/ARN e da hemoglobina para os vários métodos usados na estimação do  $\mu_a(\lambda)$  do córtex cerebral

Método	Razões de absorção aos comprimentos de onda centrais					
	267 nm		411 nm		555 nm	
	antes	depois	antes	depois	antes	depois
Cálculo direto	2,19	26,42	3,55	25,80	2,73	9,26

RFR - LOO	2,12	26,23	3,25	25,64	2,50	9,10
RFR – 10AT	2,22	27,11	2,92	24,18	2,11	8,07
RFR – 50AT	2,15	27,12	3,04	25,61	2,25	8,81
RFR – 100AT	2,21	27,92	2,99	25,39	2,17	8,62

Considerando os dados apresentados na Tabela 3, verifica-se que o método LOO é o que produz razões de absorção nos diferentes  $\lambda$ s mais próximas das obtidas pelo método de cálculo direto. Para se chegar a estes resultados, foi necessário considerar um conteúdo de melanina superior ao de lipofuscina no espectro de  $\mu_a$  do córtex gerado pelo método LOO. A obtenção destes resultados a partir de um número reduzido de espectros mostra que o método LOO pode ser considerado como uma boa opção para estimar o espectro de  $\mu_a$  do córtex a partir de medições de espectros de  $R_d$ . No entanto, a ser usado este método, ele apresenta uma estatística pobre, conforme referido na Ref. [47]. Ao introduzir espectros gerados artificialmente com o objetivo de aumentar a performance do algoritmo RFR, verifica-se que o aumento de espectros artificiais de 10 para 50 e depois para 100, todos os estudos realizados mostram razões de absorção para os diferentes  $\lambda$ s da mesma ordem de magnitude daqueles que foram obtidos pelo método de cálculo direto. Pelos dados apresentados na Tabela 3 que foram obtidos pelos métodos AT observa-se que quando o número de espectros digitalmente gerados aumenta de 10 para 50, as razões de absorção aproximam-se mais das que foram obtidas pelo método de cálculo direto. No entanto, ao aumentar o número de espectros digitalmente gerados para 100, as razões de absorção afastam-se novamente das que foram obtidas pelo método de cálculo direto. Este tipo de variação nos resultados obtidos com o aumento do número de espectros usados que foram gerados artificialmente indica que os modelos das GANs usados para gerar os espectros digitais funcionam até um certo ponto, e que se o número de espectros gerados artificialmente aumentar acima de um valor limite, tais espectros gerados apresentam características que diferem das características reais do tecido em estudo.

Podemos concluir a análise dos resultados apresentados nesta fase final do presente trabalho salientando que a aplicação de técnicas de ML é uma opção viável para reproduzir características espectrais de tecidos biológicos a partir de medições não invasivas, que podem ser usadas para diagnóstico. No entanto, dadas as limitações deste método que se vieram a destacar e que se prendem essencialmente com a necessidade de

um elevado número de amostras, a sua aplicação em situações reais com doentes deve ser repensada e planeada com o devido cuidado para evitar os falsos diagnósticos.

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO



## 5. Conclusão

O presente trabalho mostrou que a aplicação da teoria da difusão de fótons é muito útil para a rápida determinação dos espectros das propriedades óticas de tecidos biológicos, no caso do presente estudo, para o córtex cerebral. Os resultados obtidos por este método, mostraram não só poder caracterizar de forma espectral o córtex, mas também identificar a presença de dois tipos de pigmentos que estão associados ao envelhecimento natural de todos os tecidos biológicos, ou seja, a melanina e a lipofuscina. Uma análise cuidada do espectro de absorção do córtex cerebral mostrou que a presença destes dois pigmentos impede quantificar o real conteúdo de outros componentes, como o ADN/ARN e a hemoglobina. Reconstruindo o contributo de absorção dos pigmentos e subtraindo-o do espectro de absorção do córtex possibilitou a quantificação real tanto do ADN/ARN como da hemoglobina, tendo-se obtido valores semelhantes aos obtidos em estudos realizados com outros tipos de tecidos biológicos. Neste processo, foi também possível identificar um conteúdo de melanina que é aproximadamente o dobro do conteúdo de lipofuscina. Este resultado mostrou que o excesso de melanina está associado a processos degenerativos que ocorrem nos neurónios e que são precursores de patologias cerebrais, como os derrames cerebrais, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer.

Utilizando espectros de reflectância difusa, foram desenvolvidos algoritmos de ML que permitiram a reconstrução do espectro de absorção do córtex que tinha sido obtido por cálculos diretos de medições feitas com tecidos *ex vivo*. Considerando os modelos de ML que apresentaram melhor performance de estimação desse espectro verificou-se que, apesar de os algoritmos desenvolvidos apresentarem limitações que se prendem com um reduzido número de amostras (apenas 10 espectros), foi possível fazer estimativas bastante aproximadas de  $\mu_a(\lambda)$ . Nos casos que deram melhores resultados, fez-se novamente uma estimativa dos conteúdos de melanina e de lipofuscina, assim como dos conteúdos de ADN/ARN e de hemoglobina no córtex. Quanto ao conteúdo de melanina e de lipofuscina obtidos para o córtex cerebral que resultam dos espectros estimados, apesar de se verificar um aumento no conteúdo de melanina e uma diminuição no conteúdo de lipofuscina em relação aos valores obtidos por cálculos diretos das medições experimentais, há uma informação importante que as estimações permitiram obter. Tal informação é que o conteúdo de melanina é sempre significativamente superior ao conteúdo de lipofuscina para os tecidos estudados, o que implica que as estimações feitas por técnicas de ML permitem identificar este marcador como evidência dos

processos degenerativos que ocorrem nos neurónios e que poderão estar na base de patologias cerebrais. Relativamente aos conteúdos de ADN/ARN e de hemoglobina obtidos dos espectros estimados, os valores diferem um pouco daqueles que tinham sido recolhidos do espectro de absorção que resulta de cálculos diretos. No entanto, e apesar das limitações já descritas no desenvolvimento dos algoritmos de ML, considerando a ordem de grandeza desses conteúdos, as diferenças obtidas relativamente aos valores de referência são aceitáveis. Toda esta análise mostra que a aplicação de técnicas de ML para obter parâmetros fisiológicos e de diagnóstico de tecidos biológicos é possível com medições espectrais não invasivas, mas a precisão dos resultados obtidos poderá aumentar significativamente se for possível fazer um número significativo de medições.

Considerando todo o conjunto de propriedades óticas espectrais que foram obtidas para o córtex, a sua forma espectral entre 200 e 1000 nm e a ordem de magnitude de cada uma é semelhante às que já foram obtidas para outros tecidos biológicos. Estes resultados são os primeiros que se conhecem para o córtex cerebral na banda espectral que se considerou. Por outro lado, apesar de não terem sido aplicados tratamentos de transparência no presente trabalho, será de interesse realizar tal estudo para avaliar a transparência que se consegue criar no córtex cerebral por diferentes agentes de transparência, ou para avaliar as propriedades de difusão desses agentes neste tipo de tecido, uma vez que tais estudos nunca foram feitos.

Será interessante no futuro aplicar a metodologia usada no presente estudo para avaliar as propriedades óticas espectrais de banda larga em outros tecidos cerebrais e do sistema nervoso. Tais estudos poderão produzir, mais uma vez, resultados de importância significativa para a caracterização fisiológica desses tecidos ou para discriminar patologias, caso estejam disponíveis tecidos com doença.

## Referências

- [1] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, *The Optical Clearing Method – A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-33055-2.
- [2] V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*, 3rd ed. Bellingham, Washington: SPIE Press, 2015. doi: 10.1117/3.1003040.
- [3] T. Vo-Dinh, *Biomedical Photonics Handbook*, 2nd ed., Boca Raton, USA: CRC Press, 2014. doi: 10.120/b17290.
- [4] I. S. Martins, H. F. Silva, E. N. Lazareva, N. V. Chernomyrdin, K. I. Zaytsev, L. M. Oliveira, V. V. Tuchin, “Measurement of tissue optical properties in a wide spectral range: a review,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 14, pp. 249-298, 2023, doi: 10.1364/BOE.479320.
- [5] A. R. Botelho, H. F. Silva, I. S. Martins, I. C. Carneiro, S. D. Carvalho, R. M. Henrique, V. V. Tuchin, L. M. Oliveira, “Fast calculation of spectral optical properties and pigment content detection in human normal and pathological kidney,” *Spectro. Acta Part A: Mol. And Biomol. Spectrosc.*, vol. 286, pp. 122002, 2023, doi: 10.1016/j.saa.2022.122002.
- [6] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira, V. V. Tuchin, “Glucose diffusion in colorectal mucosa – a comparative study between normal and cancer tissues,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, n° 9, pp. 091506, 2017, doi: 10.1117/1.JBO.22.9.091506.
- [7] E. N. Lazareva, L. Oliveira, I. Yu. Yanina, N. V. Chernomyrdin, G. R. Musina, D. K. Tuchina, A. N. Bashkatov, K. I. Zaytsev, V. V. Tuchin, “Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range,” in *Handbook of Tissue Optical Clearing* Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range,” in *Handbook of Tissue Optical Clearing*, CRC Press, 2022, pp. 141-166. doi: 10.1201/9781003025252-8.
- [8] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, V. V. Tuchin, “Simple multimodal optical technique for evaluation of free/bound water and dispersion of human liver tissue,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, no. 12, pp. 125002, 2017. doi: 10.1117/1.JBO.22.12.125002.

- [9] I. Yu. Yanina, E. N. Lazareva, V. V. Tuchin, "Refractive index of adipose tissue and lipid droplet measured in wide spectral and temperature ranges," *Appl. Opt.*, vol. 57, no. 17, pp. 4839-4848, 2018. doi: 10.1364/AO.57.004839.
- [10] N. M. Gomes, V. V. Tuchin, L. M. Oliveira, "Refractive index matching efficiency in colorectal mucosa treated with glycerol," *IEEE J. Sel. Top. Quant. Elect.*, vol. 27, no. 4, pp. 7200808, 2021. doi: 10.1109/JSTQE.2021.3050208.
- [11] N. M. Gomes, V. V. Tuchin, L. M. Oliveira, "UV-NIR efficiency of the refractive index matching mechanism on colorectal muscle during treatment with different glycerol osmolarities," *J. Biomed. Phot. & Eng.*, vol. 6, no. 6, pp. 020307, 2020. doi: 10.18287/JBPE20.06.020307.
- [12] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, V. V. Tuchin, "Measuring optical properties of human liver between 400 and 1000 nm," *Quant. Elect.*, vol. 49, no. 1, pp. 13-19, 2019. doi: 10.1070/QEL16903.
- [13] P. Giannios, K. G. Toutouzas, M. Matiatou, K. Stasinou, M. M. Konstadoulakis, G. C. Zografos, K. Moutzouris, "Visible to near-infrared refractive properties of freshly-excised human-liver tissues: marking hepatic malignancies," *Sci. Rep.*, vol. 6, pp. 27910, 2016. doi: 10.1038/srep27910.
- [14] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, V. V. Tuchin, "Water Content and Scatterers Dispersion Evaluation in Colorectal Tissues," *J. Biomed. Phot. & Eng.*, vol. 3, no. 4, pp. 3254, 2017. doi: 10.18287/JBPE17.03.040301.
- [15] H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel, X. H. Hu, "Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm," *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, no. 6, pp. 1479-1489, 2006. doi: 10.1088/0031-9155/51/6/008.
- [16] Z. Deng, J. Wang, Q. Ye, T. Sun, W. Zhou, J. Mei, C. Zhang, J. Tian, "Determination of continuous complex refractive index dispersion of biotissue based on internal reflection," *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 1, pp. 015003, 2016. doi: 10.1117/1.JBO.21.1.015003.
- [17] S. Liu, Z. Deng, J. Li, J. Wang, N. Huang, R. Cui, Q. Zhang, J. Mei, W. Zhou, C. Zhang, Q. Ye, J. Tian, "Measurement of the refractive index of whole blood and its components for a continuous spectral region," *J. Biomed. Opt.*, vol. 24, no. 3, pp. 035003, 2019. doi: 10.1117/1.JBO.24.3.035003.

- [18] H. Li, S. Xie, "Measurement method of the refractive index of biotissue by total internal reflection," *Appl. Opt.*, vol. 35, no. 10, pp. 1793-1795, 1996. doi: 10.1364/AO.35.001793.
- [19] O. Sydoruk, O. S. Zhernovaya, V. V. Tuchin, A. Douplik, "Refractive index of solutions of human hemoglobin from the near-infrared to the ultraviolet range: Kramers-Kronig analysis," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 11, pp. 115002, 2012. doi: 10.1117/1.JBO.17.11.115002.
- [20] J. Gienger, H. Groß, J. Neukammer, M. Bär, "Determining the refractive index of human hemoglobin solutions by Kramers-Kronig relations with an improved absorption model," *Appl. Opt.*, vol. 55, no. 31, pp. 8951-8961, 2016. Doi: 10.1364/AO.55.008951.
- [21] G. D. Fasman, "Ultraviolet spectra of derivatives of cysteine, cysteine, histidine, phenylalanine, tyrosine, and tryptophan," in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd ed., CRC Press, 2018, pp. 192-199.
- [22] D. B. Wetlaufer, "Ultraviolet spectra of proteins and amino acids," in *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, 1962, pp. 303–390.
- [23] Y. Zhou, J. Yao, L. V. Wang, "Tutorial on photoacoustic tomography," *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 6, pp. 061007, 2016. doi: 10.1117/1.JBO.21.6.061007.
- [24] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, M. D. Kozintseva, V. I. Kochubei, S. Y. Gorodkov, and V. V. Tuchin, "Optical properties of peritoneal biological tissues in the spectral range of 350–2500 nm," *Opt. Spectrosc.*, vol. 120, no. 1, pp. 1-8, 2016. doi: 10.1134/S0030400X16010045.
- [25] L. Oliveira, I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, and V. V. Tuchin, "Optical properties of colorectal muscle in visible/NIR range," in *SPIE Proc.* vol. 10685, pp. 106853D, 2018. doi: 10.1117/12.2306586.
- [26] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, "Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 38, no. 15, pp. 2543, 2005. doi: 10.1088/0022-3727/38/15/004.
- [27] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, "Comparative study of the optical properties of colon mucosa and colon precancerous

- polyps between 400 and 1000 nm,” in *SPIE Proc.* vol. 10063, pp. 100631L, 2017. doi: 10.1117/12.2253023.
- [28] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira and V. V. Tuchin, "Kinetics of Optical Properties of Colorectal Muscle During Optical Clearing," in *IEEE J. Sel. Top. Quant. Electr.*, vol. 25, no. 1, pp. 1-8, 2019. doi: 10.1109/JSTQE.2018.2840346.
- [29] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, “Optical properties of the subcutaneous adipose tissue in the spectral range 400-2500 nm,” *Opt. Spectrosc.*, vol. 99, no.5, pp. 836-842, 2005. doi: 10.1134/1.2135863.
- [30] I. Carneiro, S. Carvalho, V. Silva, R. Henrique, L. Oliveira, V. V. Tuchin, “Kinetics of optical properties of human colorectal tissues during optical clearing: a comparative study between normal and pathological tissues,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 12, pp. 121620, 2018. doi: 10.1117/1.JBO.23.12.121620.
- [31] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, “Optical properties of human cranial bone in the spectral range from 800 to 2000 nm,” in *SPIE Proc.* vol. 6163, pp. 616310, 2006. doi: 10.1117/12.697305.
- [32] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, A. A. Gavrilova, S. V. Kapralov, V. A. Grishaev, V. V. Tuchin, “Optical properties of human stomach mucosa in the spectral range from 400 to 2000 nm: Prognosis for gastroenterology,” *Med. Laser Appl.*, vol. 22, no. 2, pp. 95-104, 2007. doi: 10.1016/j.mla.2007.07.003.
- [33] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, “Optical properties of human sclera in spectral range 370-2500 nm,” *Opt. Spectrosc.*, vol. 109, no. 2, pp. 197-204, 2010. doi: 10.1134/S0030400X10080084.
- [34] L. M. Oliveira, V. V. Tuchin, “Tissue Optics,” in *The Optical Clearing Method: A New Tool for Clinical Practice and biomedical Engineering*, Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-33055-2\_1.
- [35] A. N. Yaroslavsky, P. C. Schultze, I. V. Yaroslavsky, R. Schober, F. Ulrich, H.-J. Schwarzmaier, “Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 47, no. 12, pp. 2059, 2002. doi: 10.1088/0031-9155/47/12/305.
- [36] S. L. Jacques, “Optical properties of biological tissues: a review,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 58, no. 11, pp. R37–R61, 2013. doi: 10.1088/0031-9155/58/11/R37.

- [37] J. Popp, V. V. Tuchin, A. Chiou, S. H. Heinemann, Handbook of Biophotonics. Wiley-VCH, 2014.
- [38] N. Honda, K. Ishii, Y. Kajimoto, T. Kuroiwa, K. Awazu, Determination of optical properties of human brain tumor tissues from 350 to 1000 nm to investigate the cause of false negatives in fluorescence-guided resection with 5-aminolevulinic acid, *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 7, pp. 075006, 2018. doi: 10.1117/1.jbo.23.7.075006.
- [39] L. M. Oliveira, K. I. Zaytsev, V. V. Tuchin, "Improved biomedical imaging over a wide spectral range from UV to THz towards multimodality," *SPIE Proc.* vol. 11585, pp. 1158503, 2020. doi: 10.1117/12.2584999.
- [40] A. Rodríguez-Contreras, L. Shi, R. R. Alfano, "Effects of tryptophan metabolism on the brain: from early development to Alzheimer's disease," in *Biophotonics, Tryptophan and Disease*, Academic Press, 2022, pp. 107-114. doi: 10.1016/B978-0-12-822790-9.00014-0.
- [41] S. Mamani, L. Shi, T. Ahmed, R. Karnik, A. Rodríguez-Contreras, D. Nolan, R. Alfano, "Transmission of classically entangled beams through mouse brain," *J. Biophot.*, vol. 11, no. 12, pp. e201800096, 2018. doi: 10.1002/jbio.201800096.
- [42] Q. Lin, S. Wang, Y. Duan, V. V. Tuchin, "Ex vivo three-dimensional elemental imaging of mouse brain tissue block by laser-induced breakdown spectroscopy," *J. Biophot.*, vol. 14, no. 5, pp. e202000479, 2021. doi: 10.1002/jbio.202000479.
- [43] J. Lifante, B. Del Rosal, I. Chaves-Coira, N. Fernández, D. Jaque, E. Ximendes, "The near-infrared autofluorescence fingerprint of the brain," *J. Biophot.*, vol. 13, no. 11, pp. e202000154, 2020. doi: 10.1002/jbio.202000154.
- [44] J. Xu, A. K. Jahromi, J. Brake, J. E. Robinson, C. Yang, "Interferometric speckle visibility spectroscopy (ISVS) for human cerebral blood flow monitoring," *APL Photon.*, vol. 5, no. 12, pp. 126102, 2020. doi: 10.1063/5.0021988.
- [45] S. L. Jacques, "Origins of Tissue Optical Properties in the UVA, Visible, and NIR Regions," in *Advances in Optical Imaging and Photon Migration, Technical Digest Series*, paper no. OPC364, Optica Publishing Group, 1996.
- [46] Q. Wang Song, Chin-Yu Ku, Chunping Zhang, Richard B. Gross, Robert R. Birge, and Richard Michalak, "Modified critical angle method for measuring the refractive index of

- bio-optical materials and its application to bacteriorhodopsin," *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 12, pp. 797-803, 1995. doi: 10.1364/JOSAB.12.000797.
- [47] L. Fernandes, S. Carvalho, I. Carneiro, R. Henrique, V. V. Tuchin, H. P. Oliveira, L. M. Oliveira, "Diffuse reflectance and machine learning techniques to differentiate colorectal cancer ex vivo," *Chaos*, vol. 31, pp. 053118, 2021. doi: 10.1063/5.0052088.
- [48] S. Carvalho, I. Carneiro, R. Henrique, V. Tuchin, L. Oliveira, "Lipofuscin-type pigment as a marker of colorectal cancer," *Electron.*, vol. 9, no. 11, pp. 1–14, 2020. doi: 10.3390/electronics9111805.
- [49] I. Martins, H. Silva, V. V. Tuchin, L. Oliveira, "Estimation of rabbit pancreas dispersion between 400 and 1000 nm," *J. Biomed. Phot. & Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 020303, 2021. doi: 10.18287/JBPE21.07.020303.
- [50] T. M. Gonçalves, I. S. Martins, H. F. Silva, V. V. Tuchin, L. M. Oliveira, "Spectral optical properties of rabbit brain cortex between 200 and 1000 nm," *Photochem*, vol. 1, no. 2, pp. 190–208, 2021. doi: 10.3390/photochem1020011.
- [51] V. Backman, A. Wax, H. F. Zhang, *A Laboratory Manual in Biophotonics*. Boca Raton, USA: SRC Press, 2018. doi: 10.1201/9781315374857.
- [52] I. S. Martins, H. F. Silva, V. V. Tuchin, L. M. Oliveira, "Fast estimation of the spectral optical properties of rabbit pancreas and pigment content analysis," *Photonics*, vol. 9, no. 2, pp. 122, 2022. doi: 10.3390/photonics9020122.
- [53] B. Chance, M. Cope, E. Gratton, N. Ramanujam, and B. Tromberg, "Phase measurement of light absorption and scatter in human tissue," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 69, no. 10, pp. 3457–3481, 1998. doi: 10.1063/1.1149123.
- [54] A. V. Priezzhev, V. V. Tuchin, and L. P. Shubochkin, *Laser Diagnostics in Biology and Medicine*, Moscow, Russia: Nauka publications, 1989.
- [55] V. V. Tuchin, *Optical Clearing of Tissues and Blood*, Bellingham, USA: SPIE Press, 2006.
- [56] J. Mobley, T. Vo-Dinh, and V. V. Tuchin, "Optical properties of tissue," in *Biomedical Photonics Handbook*, T. Vo-Dinh, ed., 2nd ed., Boca Raton, USA: CRC Press, 2015, pp. 23–121.

- [57] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, “Measurements during optical clearing,” in *The Optical Clearing Method: A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*, Cham, Switzerland: Springer Nature, 2019, pp. 61–77. doi: 10.1007/978-3-030-33055-2\_5.
- [58] S. A. Prah, “Inverse adding-doubling,” <http://omlc.org/software/iad/>. Accessed on December 20, 2022.
- [59] P. Lemaillet, C. C. Cooksey, J. Hwang, H. Wabnitz, D. Grosenick, L. Yang, and D. W. Allen, “Correction of an adding-doubling inversion algorithm for the measurement of the optical parameters of turbid media,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 9, no. 1, pp. 55-71, 2018. doi: 10.1364/BOE.9.000055.
- [60] L. M. C. Oliveira, *The effect of optical clearing in the optical properties of skeletal muscle tissue*, FEUP Edições, 2014.
- [61] L. R. Oliveira, T. M. Gonçalves, M. R. Pinheiro, L. E. Fernandes, I. S. Martins, H. F. Silva, H. P. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Invasive and minimally invasive optical detection of pigment accumulation in brain cortex,” *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 8, no. 1, pp. 010304, 2022. doi: 10.18287/JBPE22.08.010304.
- [62] H. Ding, J. Q. Lu, K. M. Jacobs, X. H. Hu, “Determination of refractive indices of porcine skin tissues and intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 22, no. 6, pp. 1151-1157, 2005. doi: 10.1364/JOSAA.22.001151.
- [63] “refractiveindex.info” – Base de dados online sobre índice de refração. <https://refractiveindex.info/> (acedido a 1 de novembro de 2022).
- [64] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira, V. V. Tuchin, “Wavelength dependence of the refractive index of human colorectal tissues: Comparison between healthy mucosa and cancer,” *J. Biomed. Phot. Eng.*, vol. 2, no. 4, pp. 040307, 2016. doi: 10.18287/JBPE16.02.040307.
- [65] T. G. Mayerhöfer, S. Pahlow, J. Popp, “The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure,” *Chem. Phys. Chem.*, vol. 21, pp. 2029-2046, 2020. doi:10.1002/cphc.202000464.
- [66] M. P. Mattson, W. Duan, W. A. Pedersen, C. Culmsee, “Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases,” *Apoptosis*, vol. 6, pp. 69-81, 2001. doi: 10.1023/a:1009676112184.

- [67] K. L. Double, V. N. Dedov, H. Fedorov, E. Kettle, G. M. Halliday, B. Garner, U. T. Brunk, “The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the brain,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, pp. 1669-1682, 2008. doi: 10.1007/s00018-008-7581-9.
- [68] A. Moreno-García, A. Kun, M. Calero, O. Calero, “The neuromelanin paradox and its role in oxidative stress and neurodegeneration,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 1, pp. 124, 2021. doi: 10.3390/antiox10010124.
- [69] P. Pradhan, S. Guo, O. Ryabchykov, J. Popp, T. W. Blocklitz, “Deep learning a boom for biophotonics?,” *J. Biophot.*, vol. 13, no. 6, pp. e201960186, 2020. doi: 10.1002/jbio.201960186.
- [70] A. Roggan, K. Dörschel, O. Minet, D. Wolff, G. Müller, “The optical properties of biological tissue in the near infrared wavelength range – review and measurements,” in *Laser-Induced Interstitial Thermotherapy*, SPIE Press, 1995, pp. 10-44.
- [71] J. Binding, J. B. Arous, J. F. Léger, S. Gigan, C. Boccara, L. Bourdieu, “Brain refractive index measured in vivo with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy,” *Opt. Express*, vol. 19, no. 6, pp. 4833-4847, 2011. doi: 10.1364/OE.19.004833.
- [72] J. Sun, S. J. Lee, L. Wu, M. Sarntinoranont, H. Xie, “Refractive index measurement of acute rat brain tissue slices using optical coherence tomography,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 2, pp. 1084-1095, 2012. doi: 10.1364/OE.20.001084.
- [73] R. K. Narayan, W. E. Heydorn, G. J. Creed, D. M. Jacobowitz, “Identification of major proteins in human cerebral cortex and brain tumors,” *J. Protein Chem.*, vol. 4, no. 6, pp. 375–389, 1985. doi: 10.1007/BF01025178.
- [74] T. Yu, D. Zhu, L. Oliveira, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin, “Tissue Optical Clearing Mechanisms,” in *Handbook of Tissue Optical Clearing – New Prospects in Optical Clearing*, CRC Press, 2022, pp. 3-29.
- [75] G. Zonios, A. Dimou, I. Bassukas, D. Galaris, A. Tsolakidis, E. Kaxiras, “Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 1, pp. 014017, 2008. doi: 10.1117/1.2844710.
- [76] M. B. Rózanowska, A. Pawlak, B. Rózanowski, “Products of docosahexaenoate oxidation as contributors to photosensitising properties of retinal lipofuscin,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, pp. 3525, 2021. doi: 10.3390/ijms22073525.

- [77] V. V. Tuchin, D. Zhu, E. A. Genina, *Handbook of Tissue Optical Clearing – New Prospects in Optical Clearing*. Boca Raton, USA: CRC Press, 2022. doi: 10.1201/9781003025252.
- [78] L. R. Oliveira, R. M. Ferreira, M. R. Pinheiro, H. F. Silva, V. V. Tuchin, L. M. Oliveira, “Broadband spectral verification of optical clearing reversibility in lung tissue,” *J. Biophot.*, pp. e202200185. doi: 10.1002/jbio.202200185.
- [79] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, V. Tuchin, “Moving tissue spectral window to the deep-ultraviolet via optical clearing,” *J. Biophot.*, pp. e201900181. doi:10.1002/jbio.201900181.
- [80] L. M. C. Oliveira, V. V. Tuchin, “Optical clearing and tissue imaging,” in *The Optical Clearing Method – A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*, Springer, 2019, pp. 106-138. doi: 10.1007/978-3-030-33055-2\_7.
- [81] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. M. Oliveira, V. V. Tuchin, “A robust ex vivo method to evaluate the diffusion properties of agents in biological tissues,” *J. Biophot.*, vol. 12, no. 4, pp. e201800333. doi: 10.1002/jbio.201800333.
- [82] L. M. Oliveira, V. V. Tuchin, “Optical Clearing for Cancer Diagnostics and Monitoring,” in *Handbook of Tissue Optical Clearing – New Prospects in Optical Clearing*, CRC Press, 2022, pp. 597-606.
- [83] E. A. Genina, L. M. Oliveira, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin, “Optical Clearing of Biological Tissues: Prospects of Application for Multimodal Malignancy Diagnostics,” in *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*, Springer Nature, 2020, pp. 107-131. doi: 10.1007/978-3-030-44594-2\_2.
- [84] V. V. Tuchin, L. M. Oliveira, “Recent progress in tissue enhanced spectroscopy for cancer detection,” *Asian J. Phys.*, vol. 30, no. 1, pp. 427-444, 2021.
- [85] L. M. Oliveira, I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, D. K. Tuchina, P. A. Timoshina, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. V. Tuchin, “Tissue optical clearing as a diagnostic tool for tissue pathology differentiation,” *Proc. - Int. Conf. Laser Opt. (ICLO) 2018*, p. 508, 2018, doi: 10.1109/LO.2018.8435385.
- [86] L. Fernandes, H. Silva, I. Martins, S. Carvalho, I. Carneiro, R. Henrique, V. V. Tuchin, L. M. Oliveira, “Tissue Spectroscopy and Optical Clearing of Colorectal Mucosa in the

- Pursuit of New Cancer Diagnostic Approaches,” vol. 7, no. 4, pp. 1–16, 2021, doi: 10.18287/JBPE21.07.040302.
- [87] L. M. C. Oliveira, V. V. Tuchin, “Major Optical Clearing Mechanisms,” in *The Optical Clearing Method – A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*, Springer, 2019, pp. 49-59. doi: 10.1007/978-3-030-33055-2\_4.
- [88] P. Peixoto, L. Oliveira, M. I. Carvalho, E. Nogueira, V. V. Tuchin, “Software development for estimation of optical clearing agent’s diffusion coefficients in biological tissues,” *J. Biomed. Phot. Eng.*, vol. 1, no. 4, pp. 2815, 2015. doi: 10.18287/JBPE-2015-1-4-255.
- [89] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, A. Selifonov, L. Oliveira and V. V. Tuchin, “Enhanced Ultraviolet Spectroscopy by Optical Clearing for Biomedical Applications,” *IEEE J. Sel. Top. Quant. Electron.*, vol. 27, no. 4, pp. 1-8, 2021, Art no. 7200108. doi: 10.1109/JSTQE.2020.3012350.
- [90] I. S. Martins, M. R. Pinheiro, H. F. Silva, V. V. Tuchin and L. M. Oliveira, “Evaluation of OCA diffusivity in tissues through diffuse reflection spectroscopy,” *Proc. - Int. Conf. Laser Opt. (ICLO) 2022*, pp. 1-1, 2022, doi: 10.1109/ICLO54117.2022.9840041.
- [91] H. F. Silva, I. S. Martins, A. A. Bogdanov Jr., V. V. Tuchin, L. M. Oliveira, “Characterization of optical clearing mechanisms in muscle during treatment with glycerol and gadobutrol solutions,” *J. Biophot.*, pp. e202200205. doi: 10.1002/jbio.202200205.
- [92] D. K. Tuchina, I. G. Meerovich, O. A. Sindeeva, V. V. Zherdeva, A. P. Savitsky, A. Bogdanov Jr., V. V. Tuchin, “Magnetic resonance contrast agents in optical clearing: prospects for multimodal tissue imaging,” *J. Biophot.*, vol. 13, no. 11, pp. e201960249. doi: 10.1002/jbio.201960249.