

ÓPTICA BIOMÉDICA

A. Z. Freitas*, I. T. Kato**, P. A. da Ana**, R. E. Araujo*** e M. S. Ribeiro*

* Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil

** Departamento de Engenharia Biomédica, UFABC, São Paulo, Brasil

*** Departamento de Engenharia Biomédica, UFPE, Recife, Brasil

e-mail: marthasr@usp.br

INTRODUÇÃO

A óptica biomédica é a área do conhecimento que explora luz em processos terapêuticos e diagnósticos nas áreas da Saúde. Uma longa história descreve a uso de luz como ferramenta na área médica e odontológica. Um marco deste percurso foi o desenvolvimento do microscópio composto, por Hans e Zacharias Janssen (1590). Galileio Galilei (1624) e Antonie van Leeuwenhek (1674) também apresentaram importantes contribuições para o aperfeiçoamento do microscópio óptico. Quase dois séculos depois, em 1850, Hermann Ludwig F. Von Helmholtz propôs a construção do oftalmoscópio para geração de imagens *in vivo* de retina. Outra importante contribuição para a óptica biomédica foi dada por G. Kirchhoff e R.W. Bunsen, que em 1859 mostraram que é possível avaliar quantitativamente componentes de uma amostra, pela análise da radiação emitida com aquecimento da mesma. Deste resultado, Henrik Lundegardh, em 1929, desenvolve o primeiro fotômetro de chama, usado para medir concentração de sais metálicos em fluidos biológicos. Em 1960, com a construção do primeiro LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*- Amplificação da Luz por Emissão Estimulada da Radiação) por Theodore H. Maiman, novas técnicas espectroscópicas de diagnóstico e terapêuticas foram desenvolvidas e aperfeiçoadas. Técnicas como microscopia confocal, microscopia não-linear, tomografia por coerência óptica, microscopia e espectroscopia Raman, pinças ópticas, *biospeckle*, microscopia holográfica, etc, surgiram no século 20. Hoje, técnicas ópticas como turbidimetria, nefelometria, imunoenaios (reações antígeno-anticorpo indicadas por colorimetria ou fluorescência) e citometria de fluxo são comumente encontradas em laboratórios de análises clínicas.

O mercado mundial de equipamentos e insumos para diagnóstico médico é superior a 37 bilhões de dólares/ano. Esse número cresce quando a área de terapêutica é observada. Lasers cirúrgicos (para dermatologia, oftalmologia, odontologia), instrumentos e insumos para terapia fotodinâmica, microscópios cirúrgicos, fontes UV para tratamento de psoríase e

hiperbilirrubinemia, lasers e LEDs (*Light Emitter Diode*- Diodo Emissor de Luz) para bioestimulação óptica de tecidos biológicos movimentam mais de 8 bilhões de dólares/ano no mercado mundial.

Inovações tecnológicas em óptica biomédica podem ser encontradas em diversas revistas científicas como *Journal of Biomedical Optics*, *Optics Express* e *Biomedical Optics Express*, *Lasers in Surgery and Medicine*, *Lasers in Medical Science*, *Photomedicine and Laser Surgery*, *Photodiagnosis & Photodynamic Therapy*, etc. Conferências internacionais também divulgam novos avanços na área e congregam pesquisadores de diversos países, como: *European Conferences on Biomedical Optics* (ECBO), *Biomedical Optics Conference* (BIOS – SPIE), *Biomedical Optics* (BIOMED), *World Association for Laser Therapy* (WALT) e *American Association for Lasers in Medicine and Surgery* (AALMS).

No Brasil, um dos pioneiros da pesquisa científica na área foi o prof. Dr. Jorge Humberto Nicola, na UNICAMP, com trabalhos de lasers aplicados à medicina em cirurgia e terapia fotodinâmica em meados da década de 80. Hoje, várias instituições apresentam de forma consolidada atividades de pesquisa em óptica biomédica, como IPEN, UFABC, UFMG, UFPE, UNICAMP, UNICASTELO, UNINOVE, UNIVAP, USP São Carlos, entre outras.

Em 2002, maior atenção é dada à área de óptica biomédica no Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. No CBEB VIII foi criada a seção de “Laser Aplicado à Medicina” coordenada pelo prof. Dr. Renato Amaro Zângaro. Durante vários encontros da Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica as seções de “Laser Aplicado à Medicina” abordaram principalmente temas relacionados à terapia a laser com baixa potência (bioestimulação). Em 2010, a seção de Laser Aplicado à Medicina passou a se chamar “Óptica Biomédica” no intuito de melhor identificar e agregar os pesquisadores da área, além de ampliar o número de trabalhos submetidos incorporando as técnicas de diagnóstico óptico.

Diferentes linhas de pesquisa na área de óptica

biomédica tem recebido crescente atenção da comunidade científica brasileira, como o desenvolvimento de fontes de luz para terapia e diagnóstico, técnicas avançadas de microscopia, espectroscopia clínica e biomédica, imagem por óptica difusa, métodos acústico-ópticos, tomografia por coerência óptica, nanobiofotônica, biossensores ópticos, que serão comentadas neste capítulo.

TERAPIA ÓPTICA

Terapia óptica, terapia com luz ou fototerapia, é um dos métodos terapêuticos mais antigos usado pelo homem. Historiadores reportam que civilizações antigas, como a egípcia, a grega e a asteca, conheciam os benefícios da exposição corporal à luz solar. Os egípcios usavam luz e extratos de plantas para tratar distúrbios da pele, e na Grécia, Heródoto observou que a exposição à luz solar poderia fortalecer os ossos. No entanto, a ação da luz nos tecidos animais e humanos foi pouco explorada até 1903, ano em que Niels Finsen ganhou o prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina pelo tratamento de lúpus vulgaris (tuberculose cutânea) com luz do ultravioleta próximo ao azul [1].

Outro fato que revolucionou a fototerapia foi o desenvolvimento do laser. Após o primeiro relato da radiação laser, diversas aplicações na área da saúde passaram a ser estudadas em todo o mundo. Particularmente no Brasil, apenas nas duas últimas décadas a fototerapia assumiu um papel de destaque tanto na aplicação clínica como na abordagem científica deste tema.

De fato, a comunidade científica possui um grande interesse nos efeitos biomédicos da radiação laser devido às suas propriedades de coerência, colimação e monocromaticidade. Para fazer funcionar um laser, três condições fundamentais devem ser satisfeitas: em primeiro lugar é necessário dispor de um meio ativo, ou seja, de uma coleção de átomos, moléculas ou íons que sejam capazes de emitir radiação quando estimulados; em segundo lugar, deve ser satisfeita uma condição conhecida como inversão de população, que é gerada por um processo de excitação denominado bombeamento, transformando o meio ativo em amplificador da radiação; finalmente, é indispensável dispor de uma reação óptica para que o sistema composto por tal reação e pelo meio ativo seja a sede de uma oscilação laser (cavidade ressonante).

O desenvolvimento de uma grande variedade de equipamentos e a possibilidade de ajuste de diversos parâmetros físicos ampliou as áreas de investigação e estabeleceu o laser como primeira ferramenta de escolha para algumas aplicações na área da Saúde. Atualmente estão disponíveis equipamentos de laser de estado sólido, de corante e a gás, com emissão de radiação do ultravioleta (UV) ao infravermelho distante, como no

caso do laser de CO₂. Além disso, equipamentos lasers de semicondutores (lasers de diodo) e outras fontes de luz, como o LED, também foram desenvolvidos, impulsionando o avanço tecnológico na área de terapia óptica.

Atualmente, a fototerapia é amplamente empregada nas diversas áreas da Saúde. Sua utilização baseia-se nos fenômenos que ocorrem quando a luz incide no tecido (i.e. reflexão, absorção, espalhamento e transmissão) e no tipo de interação resultante, como a fototérmica, a fotoquímica e a fotoablação. O tipo de fenômeno que ocorre durante a interação depende das características micro e macroestruturais da matéria e do comprimento de onda da fonte de luz utilizada. Contudo, a maioria dos efeitos da fototerapia é dependente da absorção da radiação pelas substâncias encontradas no tecido biológico.

De acordo com o tipo de equipamento e de interação luz-tecido, podemos dividir as aplicações clínicas da fototerapia em duas grandes áreas: a terapia com lasers de alta potência, que emitem alta irradiância e promovem efeitos biológicos pela interação térmica ou pela ablação dos tecidos alvos, e a terapia com lasers de baixa potência emitindo com baixa irradiância, que é caracterizada pela transformação da energia luminosa em energia química e desencadeia uma cascata de eventos biológicos em nível molecular, até a resposta clínica macroscópica.

Na Saúde, as aplicações do laser mais estudadas são aquelas determinadas pelos efeitos térmicos (quando a energia absorvida se transforma subsequentemente em calor), devido à possibilidade de emissão de altas potências focalizadas em pequenas áreas para coagular, vaporizar, derreter ou ablacinar tecidos biológicos. Em cirurgia, por exemplo, a radiação laser é aplicada com uma irradiância de algumas dezenas de watts por centímetro quadrado, equivalendo a um “bisturi a luz”, permitindo operações seguras, com menor ocorrência de sangramento e boas condições de esterilidade. A intensa ação térmica dada pela radiação laser também auxilia a destruir tumores em oncologia, bem como pode ser utilizada na odontologia para remoção de cáries.

Estes efeitos são dependentes da temperatura alcançada no tecido e estão diretamente relacionados com os parâmetros de irradiação utilizados (comprimento de onda, emissão pulsada ou contínua, duração do pulso, taxa de repetição, densidade de potência, densidade de energia, tempo de exposição) e as características do tecido irradiado (propriedades ópticas e térmicas). Neste tipo de interação, é necessário identificar as substâncias absorvedoras do tecido e eleger o comprimento de onda que seja absorvido por estes componentes.

Além disso, o sucesso da fototerapia baseada na interação térmica depende de alcançar a temperatura desejada no tecido alvo, bem como evitar o dano

térmico aos tecidos adjacentes. Desta forma, é necessário que o aquecimento ocorra até a temperatura almejada e que seja confinado às estruturas alvo. Este confinamento térmico também depende da escolha dos parâmetros adequados às características do tecido a ser tratado [2].

As substâncias presentes no tecido possuem características de absorção que determinarão o tipo de radiação que será empregada. Dentre os lasers de alta potência mais utilizados nas áreas da Saúde, o laser de CO₂ (laser a gás, $\lambda = 10600$ nm) é bem absorvido pela água e por isso é muito aplicado em cirurgia de tecidos moles, como a pele e mucosa. Por outro lado, o laser de argônio (laser a gás, $\lambda = 488$ nm e $\lambda = 514$ nm) é mais absorvido pela hemoglobina e melanina e, por isso, é indicado para o tratamento de lesões vasculares e lesões pigmentadas. O laser de Nd:YAG (laser de estado sólido, $\lambda = 1064$ nm) também pode ser utilizado em tecido mole, apesar de ser menos absorvido pela água, hemoglobina e melanina. Outra indicação deste laser é para a remoção de pelos e tatuagens. O laser KTP (laser de estado sólido, $\lambda = 532$ nm) também é bem absorvido pela hemoglobina e melanina e possui indicação semelhante a do laser de argônio. Os comprimentos de onda dos lasers de Er:YAG e Ho:YLF ($\lambda = 2940$ nm e $\lambda = 2065$ nm) são bem absorvidos pela água e pela hidroxiapatita e por isso utilizados em tecidos duros, como o osso e o esmalte dentário. De fato, ambos os lasers podem ser usados com sucesso para remoção de tecidos cariados em odontologia. Outra indicação destes lasers é para *peeling*.

Os lasers de diodo (laser de semicondutor, $\lambda = 800$ - 1440 nm) possuem características de absorção semelhantes ao laser de Nd:YAG e são indicados para cirurgias de tecidos moles e remoção de pelos.

Também na oftalmologia, a fotocoagulação tecidual causada pela interação térmica é utilizada para tratar doenças vasculares, descolamento de retina, retinopatia diabética e degeneração macular. Nestas situações, a hemoglobina, a melanina e a xantofila são as principais moléculas absorvedoras e, por isso, são utilizados lasers com emissão de radiação entre a região do azul e vermelho, como o laser de argônio e kriptônio. A oftalmologia é uma das áreas em que mais se utiliza a terapia óptica, sendo o tratamento de escolha para diversas doenças.

Em dermatologia, a coagulação e a vaporização são dois efeitos térmicos muito utilizados para remoção de tatuagens, lesões pigmentadas benignas, lesões vasculares e pelos. Como já mencionado, a escolha do comprimento de onda da radiação depende do tipo de tecido (substâncias absorvedoras presentes) e o efeito desejado.

O segundo tipo de interação que pode ocorrer na fototerapia de alta irradiância é a fotoablação. Neste tipo de interação, a energia dos fótons absorvidos deve

exceder a energia de ligação entre dois átomos para promover a quebra destas ligações químicas e promover a ablação do material exposto. Desta forma, ocorre a remoção de tecido de forma precisa, na ausência de danos térmicos [2]. Para promover este tipo de efeito são utilizadas fontes de luz UV, cujo fóton possui energia superior àquelas das ligações químicas. Os lasers de *excimer* com emissão de radiação entre $\lambda = 193$ nm e $\lambda = 351$ nm possuem características favoráveis para este tipo de efeito e são amplamente empregados em cirurgias refrativas de córnea para a correção de miopia, hipermetropia e astigmatismo.

Entretanto, quando um corpo é exposto a fontes luminosas com baixas irradiância (densidades de potência da ordem de 1 W/cm^2), a possibilidade de manifestação dos efeitos térmicos é nula. Esta terapia é responsável pelos efeitos não térmicos (efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos), constituindo-se num tratamento à luz no qual a irradiância utilizada é baixa o bastante para que a temperatura do tecido tratado não ultrapasse $37,5^\circ\text{C}$. A ação fotoquímica de tal radiação é usada para o tratamento fotodinâmico de tumores, analgesia e para acelerar a cicatrização de feridas, queimaduras, úlceras e processos inflamatórios de origem variada [3].

A fototerapia por conversão da energia luminosa em processos químicos para o tratamento de icterícia do recém-nascido é reportada na literatura desde o final da década de 50. Nesse caso, os fótons absorvidos transformam a bilirrubina IX alfa em um isômero geométrico relativamente estável. Em 1958, foi construído, artesanalmente, o primeiro equipamento fototerápico que era composto de oito lâmpadas fluorescentes azuis, montadas em uma calha de alumínio côncava e refletor. A primeira tentativa de profilaxia, utilizando a fototerapia, ocorreu em 1968, e desde a sua descoberta, não só as indicações para o seu uso mudaram consideravelmente, como novos e mais eficazes modelos foram introduzidos no mercado. Até hoje, a fototerapia (entre 400 e 500 nm) é a modalidade terapêutica mais utilizada mundialmente para o tratamento da hiperbilirrubinemia neonatal [4].

No final da década de 60, Endre Mester quis testar se a radiação laser poderia causar câncer em camundongos. Ele fez o tratamento com um laser de rubi de baixa potência ($\lambda = 694$ nm) em um grupo de camundongos que teve o dorso depilado. Para sua surpresa, ao invés de desenvolver câncer, no grupo tratado o pelo cresceu mais rápido que no grupo não tratado [5]. Esta foi a primeira demonstração da "bioestimulação laser". Atualmente, a terapia com laser ou luz de baixa potência, também conhecida como "bioestimulação" ou "fotobiomodulação" é praticada por profissionais da saúde em muitas partes do mundo. Para efeitos de analgesia e cicatrização de lesões de origem variada, as fontes de luz mais utilizadas emitem

na região do vermelho e infravermelho próximo (600 a 1000 nm), como os lasers de He-Ne ($\lambda= 633$ nm), GaAlAs ($\lambda= 830$ nm) e GaAs ($\lambda= 904$ nm). Estes comprimentos de onda são os mais utilizados por penetrarem mais profundamente no tecido biológico, já que o sangue e a água (maiores cromóforos do corpo humano) absorvem pouco estes comprimentos de onda.

Estudos sugerem que para observação dos efeitos clínicos macroscópicos, a luz visível, ao ser absorvida por uma molécula, produz mudanças fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, que alteram o metabolismo, conduzindo à transdução (processo de transferir energia de um sistema para outro) do sinal a outras partes da célula (incluindo membranas), que finalmente conduzem à fotorresposta (biomodulação). Enquanto que a luz visível provavelmente inicia a cascata de eventos na cadeia respiratória das mitocôndrias, por eventos fotoquímicos (provavelmente a fotoativação de enzimas), também se sugere que, por causa das propriedades fotofísicas e fotoquímicas da radiação infravermelha, esta inicie a cascata de eventos metabólicos através de efeitos fotofísicos sobre as membranas (provavelmente nos canais Ca^{++}), conduzindo à mesma resposta final [6].

Mais recentemente, LEDs vem sendo utilizados em substituição aos lasers por possuírem menor custo e por serem de fácil manuseio. O LED é um diodo semiconductor (junção P-N) que quando é energizado emite luz visível. A luz não é monocromática como a do laser, mas consiste de uma banda espectral relativamente estreita (por exemplo, um LED de emissão vermelha possui uma banda de $\lambda= 630\pm 20$ nm) e é produzida pelas interações energéticas do elétron. Em qualquer junção P-N polarizada diretamente, dentro da estrutura, próximo à junção, ocorrem recombinações de lacunas e elétrons. Essa recombinação exige que a energia possuída pelos elétrons seja liberada, o que ocorre na forma de calor ou fótons de luz.

Trabalhos na literatura mostram que o LED pode ser usado com sucesso para estimulação de efeitos biológicos, assim como o laser de baixa potência [7-8]. No entanto, para o sucesso da terapia, é imprescindível que os parâmetros físicos e clínicos sejam obedecidos.

Atualmente, a utilização da terapia óptica está sendo expandida para outras aplicações na Saúde. Trabalhos recentes indicam que a fototerapia pode melhorar o desempenho muscular de atletas bem como reduzir a fadiga muscular durante exercícios, além de ajudar no reparo muscular [9]. Outro campo em expansão para novos estudos é a fototerapia transcranial. A literatura sugere que os benefícios da fototerapia em injúrias do cérebro incluem neuroproteção, redução de inflamação e estimulação de neurogênese, além de bons resultados para acidente vascular cerebral isquêmico [10].

Também é possível usar a absorção da luz em baixa irradiância por moléculas fotoaceitadoras não

especializadas, isto é, moléculas que podem absorver luz em certos comprimentos de onda, mas não são incorporadas em órgãos especializados na recepção da luz. A molécula absorvedora pode transferir energia para uma segunda molécula e esta última, estando ativada, pode então causar reações químicas no tecido vizinho. Este tipo de reação é utilizado, por exemplo, em terapia fotodinâmica (PDT- *PhotoDynamic Therapy*).

As primeiras experiências com a terapia fotodinâmica datam de aproximadamente 110 anos atrás, relatadas por Raab, que observou que a exposição do corante acridina e luz podia ser letal a paramécios, o protozoário causador da malária. Ele postulou que este efeito era causado pela transferência da energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas pela absorção da luz pela clorofila. Nem a luz ou o corante sozinhos tiveram qualquer efeito aparente sobre paramécios, mas juntos eles foram altamente citotóxicos [11].

Desde aquela época, vários exemplos do efeito fotodinâmico foram observados para uma variedade de fotossensibilizadores, ambos *in vitro* e *in vivo*. As pesquisas tomaram então um rumo diferente, o que levou a concentração de estudos na área de diagnóstico e combate ao câncer e ao desenvolvimento de novos fotossensibilizantes e novas fontes de luz. Em 1972, Diamond e colaboradores tentaram destruir células tumorais com a associação de hematoporfirina, atualmente um dos mais aceitos fotossensibilizantes, com exposição por raios X, entretanto, os autores não obtiveram sucesso, demonstrando que a fonte de luz (ou radiação eletromagnética) deve ser ressonante com a absorção do corante fotossensibilizador [12].

Além disso, as primeiras fontes de luz utilizavam lâmpadas convencionais, com luz não coerente e policromática, com um forte componente térmico associado. Com o desenvolvimento dos lasers, esta fonte de luz se mostrou muito mais eficiente que lâmpadas comuns para uso em terapia fotodinâmica [12].

Para o efeito fotodinâmico ocorrer, utiliza-se a ação combinada de irradiação com luz visível e fármacos que são fotoativados (fotossensibilizadores) para destruir tecidos ou organismos patogênicos que possuem rápida multiplicação. Moléstias, tais como degeneração macular da retina, vários tipos de câncer, psoríase, infecções fúngicas e bacterianas, verrugas, que têm como característica um crescimento anormal de células, estão sendo também tratadas através do efeito fotodinâmico [11-13].

O processo fotodinâmico é baseado na foto-oxidação de matéria orgânica. É necessária a presença do fotossensibilizador, oxigênio e irradiação luminosa no local a ser tratado. Quando o fotossensibilizador absorve a luz, ele vai a um estado excitado. Ao voltar para o estado fundamental, ele pode passar pelo seu estado

triplete, reagindo com o substrato (reação tipo I) ou com o oxigênio molecular (reação tipo II). Espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete) são geradas localmente e ocasionam a morte celular no tecido tumoral e/ou de outros tecidos doentes ou agentes infectantes por estresse oxidativo [12].

DIAGNÓSTICO ÓPTICO

O campo das ciências biológicas e da Saúde tem se beneficiado fortemente com os avanços das técnicas de diagnóstico empregando-se métodos ópticos. Tais técnicas permitem a diferenciação molecular, de células e tecidos e, com isso, propiciam o diagnóstico preciso de doenças de forma rápida e não invasiva. Dentre as técnicas de diagnóstico mais empregadas nas áreas de ciências da vida e ciências da saúde, podem ser citadas as técnicas que envolvem o fenômeno de fluorescência, tais como a técnica de espectroscopia de fluorescência, assim como as técnicas de espectroscopia vibracional, de análise por padrões de *speckle* e as que empregam o fenômeno Doppler, e técnicas baseadas nas propriedades de espalhamento da luz pelo tecido biológico, como por exemplo, a tomografia por coerência óptica, as quais se encontram descritas a seguir.

O fenômeno de fluorescência surge da absorção do fóton por um átomo e está relacionada com a liberação de energia envolvida na transição eletrônica de um estado excitado para o estado fundamental, a qual envolve o estado quântico singlete e tem duração da ordem de nanossegundos. Essa quantidade de energia emitida é característica de cada molécula e do ambiente em que ela se encontra, podendo ser usada para detectá-la [14].

O sistema de espectroscopia de fluorescência induzida por luz (LIF) utiliza-se, basicamente, de uma fonte de luz (lâmpada, LED ou laser) para excitação da amostra, fibra óptica para condução, um monocromador e detector, o qual pode ser de diferentes tipos [14]. As vantagens de uso desta técnica para diagnóstico é a não invasividade e possibilidade de quantificação dos fluoróforos no tecido, permitindo também o monitoramento de diferentes condições patológicas ao longo do tempo, em tempo real. Contudo, o sistema da LIF apresenta a desvantagem de analisar uma pequena área da amostra, devido à pequena área da fibra de coleta [15].

A LIF tem sido amplamente empregada para diagnóstico de patologias de tecidos moles, tais como câncer [16], além de diferenciação e diagnóstico de lesões de tecidos duros dentais, tais como lesões de cárie [17]. Também, trata-se de uma ferramenta poderosa no diagnóstico de lesões cancerígenas previamente ao tratamento com terapia fotodinâmica,

sendo empregadas fontes de luz que induzem a fluorescência dos fotossensibilizadores empregados nesta terapêutica. Por meio da seleção de diferentes comprimentos de onda de excitação, é possível detectar os fluoróforos mais comumente encontrados no corpo humano, tais como colágeno, porfirinas, aminoácidos, ácidos nucleicos e diversos constituintes bacterianos [14].

Recentemente, técnicas de formação de imagens digitais têm sido associadas aos sistemas de fluorescência, o que permite a análise dos sinais ópticos com resolução espacial e espectral ao mesmo tempo [15], possibilitando o diagnóstico e monitoramento por imagem de forma rápida e não invasiva.

As técnicas de espectroscopia vibracional empregam a radiação eletromagnética para caracterizar os níveis de energia de átomos ou moléculas. Tais técnicas incluem a espectroscopia Raman e de absorção no infravermelho médio (FTIR).

O espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais. A espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utiliza-se da radiação proveniente de uma luz contínua, usualmente na região espectral de 2,5 a 25 μm ou 4000 a 400 cm^{-1} , envolvendo o uso de um interferômetro de Michelson e a posterior transformada de Fourier do interferograma [18].

A espectroscopia Raman utiliza uma fonte de luz monocromática que, ao ser transferida para uma molécula, induz a um espalhamento inelástico na mesma (espalhamento Raman) devido a transferência de energia da molécula ao fóton ou vice-versa. A diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada está relacionada com a energia de vibração dos átomos presentes na amostra.

Como pode ser observado, as técnicas de FTIR e Raman baseiam-se em princípios físicos diferentes e, muitas vezes, apresentam informações distintas sobre o mesmo material, sendo, portanto, técnicas complementares [19]. Uma das vantagens que a espectroscopia Raman apresenta em relação a técnica de FTIR é a baixa influência da água no espectro, tendo em vista que a água é altamente absorvedora no infravermelho.

Ambas as técnicas de espectroscopia vibracional mostraram-se como ferramentas importantes para o estudo bioquímico de células e tecidos biológicos, sendo principalmente empregadas na literatura para diferenciação dos diferentes tipos celulares que se encontram em um mesmo tecido ou órgão, assim como é possível evidenciar o grau de metabolismo celular. Em estudos *in vitro* que envolvem cultura de células, foi possível evidenciar que as técnicas vibracionais podem

diferenciar células neoplásicas das sadias [20]. Estudos *in vivo* evidenciam a possibilidade de diagnóstico de neoplasias e tecidos inflamatórios [21], permitem o diagnóstico não invasivo de lesões cutâneas, além de monitoramento de substâncias empregadas como estratégias de tratamento de lesões de pele, tais como dermo-cosméticos [22].

Por serem técnicas não destrutivas e exigirem uma preparação de amostra relativamente simples, o seu uso também em tecidos mineralizados vem crescendo ao longo dos anos, sendo que ambas as espectroscopias vibracionais já se mostraram eficientes na obtenção de informações sobre o conteúdo mineral, cristalinidade e maturidade do colágeno, indicando o potencial da técnica para a diferenciação de lesões dentárias e ósseas [19].

Atualmente, a combinação de técnicas de espectroscopia vibracional com técnicas de aquisição de imagens por microscopia tem possibilitado a obtenção de mapas bioquímicos dos diferentes tecidos. A então denominada técnica de histopatologia espectral consiste na combinação das técnicas de micro-espectroscopia vibracional e técnicas de análise multivariada, possibilitando a detecção da distribuição das diferentes vibrações moleculares nos tecidos, complementando as atuais análises histopatológicas. Os sistemas atuais de μ -FTIR permitem a construção de imagens com resolução espacial em torno de 6 μ m; os sistemas μ -Raman, contudo, possibilitam a formação de imagens com maior resolução espacial por empregarem região com menor comprimento de onda [22].

Speckle é o nome dado à formação de uma estrutura granular no espaço livre, decorrente de um fenômeno de interferência tipicamente ondulatorio, que ocorre quando um feixe de luz coerente é espalhado ou transmitido por uma superfície com rugosidades da ordem do comprimento de onda da fonte luminosa. Considerando a rugosidade dos tecidos biológicos, e que na maioria das vezes os centros espalhadores encontram-se em movimento (caracterizando o *speckle* dinâmico com flutuações temporais das intensidades), diz-se que, nestes tecidos, este fenômeno é chamado de *biospeckle*.

Por meio da formação de imagens, com registro em um filme ou sensor CCD (*charge-coupled device*), o fenômeno de *biospeckle* é empregado com sucesso para monitoramento da atividade biológica de um tecido em tempo real, com as vantagens de possibilitar uma análise não destrutiva e não invasiva dos tecidos biológicos. Apresenta, também, facilidade de implementação, considerando a simplicidade e o baixo custo de sua montagem experimental, a qual consiste em um laser de baixa potência, um dispositivo CCD de média resolução, lentes, espelhos e polarizadores [23].

A literatura evidencia que a técnica pode ser empregada com sucesso para análise dinâmica na área

de botânica e agricultura, verificando contaminações e grau de degradação das estruturas. Considerando os tecidos biológicos, os estudos *in vivo* evidenciam que trata-se de uma técnica promissora para avaliação do processo de cicatrização e no monitoramento da vascularização em áreas lesionadas [24], proporcionando a avaliação da atividade de fármacos ou de outras técnicas terapêuticas, tais como o uso da laserterapia, nos processos de reparação tecidual. Estudos recentes mostram também a viabilidade da técnica no monitoramento do tempo de coagulação sanguíneo e no estudo de microtremores oculares [25].

A fluxometria Doppler é um método não invasivo para estudar a dinâmica de partículas espalhadoras de luz no decorrer do tempo. Para tal, é necessário o uso de fonte de luz coerente de baixa potência que possa ser retroespalhada pelos tecidos; a luz retroespalhada é coletada e guiada por fibra-óptica até um detector que gera um sinal de fotocorrente.

In vivo, esta técnica permite a medição do fluxo sanguíneo local, além de detectar a velocidade e a concentração das hemácias, com a vantagem da não invasividade e de monitoramento contínuo e em tempo real de variações rápidas de fluxo [24]. Nos tecidos biológicos, os equipamentos disponíveis podem detectar variações de fluxo em até 1 mm de profundidade. Contudo, esta técnica apresenta-se bastante sensível a variações posturais, espaciais, temporais, intra e interindividuais.

Atualmente, as técnicas que empregam este princípio são utilizadas em estudos da microcirculação sanguínea, principalmente nas áreas de angiologia, cirurgia plástica, reumatologia, dermatologia e em odontologia [26].

A tomografia por coerência óptica (OCT – *Optical Coherence Tomography*) é uma técnica de diagnóstico que produz imagens de um corte transversal, com alta resolução espacial, de microestruturas internas de um tecido vivo [27] de forma não invasiva. A primeira aplicação em medicina foi divulgada há duas décadas [28]. Na pele e em outros tecidos altamente espalhadores, a técnica de OCT permite construir imagens de pequenos vasos sanguíneos e outras estruturas numa faixa de 1-2 mm abaixo da superfície, por sua característica não invasiva e por não utilizar radiação ionizante. A técnica tem sido aplicada com sucesso em odontologia, no diagnóstico precoce de lesões de cárie [29]. A tomografia por coerência óptica é baseada no processo de interferometria óptica que ocorre entre a luz que incide em um tecido e a luz de um espelho de referencia de um interferômetro de Michelson; o sinal interferométrico é detectado e decodificado para formação das imagens. Como a fonte de luz utilizada no interferômetro possui baixa coerência temporal, as estruturas internas do tecido podem também ser determinadas, formando imagens

morfológicas equivalentes às obtidas pelos exames de lâminas histológicas ao microscópio. Outra característica interessante desta técnica é que ela pode fazer uso do *biospeckle* e da fluxometria *Doppler*, descritos acima, e das características de polarização para medidas de estruturas birrefringentes [30].

A termografia utiliza a região infravermelha do espectro eletromagnético para realizar imagens de tecidos biológicos e está baseada no princípio de que um corpo emite radiação infravermelha proporcional à sua temperatura (radiação de corpo negro). A aparência e o funcionamento de uma câmera termográfica moderna é semelhante a uma câmera de vídeo. O termograma revela variações de temperatura tão claramente que podem ser utilizados para diagnóstico de várias doenças. Essas câmeras utilizam sensores matrizes que respondem a comprimentos de onda mais longos (de médio e longo comprimento de onda infravermelho). Os tipos mais comuns são InSb, InGaAs, HgCdTe e QWIP FPA. As suas imagens são tipicamente de 160x120 ou 320x240 pixels, podendo chegar até 640x512 para os modelos mais caros [31]. Como método diagnóstico na área da Saúde, ela faz uso do princípio de que a atividade metabólica e de circulação vascular nos tecidos resultam em diferentes temperaturas. Tumores cancerígenos, por exemplo, requerem um fornecimento maior de nutrientes e, portanto, um aumento na circulação de suas células, mantendo os vasos sanguíneos existentes dilatados, e também dando origem a novos vasos (neoangiogênese). Toda essa atividade acarreta em uma maior temperatura local, que pode ser detectada pelas câmeras termográficas.

A microscopia confocal, que é uma variação da microscopia tradicional, é uma técnica de imagem óptica que utiliza, para aumentar a resolução óptica e contraste de uma micrografia, a iluminação pontual e um *pinhole* espacial para eliminar a luz fora de foco em amostras que são mais espessas do que o plano focal [32]. Ela permite a reconstrução de estruturas tridimensionais a partir das imagens obtidas em diferentes planos focais consecutivos sendo interessante. Apesar da sua longa história, esta técnica tem se tornado um instrumento prático com aplicações bem definidas nas áreas da Saúde. Entre estas aplicações, pode-se citar a obtenção de imagens valiosas de amostras, monitoramento de processos biológicos, informação computadorizada tridimensional em pesquisa biomédica, além da análise química e de materiais, permitindo a localização tridimensional de estruturas e moléculas marcadas com fluoróforos [32].

O microscópio de Raman é um dispositivo baseado em microscópio óptico convencional que utiliza um laser como fonte de iluminação e realiza espectroscopia Raman [33]. O microscópio Raman utiliza a

propriedade de espalhamento da luz pelos materiais, quando um foton é espalhado por uma molécula, existe uma probabilidade deste sofrer um alteração na sua frequência, ou energia, que é dependente da molécula espalhadora. Adicionando filtros, ou um espectrômetro acoplado a uma (CCD), ou ainda um detector simples, como fotomultiplicadoras, é possível construir com sistemas de varredura, imagens espectroscópicas que dependem da composição molecular do tecido analisado, sendo uma importante ferramenta de diagnóstico nas áreas biomédicas.

TENDÊNCIAS FUTURAS

Um campo em crescente expansão é o desenvolvimento de novas fontes de luz para terapia com luz de baixa potência. Recentemente, pesquisadores chineses desenvolveram um “tecido luminoso” 3-D, composto de fibras ópticas poliméricas flexíveis e LEDs, para ser usado sobre injúrias do corpo humano no tratamento de enfermidades de origem variada [34]. Capacetes, escovas de cabelo e de dentes emissoras de luz também se encontram em prospecção, além de irradiadores para o corpo inteiro.

O campo de pesquisa em biossensores é também relativamente novo e com grandes perspectivas, principalmente na tentativa de monitorar produtos em diferentes tipos de análises com aplicações em Saúde pública. Biossensores são dispositivos analíticos, sem marcadores, que integram uma biocamada, um transdutor elétrico, elementos de condicionamento e processamento do sinal elétrico. O objetivo de um biossensor é produzir um sinal elétrico que é proporcional em magnitude ou frequência à concentração do analito (que pode ser gás, líquido ou sólido) [35]. Há diferentes tipos de biossensores, entre eles, os biossensores ópticos, que se baseiam em mudanças nas propriedades ópticas das substâncias, com o objetivo de monitorar a concentração do analito. Entre as propriedades ópticas que podem ser utilizadas estão a absorção, o índice de refração, a fluorescência, a fosforescência, a refletividade e comprimento de onda. As principais vantagens dos biossensores ópticos são a possibilidade de miniaturização (através de circuitos micro-optofluidicos), a velocidade de resposta (de minutos a horas), a facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético, boa biocompatibilidade e não há necessidade de elementos ativos definidos na biocamada, além da possibilidade de aplicação *on line* [35].

Pinças ópticas são instrumentos científicos que utilizam lasers extremamente focalizados para manipular pequenos objetos dielétricos sem contato, que têm sido principalmente aplicadas em experimentos de biologia celular nos últimos anos. As pinças ópticas são

as únicas ferramentas capazes de manipular amostras em escala nanométrica e realizar medições de força em moléculas individuais e organelas dentro da célula viva, sem destruir a amostra e sem a necessidade de inserção de uma sonda não endógena. Até hoje, relatos na literatura em experimentos *in vivo* foram realizados em culturas de células em 2D ou micro-organismos unicelulares. Já que a radiação laser tem a capacidade de penetrar profundamente no tecido biológico na região do vermelho e infravermelho próximo, espera-se que pinças ópticas possam ser utilizadas no futuro para investigar a mecânica também de organismos pluricelulares ou em profundidade de tecido, além de fundamentar o mecanismo e a mecânica que regem a condução nervosa e o desenvolvimento de doenças neuronais [36].

A associação de técnicas ópticas com outras técnicas, como ultrassom, também se encontram em prospecção e o campo de pesquisa nessa área é amplo [37].

Finalmente, com o advento da nanotecnologia, muitas questões-chave para os distúrbios biológicos poderão ser respondidas, com consequente melhoria para a saúde da população, seja através de um diagnóstico precoce ou de uma terapia localizada através da liberação de fármacos.

A nanotecnologia envolve a criação de qualquer material, sistema ou dispositivo através da manipulação da matéria em escala diminuta, com dimensões de 1 a 100 nm. Nanomateriais são definidos como pequenos objetos que se comportam como uma unidade inteira com relação ao seu transporte e propriedades. Além disso, nanomateriais apresentam propriedades eletrônicas, ópticas, químicas e magnéticas únicas, e distintas de partículas maiores do mesmo material. Portanto, fenômenos biológicos podem ser explorados por precisamente controlar e aproveitar estas propriedades únicas dos nanomateriais.

Vários tipos de nanopartículas (metálicas- Ag e Au), cristalinas (*up conversion*- NaYF₄ dopada com terras raras) e semicondutoras- *quantum dots*) podem ser funcionalizadas (marcadas com moléculas específicas) para aplicação na óptica biomédica, seja como agente de contraste para melhorar a resolução na captação de sinais e imagens, ou como veículo para liberação de fármacos em sítios específicos [38]. Além disso, particularmente as nanopartículas metálicas mostram aumento de rendimento de oxigênio singleto [39], que otimizará o efeito fotodinâmico na destruição de células tumorais e micro-organismos.

Sem dúvida, a proeza mais recente com o crescimento do campo da nanobiofotônica é a área da teranóstica, que tem como objetivo unir a terapia e o diagnóstico em um único *scaffold* [40] e se encontra em franca expansão. No entanto, vale ressaltar que o uso de nanopartículas na óptica biomédica ainda se encontra

em estágio laboratorial e/ou pré-clínico. Mais estudos nessa área devem ser realizados antes da utilização de nanomateriais na prática clínica.

REFERÊNCIAS

- 1- Roelandts R. The history of phototherapy: something new under the sun? *Journal of American Academy of Dermatology*. 2002; 46:926-930.
- 2- Niemz MH. *Laser-tissue interactions. Fundamentals and Applications*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996.
- 3- Garcez AS, Ribeiro MS, Núñez SC. *Laser de baixa potência. Princípios básicos e aplicações clínicas na Odontologia*, Elsevier Rio de Janeiro, 2012.
- 4- Silva MPG, Nascimento MJ. *Fototerapia no tratamento das hiperbilirrubinemias neonatais*. *Revista de Enfermagem UNISA*. 2006; 7: 44-47.
- 5- Mester E, Szende B, Gartner P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiology and Radiotherapy*. 1968; 9:621-626.
- 6- Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 1999; 49:1-17.
- 7- Spittler R, Berns MW. Comparison of laser and diode sources for acceleration of *in vitro* wound healing by low-level light therapy. *Journal of Biomedical Optics*. 2014; 19:38001.
- 8- Lanzafame RJ, Blanche RR, Bodian AB, Chiacchierini RP, Fernandez-Obregon A, Kazmirek ER. The growth of human scalp hair mediated by visible red light laser and LED sources in males. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2013; 45:487-95.
- 9- Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics & Lasers in Medicine*. 2012; 1:267-286.
- 10- Huang YY, Gupta A, Vecchio D, de Arce VJ, Huang SF, Xuan W, Hamblin MR. Transcranial low level laser (light) therapy for traumatic brain injury. *Journal of Biophotonics*. 2012; 5:827-837.
- 11- Nelson JS, McCullough JL, Berns MW. Principles and applications of photodynamic therapy in dermatology. Em: K.A. Arndt, J.S. Dover and S.M. Olbright, editors. *Lasers in cutaneous and aesthetic surgery*. Filadélfia: Lippincott-Raven; 1997. p. 349-382.
- 12- Núñez SC, Ribeiro MS, Garcez AS. *Terapia fotodinâmica antimicrobiana na Odontologia*, Elsevier Rio de Janeiro, 2012.
- 13- Hanout M, Ferraz D, Ansari M, Maqsood N, Kherani S, Sepah YJ, Rajagopalan N, Ibrahim M, Do DV, Nguyen QD. Therapies for neovascular age-related macular degeneration: current approaches

- and pharmacologic agents in development. *BioMed Research International*. 2013; 2013:830837.
- 14- Bachmann L, Zezell DM, Ribeiro AC, Gomes L, Ito AS. Fluorescence spectroscopy of biological tissues – a review. *Appl Spectroscopy Reviews* 2006; 41: 575-590.
 - 15- Lins, ECC. Espectroscopia da fluorescência na citricultura. [tese] São Carlos: Universidade de São Paulo; 2009.
 - 16- Francisco AL, Correr WR, Azevedo LH, Kern VG, Pinto CA, Kowalski LP, Kurachi C. Fluorescence spectroscopy for the detection of potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*. 2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.03.009>.
 - 17- Zezell DM, Ribeiro AC, Bachmann L, Gomes AS, Rousseau C, Girkin J. Characterization of natural carious lesions by fluorescence spectroscopy at 405-nm excitation wavelength. *Journal of Biomedical Optics*. 2007; 12: 064013.
 - 18- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed. USA: Brooks Cole; 1997.
 - 19- Gamsjäger S, Zoehrer R, Roschger P, Fratzl P, Klaushofer K, Mendelsohn R, Paschalis EP. Vibrational spectroscopy in biomedical science: bone. In: *Proceedings of SPIE*. 2009; 7166: 716602–716602–15.
 - 20- Mostaco-Guidolin LB, Murakami LS, Nomizo A, Bachmann L. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Skin Cancer Cells and Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2009; 44: 438-455.
 - 21- Garcia-Flores AF, Raniero L, Canevari RA, Jalkanen KJ, Bitar RA, Martinho HS, Martin AA. High-wavenumber FT-Raman spectroscopy for in vivo and ex vivo measurements of breast cancer. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2011; 130: 1231-1238.
 - 22- Teixeira AP, Rangel JL, Raniero LJ, Tosato MG, Fávero PP, Martin AA. Confocal Raman spectroscopy: determination of natural moisturizing factor profile related to skin hydration. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*. 2014; 30: 11-16.
 - 23- Pereira TM, Zezell DM, Bird B, Miljkovic M, Diem M. The characterization of normal thyroid tissue by micro-FTIR spectroscopy. *Analyst*. 2013; 138: 7094-7100.
 - 24- Silva ER. Estudo das propriedades do *biospeckle* e suas aplicações. [Dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007.
 - 25- Humeau-Heurtier A, Guerreschi E, Abraham P, Mahe G. Relevance of Laser Doppler and Laser Speckle Techniques for Assessing Vascular Function: State of the Art and Future Trends. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2013; 60: 659-666.
 - 26- Kenny E, Coakley D, Boyle G. Biospeckle in the human sclera and impact on laser speckle correlation measurement of eye tremor. *Journal of Biomedical Optics*. 2013; 18: 097009.
 - 27- Salles AWR, Salles AMC, Nogueira GEC. Laser Doppler Blood-Flow Signals from Human Teeth during an Alignment and Leveling Movement Using a Superelastic Archwire. *IRSN Dentistry*. 2013;1-6.
 - 28- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, Fujimoto JG. Optical coherence tomography. *Science*. 1991; 254:1178-1181.
 - 29- Fercher AF, Hitzinger CK, Drexler W, Kamp G., Sattmann H. In vivo optical coherence tomography. *American Journal of Ophthalmology*. 1993; 116:113-114.
 - 30- Freitas AZ, Amaral MM, Raelle MP. Optical coherence tomography: development and applications. Em: F. J. Duarte, editor. *Laser Pulse Phenomena and Applications*. 1ed. Austria:I-Tech Education and Publishing, 2010, p. 409-432.
 - 31- X. Maldague, P. O. Moore. *Nondestructive handbook, infrared and thermal testing*. Columbus, Ohio, ASNT Press, 2001.
 - 32- Pawley JB. *Handbook of biological confocal microscopy* (3rd ed.). Berlin: Springer, 2006.
 - 33- Andersen ME, Muggli RZ. Microscopical techniques in the use of the molecular optics laser examiner Raman microprobe. *Analytical Chemistry*. 1981; 53:1772–1777.
 - 34- Shen J, Chui C, Tao X. Luminous fabric devices for wearable low-level light therapy. *Biomedical Optics Express*. 2013; 4: 2925-2937.
 - 35- Moreira CS, Lima AMN, Neff H, Barreto Neto AG, Loureiro FCCL, de Souza Filho CA, Lima Junior LHC. *Biosensores: tecnologia e aplicações*. Disponível em: <http://connepi.ifal.edu.br/ocs/anais/conteudo/anais/files/conferences/1/schedConfs/1/papers/1920/public/1920-5801-1-PB.pdf>.
 - 36- Norregaard K, Jauffred L, Berg-Sørensen K, Oddershede LB. Optical manipulation of single molecules in the living cell. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2014; doi: 10.1039/c4cp00208c.
 - 37- Li X, Li J, Jing J, Ma T, Liang S, Zhang J, Mohar D, Raney A, Mahon S, Brenner M, Patel P, Shung KK, Zhou Q, Chen Z. Integrated IVUS-OCT imaging for atherosclerotic plaque characterization. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 2014; 20:7100108.
 - 38- Jha RK, Jha PK, Chaudhury K, Rana SV, Guha SK. An emerging interface between life science and nanotechnology: present status and prospects of repro-



XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica
XXIV Brazilian Congress on Biomedical Engineering

A Engenharia Biomédica como Propulsor de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Saúde

13 a 17 de outubro de 2014 — Center Convention, Uberlândia, MG, Brasil



- ductive healthcare aided by nano-biotechnology. Nano Reviews. 2014; doi: 10.3402/nano.v5.22762.
- 39- de Melo LS, Gomes AS, Saska S, Nigoghossian K, Messaddeq Y, Ribeiro SJ, de Araujo RE. Singlet oxygen generation enhanced by silver-pectin nanoparticles. Journal of Fluorescence. 2012; 22:1633-1638.
- 40- Prabhu P, Patravale V. The upcoming field of theranostic nanomedicine: an overview. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2012; 8:859-882.