



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS E CIÊNCIAS EXATAS



Trabalho de Conclusão de Curso

Curso de Graduação em Física

TERAPIA FOTODINÂMICA E LUZ BRANCA: ASPECTOS ANALÍTICOS E  
PERSPECTIVAS DA VIABILIDADE DO TRATAMENTO

Michelle Barreto Requena

Prof. Dr. Gerson Antônio Santarine

Rio Claro (SP)

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Campus de Rio Claro

MICHELLE BARRETO REQUENA

TERAPIA FOTODINÂMICA E LUZ BRANCA: ASPECTOS  
ANALÍTICOS E PERSPECTIVAS DA VIABILIDADE DO  
TRATAMENTO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas -  
Campus de Rio Claro, da Universidade  
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para  
obtenção do grau de Bacharel em Física.

Rio Claro - SP

2012

535            Requena, Michelle Barreto  
R427t            Terapia fotodinâmica e luz branca : aspectos analíticos e perspectivas  
da viabilidade do tratamento / Michelle Barreto Requena. - Rio Claro :  
[s.n.], 2012  
51 f. : il., figs., tabs. + 1 CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física) - Universidade  
Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas  
Orientador: Gerson Antônio Santarine

1. Óptica. 2. Física experimental. 3. LED. 4. Photogem. 5.  
Fotossensibilizador. I. Título.

À Deus, meus pais, namorado, amigos e professores,  
sem os quais esse trabalho não existiria.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, saúde, força e oportunidades ao longo da graduação.

Aos meus pais, João Carlos e Maria Isaura, meu irmão Matheus, que sempre me incentivaram e apoiaram nos estudos, estiveram ao meu lado em todos os momentos. Minha eterna gratidão e amor incondicional.

Ao meu namorado Gabriel, que assistiu de perto todas minhas conquistas e principalmente, todas as dificuldades durante a graduação. O mais insistente em me deixar feliz e o mais compreensivo, sempre!

À minha amiga Carla, quem eu considero como uma irmã, por dividir uma vida por quatro anos da graduação, com quem ri, chorei, gastei, engordei, sonhei em diversos momentos, foram memórias que jamais esquecerei. Sei que é uma amiga que terei além da faculdade.

À minha amiga Sabrina, companheira de bacharel, pelas diversas manhãs, tardes e noites de estudos, sempre regadas a conversas e risadas, pelas festas e viagens que fomos. Uma das pessoas mais sinceras que conheço, uma amizade que prezo muito e espero que dure por vários anos.

Ao Tárcius, por se tornar meu amigo tão inesperadamente. Sempre sereno, agradeço a companhia, conversas e auxílio nos estudos.

Ao Leandro, pelos anos que fizemos iniciação científica juntos e a amizade que tentamos manter a distância.

Aos amigos: Cristiane, Fernanda, Guilherme, Kauê, Larissa, Kelly, Carol, Mirian, Tamires e Paulo, pelos momentos que tivemos ao longo do curso, aqueles de quem eu guardo lembranças muito felizes e consideração.

Às amigas Nathália Tonheiro, Thamires, Natália Turri e Lara, que mesmo com a distância e o tempo sem contato, compartilharam diversos momentos importantes durante a graduação, pessoas inesquecíveis.

Aos professores Vanderlei e Cristina, pelos ensinamentos e por contribuírem para meu amadurecimento e sucesso neste trabalho, com ideias e motivação.

Ao professor Gerson, por aceitar o convite de orientação neste trabalho.

Aos amigos que fiz no laboratório de Biofotônica, pela amizade e auxílio no projeto, principalmente: José Dirceu, Lilian, Sebastião, Layla, Hilde, Natália, Ana Paula e Clóvis, por quem eu tenho um carinho muito especial. Além das colegas: Miriam, Dilleys, Cintia e Patrícia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Nacional de Óptica e Fotônica (INOF) e ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica, pelo apoio financeiro durante três anos de Iniciação Científica.

“Penso e raciocino durante meses e anos. Noventa e nove vezes a conclusão a que chego é errada. Na centésima vez, acerto.”

Albert Einstein

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	9
2.	EMBASAMENTO TEÓRICO .....	11
2.1	Terapia Fotodinâmica .....	11
2.2	Fotossensibilizador .....	12
2.3	Fonte de luz.....	14
2.4	Oxigênio molecular.....	15
3.	OBJETIVOS .....	17
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1	Fotossensibilizador .....	18
4.2	Fonte de luz.....	19
4.3	Fotodegradação .....	23
4.4	Penetração da luz .....	25
4.5	Modelo de dose limiar .....	26
4.6	Modelo para profundidade de necrose .....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	Fotodegradação .....	35
5.2	Penetração da luz .....	36
5.3	Modelo de dose limiar .....	39
5.4	Modelo para profundidade de necrose.....	41
6.	CONCLUSÃO .....	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
	APÊNDICE A - Rotina para conversão de unidades .....	48
	APÊNDICE B – Rotina de profundidade de necrose: dose limiar.....	49
	APÊNDICE C – Rotina de profundidade de necrose: fótons absorvidos .....	50



## RESUMO

Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica utilizada para o tratamento de diversos tipos de lesões, como câncer, controle microbiológico, casos odontológicos e estéticos. A realização da TFD consiste no uso de um fotossensibilizador (FS), que ficará localizado principalmente nas células alteradas e será irradiado com luz visível. Este processo, quando ocorre na presença de oxigênio, desencadeia a formação de espécies reativas de oxigênio, que são citotóxicas para as células. Estas espécies provocam a morte celular e subsequente necrose tumoral. A utilização da luz branca como fonte de luz multiespectral para Terapia Fotodinâmica e suas consequências ao efeito fotodinâmico ainda não são completamente estabelecidas, e por isso há interesse no estudo dos parâmetros envolvidos para análise das melhores condições de aplicação do tratamento. O comprimento de onda é crucial para melhorar o efeito terapêutico, pois as propriedades ópticas tanto do tecido biológico quanto do FS dependem destes parâmetros. Para o FS estudado neste trabalho (Photogem<sup>®</sup>), são mais frequentemente utilizados comprimentos de onda na região do vermelho, por apresentarem maior profundidade de penetração no tecido biológico. Deste modo, a fonte de luz torna-se um aspecto fundamental, sua escolha depende da aplicação específica e é feita com base na localização do tumor, dose de luz a ser entregue e FS escolhido. Apesar de todas as vantagens apresentadas pelos lasers, o fato de possuírem um espectro de emissão essencialmente monocromático faz com que apenas uma das possibilidades de transição possíveis para a absorção dos FS seja aproveitada. Por isso, fontes de luz mais extensas, como os diodos emissores de luz (LED), poderiam ser melhor aproveitadas em alguns casos que o laser, com a vantagem adicional de um custo reduzido. Portanto, a escolha do LED branco advém de um espectro de emissão ainda mais amplo que os LED de cores definidas, permitindo maior aproveitamento das diferentes bandas de absorção e com profundidades variadas de atuação, de acordo com o comprimento de onda. Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar o comportamento da luz branca em tecido biológico, buscando uma melhor compreensão de seus efeitos na TFD com o uso de um derivado de hematoporfirina. Para a compreensão dos parâmetros envolvidos foram realizados: experimentos *in vitro* de fotodegradação e análise da profundidade de penetração da luz em *phantoms*, um modelo teórico sobre dose limiar e profundidade de necrose em TFD. Os experimentos de fotodegradação e penetração da luz permitiram entender a interação do LED branco com o Photogem<sup>®</sup>. A grande vantagem da obtenção dos modelos é permitir que se realize o cálculo para uma fonte de luz, FS e tecido escolhidos para um determinado tratamento, e assim, manipular os dados e indicar qual a melhor combinação possível. Há previsões para realização de TFD com LED branco em animais para comparar com os dados dos modelos. Os resultados obtidos ao longo deste estudo mostraram que o uso de luz branca em TFD é possível e que apresenta perspectivas de sucesso clínico. Espera-se que esta combinação possa ser melhor entendida para o aperfeiçoamento do tratamento.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, LED, Photogem<sup>®</sup>, fotossensibilizador, luz branca.

## ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a technique used to treat several types of lesions, such as cancer, microbial control, and esthetic dentistry cases. The performance of PDT involves the use of a photosensitizer (PS), which mainly will be located in cancer cells and is irradiated with visible light. This process, when it occurs in the presence of oxygen triggers the formation of reactive oxygen species that are cytotoxic to cells. These species cause cell death and subsequent tumor necrosis. The use of white light as a light source for multispectral Photodynamic Therapy and its consequences to the photodynamic effect is not yet completely established, and therefore there is interest in studying the parameters involved for analyzing the best conditions for applying treatment. The wavelength is crucial to improve the therapeutic effect, since both the optical properties of the biological tissue as the PS depend on these parameters. For FS studied in this work (Photogem<sup>®</sup>) are most often used wavelengths in the red region, due to their larger penetration depth in biological tissue. Thus, the light source becomes a fundamental aspect, their choice depends on the specific application and is based on the tumor location, light dose to be delivered and FS chosen. Despite all the advantages presented by lasers, the fact of having an emission spectrum essentially monochrome makes only one possible transition possible for the absorption of FS is used. Therefore, more extensive light sources such as light emitting diodes (LED), could be better used in some cases the laser, with the additional advantage of a reduced cost. Therefore, the choice of the white LED comes from an emission spectrum that still wider LED colors defined by allowing greater use of the several absorption bands and with varying depths of operation, according to the wavelength. This study aims to evaluate the behavior of white light in biological tissue, seeking a better understanding of its effects on PDT with the use of a derivative of hematoporphyrin. For the understanding of the parameters involved were carried out: Experiments in vitro photodegradation and analysis penetration depth of light at phantoms, a theoretical model of threshold dose and depth of necrosis in PDT. The photodegradation experiments and allow light penetration to understand the interaction of white LED with Photogem<sup>®</sup>. The great advantage of obtaining models is to allow the calculation to take place a light source, FS and tissue selected for a particular treatment, and thus manipulate the data and recommend the best possible combination. There are forecasts for performing PDT white LED in animals to compare with the data models. The results obtained during this study showed that the use of white light in PDT is possible and which has prospects for clinical success. It is expected that this combination can be better understood for improvement of treatment.

Keywords: Photodynamic therapy, LED, Photogem<sup>®</sup>, photosensitizer, light white.

## 1. INTRODUÇÃO

A Terapia fotodinâmica (TFD) envolve o uso de um fotossensibilizador (FS), capaz de se localizar preferencialmente em um tecido tumoral, e que é ativado por luz de comprimento de onda específico desencadeando uma sequência de eventos fotoquímicos e fotobiológicos que causam danos irreversíveis ao tecido.

O estudo de TFD para aplicações oncológicas, teve início em 1960 com estudos de R. L. Lipson e S. Schwartz na Clínica Mayo, quando observaram que injeções de solução pura de hematoporfirina durante uma cirurgia levava à fluorescência das lesões neoplásicas. Em busca de uma melhor localização dos tumores, Schwartz preparou a hematoporfirina com ácidos acético e sulfúrico e essa mistura passou a ser chamada de “derivado de hematoporfirina”<sup>1</sup>.

Estudos pré-clínicos foram feitos por 25 anos para avaliar a indicação da TFD para o tratamento de alguns cânceres. Desde 1993 foi aprovado no Canadá, Holanda, Alemanha, Japão e Estados Unidos o uso de derivado de hematoporfirina comercial (Photofrin<sup>®</sup>) em pacientes em estágio inicial e avançado de câncer de pulmão, de trato digestivo e geniturinário. Clinicamente, a TFD já vem sendo empregada no tratamento dos seguintes casos de câncer: bexiga, pulmão, pele (primário e metastático do seio), intestino, trato digestivo superior, entre outros, além da detecção e delimitação de lesão por medidas fluorescência do tecido após a administração do FS<sup>2</sup>.

A TFD tem como vantagem em relação a outros tratamentos: possuir poucos efeitos colaterais (fotossensibilidade temporária), ser pouco invasiva e, na maior parte dos casos, não necessitar de centro cirúrgico para realização da terapia. Atualmente, diversos países já possuem protocolos bem estabelecidos para alguns tratamentos:

- ❖ Nos Estados Unidos: tratamento paliativo para pacientes com tumores totalmente obstrutivos e cânceres de esôfago parcialmente obstrutivos onde a Terapia a laser seja considerada imprópria; também certos tipos específicos de câncer de pulmão;
- ❖ No Canadá: câncer de esôfago, câncer recorrente de bexiga, redução de tumores obstrutivos, e tratamento paliativo de disfagia em pacientes com câncer de esôfago completamente ou parcialmente obstrutivos;
- ❖ Na França e Holanda: tratamento de câncer de pulmão e esôfago;

- ❖ No Japão: câncer de pulmão em estágio inicial, cânceres gástricos superficiais e em estágio inicial, câncer cervical em estágio inicial, displasia cervical;
- ❖ Na Holanda: câncer de pulmão obstrutivo e em estágio inicial, câncer gástrico e cervical (incluindo displasia cervical), e cânceres superficiais gástricos e de esôfago<sup>3</sup>;
- ❖ No Brasil, aplicação clínica de TFD é resultado de um trabalho pioneiro em um programa de colaboração que envolve o Instituto de Física de São Carlos (USP) e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) e do Hospital do Câncer Amaral Carvalho na cidade de Jaú, São Paulo. Este trabalho começou em 1997 com o primeiro paciente tratado em 1999. Até o final de 2003 este programa já havia tratado mais de 300 pacientes, a maioria das lesões foi de melanoma cancro da pele na região da cabeça e pescoço, mas o grupo tem também tratamentos em esôfago, bexiga, ginecológicos, recorrência do câncer da mama na parede torácica, entre outros<sup>4</sup>. Estudos e tratamentos em várias aplicações da Terapia estão sendo realizados atualmente<sup>5; 6; 7; 8</sup>.

Atualmente, as limitações da TFD estão relacionadas com a quantificação da distribuição de luz, das propriedades ópticas, da concentração de fotossensibilizador e de oxigênio no tecido. O sucesso da TFD envolve o aperfeiçoamento desses fatores.

O comprimento de onda é crucial para melhorar o efeito terapêutico, pois as propriedades ópticas tanto do tecido biológico quanto do fotossensibilizador dependem destes parâmetros. Para o fotossensibilizador estudado neste trabalho (Photogem<sup>®</sup>), são mais frequentemente utilizados comprimentos de onda na região do vermelho, por apresentarem maior profundidade de penetração no tecido biológico. Deste modo, a fonte de luz torna-se um aspecto fundamental, sua escolha depende da aplicação específica e é feita com base na localização do tumor, dose de luz a ser entregue e fotossensibilizador escolhido.

Quanto maior a eficiência da fotoativação e da absorção de fótons pela molécula de fotossensibilizador, melhores são os resultados obtidos pela TFD. É interessante buscar a melhor sobreposição do espectro de absorção do FS com o espectro de emissão da luz.

A distribuição da luz em cada comprimento de onda é outro fator interessante a ser estudado ao tratar-se de uma fonte de espectro amplo, uma vez que a análise de características como profundidade de penetração e quantidade de energia entregue em cada região é distribuída de forma diferente ao longo do espectro.

## 2. EMBASAMENTO TEÓRICO

### 2.1 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica envolve o uso de um fotossensibilizador, uma fonte de luz e o oxigênio molecular presente no tecido biológico, como descrito na Figura 1.



Figura 1 - Principais componentes da Terapia Fotodinâmica.

O tratamento consiste na administração ou indução da produção de um fotossensibilizador, que ficará localizado principalmente nas células alteradas e será irradiado com luz visível, na presença de oxigênio, desencadeando reações de espécies moleculares, radicais livres e/ou oxigênio singlete, que são citotóxicas. Estas espécies citotóxicas provocam a morte celular e subsequente necrose tumoral<sup>9</sup>.

Na Figura 2, o Diagrama de Jablonski representa as etapas da TFD, desde a excitação do FS até as suas interações possíveis com o tecido biológico, resultando na morte celular por necrose ou apoptose<sup>10</sup>.

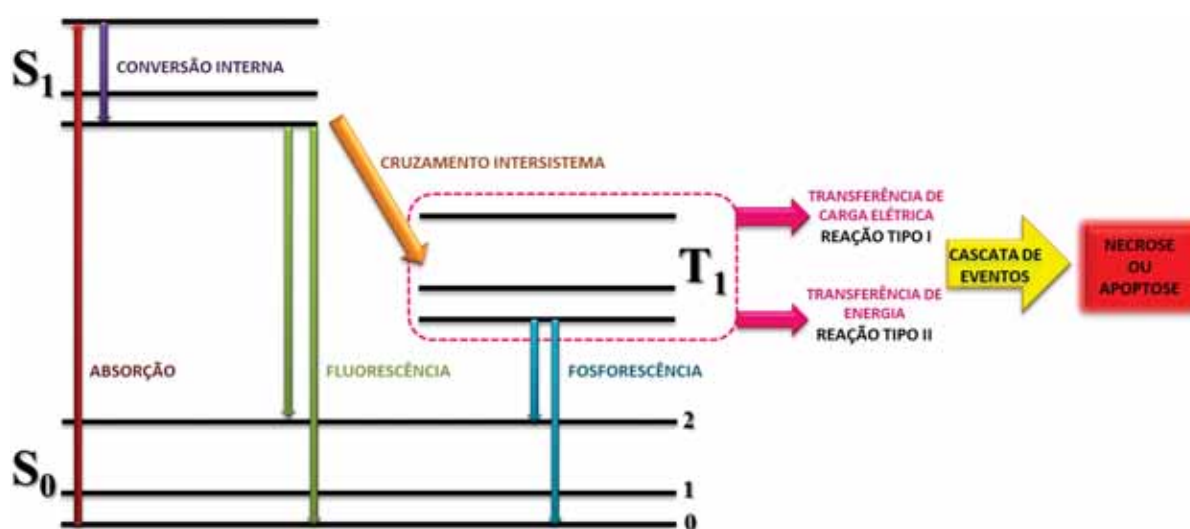


Figura 2 - Diagrama de Jablonski adaptado<sup>11</sup>.

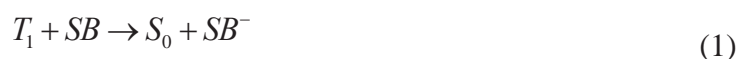
Com a excitação da luz há o fornecimento de energia ao sistema. A molécula absorve esta energia e passa do estado fundamental ( $S_0$ ) para um estado mais energético ( $S_1$ ), sendo ambos os estados singletos.

Por conversão interna, há o decaimento até o menor nível vibracional dentro do estado excitado. Surgem então duas possibilidades: decair para o estado fundamental emitindo fluorescência ou, por cruzamento intersistema, passar para o estado tripleto ( $T_1$ ) que, por sua vez, ao decair para o estado fundamental emite fosforescência<sup>12</sup>.

Para a Terapia Fotodinâmica o importante são os resultados do cruzamento intersistema, uma vez que o fotossensibilizador no estado tripleto é capaz de interagir com as biomoléculas e causar oxidações, gerando fotoprodutos citotóxicos ou espécies reativas de oxigênio (EROs). Acredita-se que existam dois tipos dominantes de reações para sua formação de espécies reativas de oxigênio para TFD:

#### ❖ Reação TIPO I (via Formação de radicais)

Neste tipo de reação o fotossensibilizador no estado excitado tripleto ( $T_1$ ) pode interagir com o substrato biológico ( $SB$ ) de duas formas, transferindo elétrons na equação (1) ou abstraindo um átomo de hidrogênio, na equação (2):



sendo ( $S_0$ ) a representação do fotossensibilizador no estado fundamental.

#### ❖ Reação TIPO II (via Formação de oxigênio singleto)

Em reações deste tipo, o fotossensibilizador no estado excitado (tripleto) transfere energia para o oxigênio molecular no estado fundamental ( $^3O_2$ ) produzindo oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), segundo a equação (3),



A espécie de oxigênio produzida é altamente citotóxica e desencadeia danos celulares responsáveis pela morte da célula.

## 2.2 Fotossensibilizador

São denominados fotossensibilizadores substâncias que apresentam sensibilidade à luz. Para serem considerados viáveis para o tratamento os fotossensibilizadores devem possuir certas características:

- i) Ser solúvel e permanecer estável em solução aquosa a pH fisiológico para permitir circulação e acúmulo seletivo nas células;
- ii) Apresentar seletividade quanto à retenção por células malignas após algumas horas da introdução da droga na corrente sanguínea;
- iii) Ter habilidade para o transporte passivo ou ativo dentro das células;
- iv) Possuir alto rendimento quântico (facilidade para absorver ou emitir fótons) nos estados tripleto ou singleto;
- v) Não ser tóxico a níveis terapêuticos, com mínima morbidez para o indivíduo;
- vi) Ser metabolizado rapidamente, minimizando possíveis efeitos colaterais<sup>13</sup>.

Existem diversos tipos de fotossensibilizadores, classificados em FS de primeira, segunda e terceira geração.

Os fotossensibilizadores de primeira geração são os derivados de hematoporfirina (Photofrin<sup>®</sup>, Estados Unidos; Photosan<sup>®</sup>, Alemanha; Photogem<sup>®</sup>, Rússia).

Entre os fotossensibilizadores de segunda geração se destacam as clorinas (porfirina reduzida) que possuem maior rendimento quântico de formação de oxigênio singleto; e as ftalocianinas (derivados de porfirina) que devido ao caráter aromático aumentado possuem melhor absorção em comprimentos de onda acima de 650 nm<sup>14</sup>.

Já os fotossensibilizadores de terceira geração são as substâncias sintetizadas a partir de outras já existentes, modificadas com conjugados de anticorpos, conjugados biológicos e outros<sup>15</sup>.

Na Figura 3, está representada a estrutura monomérica do fotossensibilizador utilizado neste trabalho, o Photogem<sup>®</sup>, um derivado de hematoporfirina, cuja fórmula é representada por  $[C_{34}H_{38}N_4O_6]_n$  e o peso molecular variando de 598 g/mol a 2920 g/mol. Nos radicais R1 e R2 ligam-se  $CH(OH)CH_3$ ,  $CH=CH_2$  ou a própria estrutura monomérica da porfirina e nos ligantes R3 e R4 ligam H ou também a própria estrutura monomérica da porfirina podendo formar dímeros, trímeros e oligômeros<sup>13</sup>.

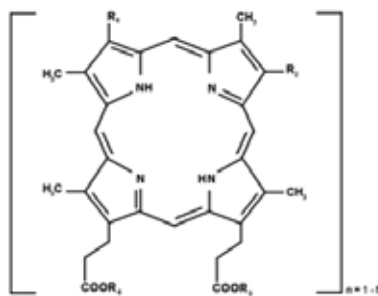


Figura 3 - Estrutura monomérica do Photogem<sup>®</sup>.

### 2.3 Fonte de luz

A melhor fonte de radiação empregada em TFD, pode ser descrita como a que por um baixo custo forneça a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do fotossensibilizador, sem efeitos térmicos significativos<sup>3</sup>.

Enquanto o laser possui um feixe monocromático, lâmpadas e LEDs possuem um espectro de emissão em uma determinada região de comprimentos de onda, sendo o da lâmpada consideravelmente maior que o do LED.

Em geral, o laser é a fonte mais tradicionalmente utilizada devido à possibilidade de acoplamento em fibras ópticas, que permitem iluminar regiões de mais difícil acesso e à alta intensidade. As harmônicas de lasers de Nd:YAG podem ser empregadas no tratamento, é possível obter feixes de 200 nm a 2000 nm, mas são menos viáveis devido ao elevado custo. Uma alternativa de custo intermediário é o uso de lasers de diodo, que cobrem praticamente todo o espectro visível e infravermelho próximo, compatíveis com boa parte dos fotossensibilizadores disponíveis no mercado. Além do que, os lasers de diodo podem fornecer luz pulsada com considerável potência e precisão sobre o tecido irradiado.

Raramente têm sido utilizadas lâmpadas dada à baixa intensidade, à necessidade do uso de filtros para selecionar a região espectral de interesse e ao uso de um sistema de dissipação para o aquecimento.

Apesar de todas as vantagens apresentadas pelos lasers, o fato de possuírem um espectro de emissão essencialmente monocromático faz com que apenas uma das possibilidades de transição possíveis para a absorção dos FS seja aproveitada. Por isso, fontes de luz mais extensas, como os diodos emissores de luz (LED), poderiam ser melhor aproveitadas em alguns casos que o laser, com a vantagem adicional de um custo reduzido. Portanto, a escolha do LED branco advém de um espectro de emissão ainda mais amplo que os LED de cores definidas, permitindo maior aproveitamento das diferentes bandas de absorção e com profundidades variadas de atuação, de acordo com o comprimento de onda.



## 2.4 Oxigênio molecular

Oxigênio singlete molecular é como são conhecidos os três estados eletronicamente excitados imediatamente superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental ( $^3\Sigma$ ).

Segundo a Teoria do Orbital Molecular, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados  $\pi_x^*$  e  $\pi_y^*$ . Esses elétrons tendem a possuir o mesmo spin de forma a produzir multiplicidade máxima e assim um estado de mais baixa energia. Essa é a razão pela qual o estado fundamental do oxigênio molecular é um tripleto.

Na Tabela 1, está apresentada a forma de ocupação nesses orbitais moleculares antiligantes, para o oxigênio no estado fundamental, assim como para os estados excitados imediatamente superiores.

Tabela 1 - Ocupação dos orbitais moleculares para os estados eletrônicos do oxigênio molecular<sup>3</sup>.

ESTADO	ORBITAL	ENERGIA* (kJ/mol)
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* \quad [\uparrow] \pi_y^*$	0
$^1\Delta_x$	$[\uparrow\downarrow] \pi_x^* \quad [ ] \pi_y^*$	92,4
$^1\Delta_y$	$[ ] \pi_x^* \quad [\uparrow\downarrow] \pi_y^*$	92,4
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* \quad [\downarrow] \pi_y^*$	159,6

\*relativa ao estado fundamental

Desses estados, os que possuem energia intermediária ( $^1\Delta_x$  e  $^1\Delta_y$ ; 92,4 kJ/mol) são os responsáveis pela reatividade química do oxigênio singlete. A simetria dessas moléculas, diferente da do estado fundamental, lhes garante um considerável tempo de vida quando comparado com a forma de mais alta energia ( $^1\Sigma_g$ ; 159,6 kJ/mol), que possui a mesma simetria do estado fundamental.

Os estados  $^1\Delta_x$  e  $^1\Delta_y$  são degenerados e possuem uma distribuição eletrônica onde os elétrons que ocupam um dos orbitais antiligantes  $\pi^*$  se encontram em um dos planos mutuamente perpendiculares. Por serem degenerados, os estados  $^1\Delta_x$  e  $^1\Delta_y$  são, por conveniência, representados como sendo o estado  $^1\Delta_g$ . O orbital molecular vazio no estado  $^1\Delta_g$  (ver Figura 4) garante ao oxigênio singlete caráter eletrofílico, ou seja, afinidade por elétrons. Portanto, sua participação é favorecida mais efetivamente em reações químicas, principalmente no caso em que os substratos possuem sítios ricos em elétrons.

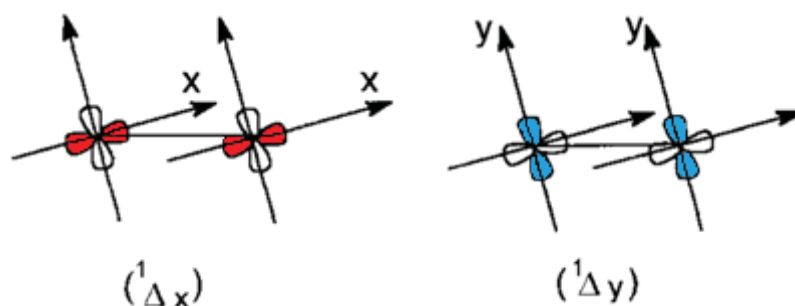


Figura 4 - Representação dos orbitais moleculares  $\pi_x^*$  e  $\pi_y^*$ , relativos às formas  ${}^1\Delta_x$  e  ${}^1\Delta_y$  do oxigênio singleto: os lóbulos sombreados representam o orbital molecular antiligante que possui o par de elétrons<sup>3</sup>.

Em sistemas biológicos, o oxigênio singleto apresenta tempos de vida extremamente baixos, inferiores a  $0,04 \mu\text{s}$ . Em função disto, seu raio de ação é extremamente reduzido ( $< 0,02 \mu\text{m}$ )<sup>3</sup>.

As espécies reativas geradas a partir da interação entre o FS excitado e o oxigênio singleto, entre o FS excitado e sítios dos substratos que estão sendo atacados e as resultantes dos processos secundários (radicais livres e outras espécies carregadas), tendem a se difundir nas vizinhanças do tecido afetado, iniciando uma cadeia de reações bioquímicas, resultando em danos de diferentes proporções à célula tumoral, o que tende a inviabilizá-lo.

Os sítios ricos em elétrons, presentes nas células-alvo, tendem a ser os mais facilmente modificados, como por exemplo, a guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteroides e lipídeos insaturados. Isso resulta em danos à parede celular, mitocôndria, e lisossomos, comprometendo a integridade celular.

Nenhum efeito mutagênico sobre as células sadias tem sido reportado até o momento<sup>16</sup>, o que amplia a segurança de aplicação dessa modalidade terapêutica, permitindo ainda a repetição do tratamento no caso de recorrência ou mesmo de lesões extensas. Os agentes fototerapêuticos podem ainda destruir um tumor indiretamente, pelo dano causado ao endotélio vascular, o que resulta em hipóxia e morte do tecido<sup>17</sup>.

### 3. OBJETIVOS

A utilização da luz branca proveniente de um LED como fonte de luz na Terapia Fotodinâmica e as consequências ao efeito fotodinâmico ainda não são completamente estabelecidas. Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar o comportamento da luz branca em tecido biológico, buscando uma melhor compreensão de seus efeitos na Terapia Fotodinâmica com o uso de um derivado de hematoporfirina<sup>18</sup>.

Para a compreensão dos parâmetros envolvidos foram realizados: experimentos *in vitro* de fotodegradação e análise da profundidade de penetração da luz em *phantoms*, além do desenvolvimento de modelos teóricos sobre dose limiar e profundidade de necrose em Terapia Fotodinâmica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador utilizado neste estudo foi o Photogem<sup>®</sup> (Limited Liability Company Photogem, Moscou, Rússia), um derivado de hematoporfirina que foi aprovado pelo *Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation* (autorização 42-3199-98). Aprovada para uso em humanos pelo Comitê Estatal de Farmacologia da Federação Russa e pela ANVISA (data 08/04/2003; processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4), autorização 42-3199-98, com distribuição somente sob prescrição para instituições especializadas.

Este medicamento acumula-se seletivamente em tecidos neoplásicos, podendo ser usado tanto para diagnóstico por fluorescência como para a TFD. Este fotossensibilizador é constituído de uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de derivados de hematoporfirina, e trata-se de um pó violeta escuro contido em frascos esterilizados de 50 ml contendo 200 mg. Pode ser guardado por até dois anos ao abrigo da luz e sob refrigeração menor que 5° C.

Os valores de absorbância do Photogem<sup>®</sup> (Figura 5) foram medidos usando um espectrofotômetro ultravioleta-visível (Varian, modelo Cary 50). Todos os gráficos e cálculos simples do trabalho foram feitos pelo programa *ORIGIN 8.0* (OriginLab Corp., Northampton-MA, EUA).

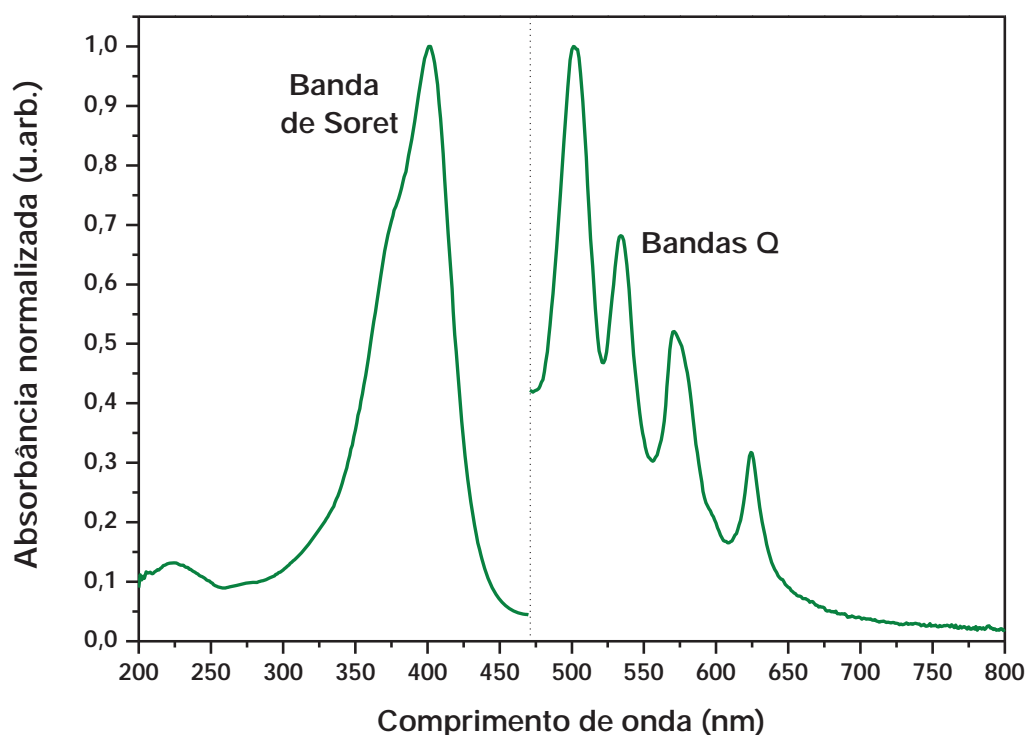


Figura 5 - Espectro de Absorbância do Photogem<sup>®</sup> normalizado.

## 4.2 Fonte de luz

O LED branco utilizado nos experimentos (LUXEON® III, LXHL-PW09, Philips Lumileds Lighting Company, EUA), ilustrado na Figura 6 a), é do tipo “branco frio” (ou seja, com emissão de infravermelho muito menor que a de lâmpadas incandescentes ou halógenas). Possui temperatura de cor típica de 5500 K, corrente elétrica de 700 mA, intensidade luminosa de 184 mW/cm<sup>2</sup> e aproximadamente 6,1 mm de diâmetro. A Figura 6 b), mostra o dispositivo desenvolvido no Laboratório de Apoio Tecnológico do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, contendo o LED branco LUXEON® III.

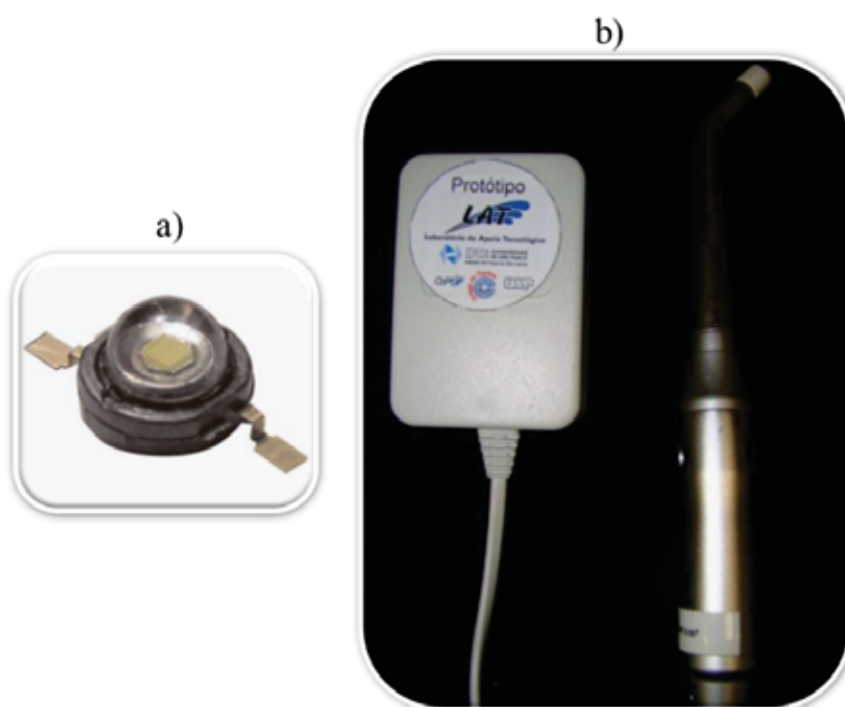


Figura 6 - a) LED branco LUXEON® III e b) dispositivo a base de LED branco para utilização nos experimentos.

Para determinar a intensidade de luz ( $I_0$ ) emitida pelo LED em W/cm<sup>2</sup>, utilizou-se a relação da equação (4):

$$I_0 = \frac{\text{Potência}}{\text{Área}} . \quad (4)$$

A área da equação (4) é dada pela área da ponteira do dispositivo a base de LED e a potência foi obtida através de um medidor de potência óptica modelo FieldMaster (Coherent, EUA) e o sensor térmico modelo LM-10 HTD (Coherent, EUA). Para a coleta do espectro de emissão do LED branco, foi utilizado um sistema montado no Laboratório de Biofotônica, Grupo de Óptica, IFSC/USP, que consiste de um espectrofotômetro (USB2000, OceanOptics Inc., EUA) acoplado a um computador. Contudo, a partir deste sistema, é possível obter o espectro somente em unidades arbitrárias ( $u.arb.$ ), ilustrada na Figura 7.

Foi criada uma rotina em *MATLAB*<sup>®</sup> (The MathWorks, Inc., EUA) - ver APÊNDICE A - para distribuir a intensidade total medida ( $184 \text{ mW/cm}^2$ ) ao longo do espectro, ou seja, obter um espectro de emissão em que cada comprimento de onda tenha sua correspondente intensidade em  $\text{W/cm}^2$ , que é a unidade mais viável para os cálculos.

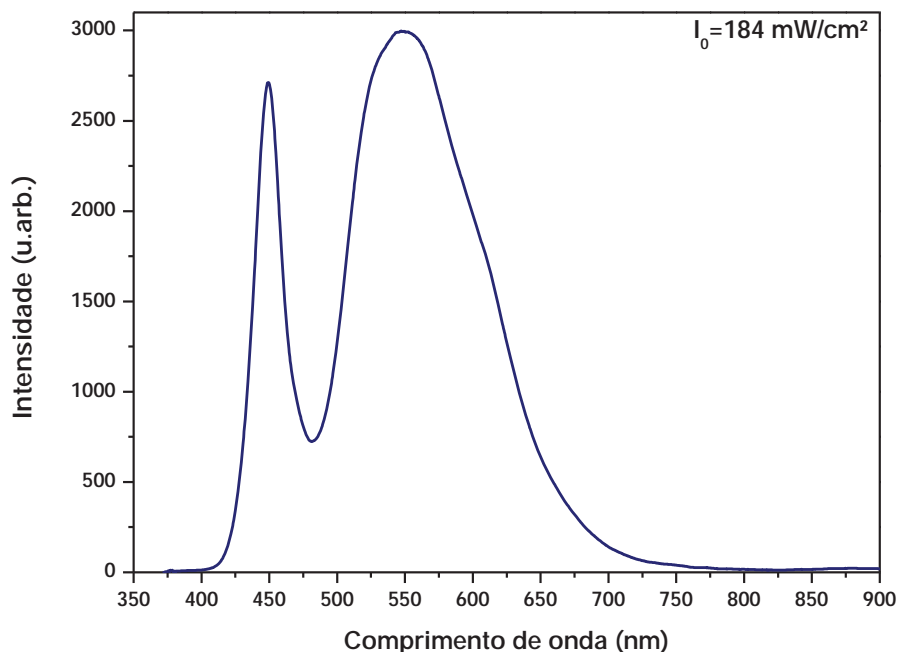


Figura 7 - Espectro de emissão do LED branco em unidades arbitrárias.

A essência da rotina consiste na comparação de áreas dos espectros de emissão com a intensidade total da fonte. Para exemplificar o cálculo realizado, a curva da Figura 8 representa um espectro coletado pelo sistema, dado em unidades arbitrárias. Conhecida a intensidade total e integrando o espectro no intervalo, é possível estimar o valor da área total sob a curva,  $A_T$ .

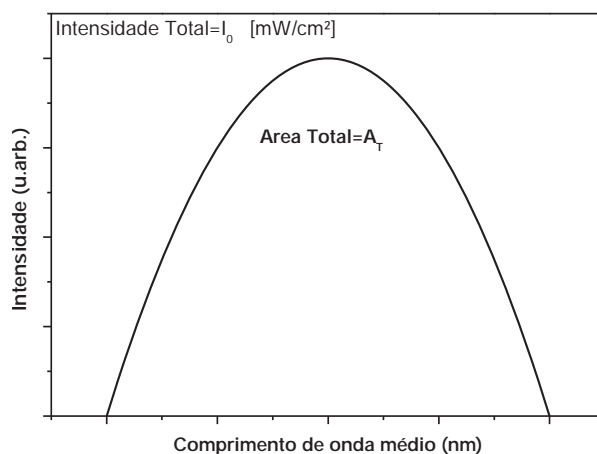


Figura 8 - Exemplo de um espectro antes de ser submetido à rotina.

É preciso dividir o espectro em diversos retângulos e são as áreas de cada retângulo,  $A(i)$ , que serão utilizadas posteriormente para comparação com a intensidade da fonte. A rotina para conversão de unidade consiste nos cálculos descritos a partir da Figura 9.

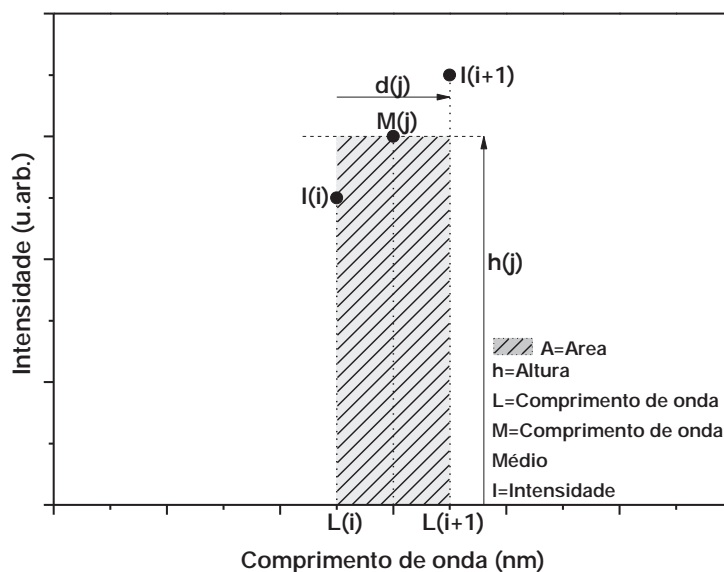


Figura 9 - Esquema do cálculo realizado na rotina.

A base de cada retângulo,  $d(j)$ , e a altura,  $h(j)$ , são calculadas através de:

$$d(j) = L(i+1) - L(i) \quad \text{e} \quad h(j) = \frac{I(i) + I(i+1)}{2} . \quad (5)$$

Portanto, a área de cada retângulo,  $A(j)$ , e o comprimento de onda médio,  $M(j)$ , são obtidos pelas relações:

$$A(j) = d(j) \cdot h(j) \quad \text{e} \quad M(j) = \frac{L(i) + L(i+1)}{2} . \quad (6)$$

Na Figura 10 a), há um espectro composto por diversos retângulos cujas áreas e comprimento de onda médio de cada retângulo foram calculados pela rotina. A nova intensidade total ( $I_0'$ ) é calculada pela equação (7):

$$I_0' = \frac{A_T'}{A_T} \cdot I_0 , \quad (7)$$

sendo  $A_T'$ , a nova área total, composta pela soma das áreas dos retângulos.

É possível expressar cada área em  $W/cm^2$  ao comparar os dados da Figura 10 a) com a equação (8):

$$I(i) = \frac{A(i)}{A_T} \cdot I_o \quad (8)$$

Como a rotina considera muitos pontos, o resultado é um espectro contínuo de intensidade, representados na Figura 10 b).

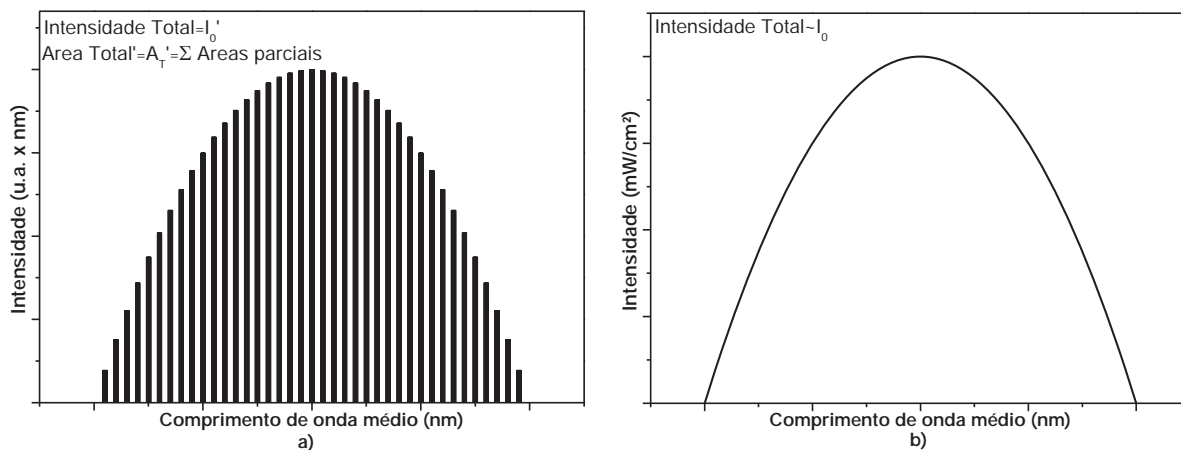


Figura 10 - a) Espectro com as áreas parciais de intensidade e b) Espectro da intensidade em  $W/cm^2$ .

Ao executar a rotina no espectro do LED, originalmente coletado em unidades arbitrárias (Figura 7), foi possível expressar na Figura 11 o espectro em  $mW/cm^2$ .

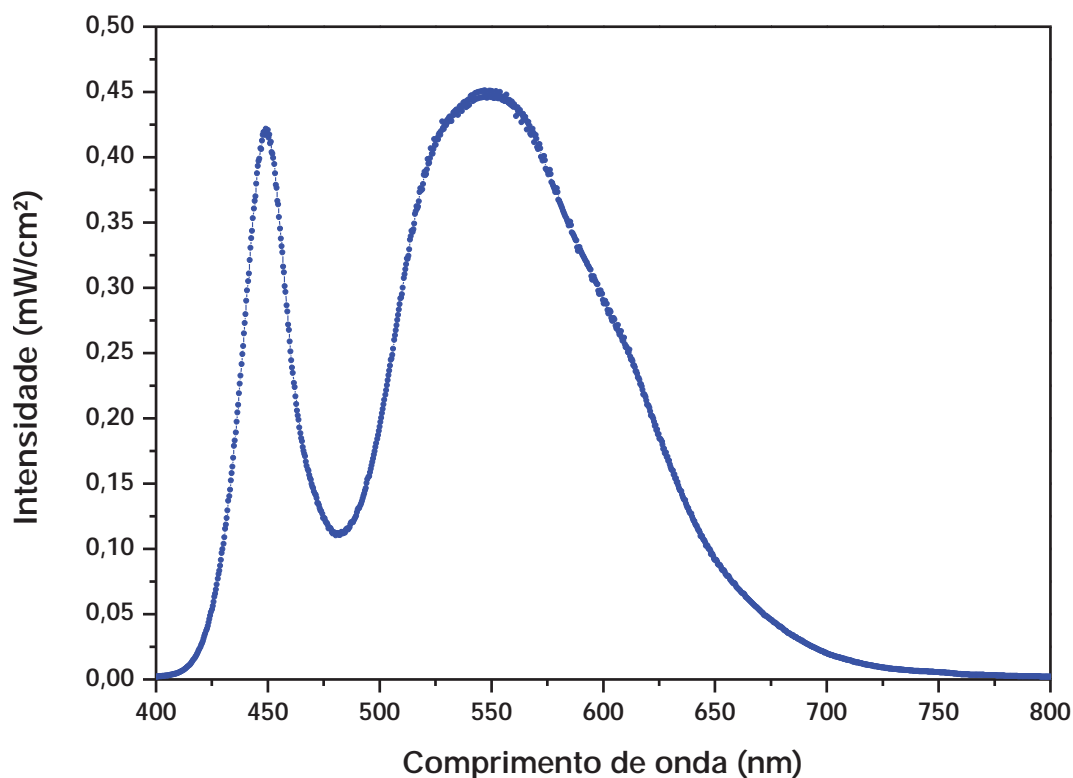


Figura 11 - Espectro de emissão do LED branco em  $mW/cm^2$ .



### 4.3 Fotodegradação

Consiste na degradação de um composto através de luz. Para a eficiência do tratamento com TFD é importante que a molécula do fotossensibilizador tenha uma boa interação com o comprimento de onda da luz irradiada, no caso deste estudo, com todo o espectro de emissão.

A partir do estudo da fotodegradação é possível calcular parâmetros que permitem a interpretação dessa interação, como a constante de decaimento de tempo e taxa de degradação. Delimitou-se o intervalo de 400 nm a 650 nm como região de interesse, uma vez que o LED branco começa a emitir em 400 nm e o Photogem<sup>®</sup> apresenta uma absorção muito pequena a partir de 650 nm, como pode ser observado na Figura 12.

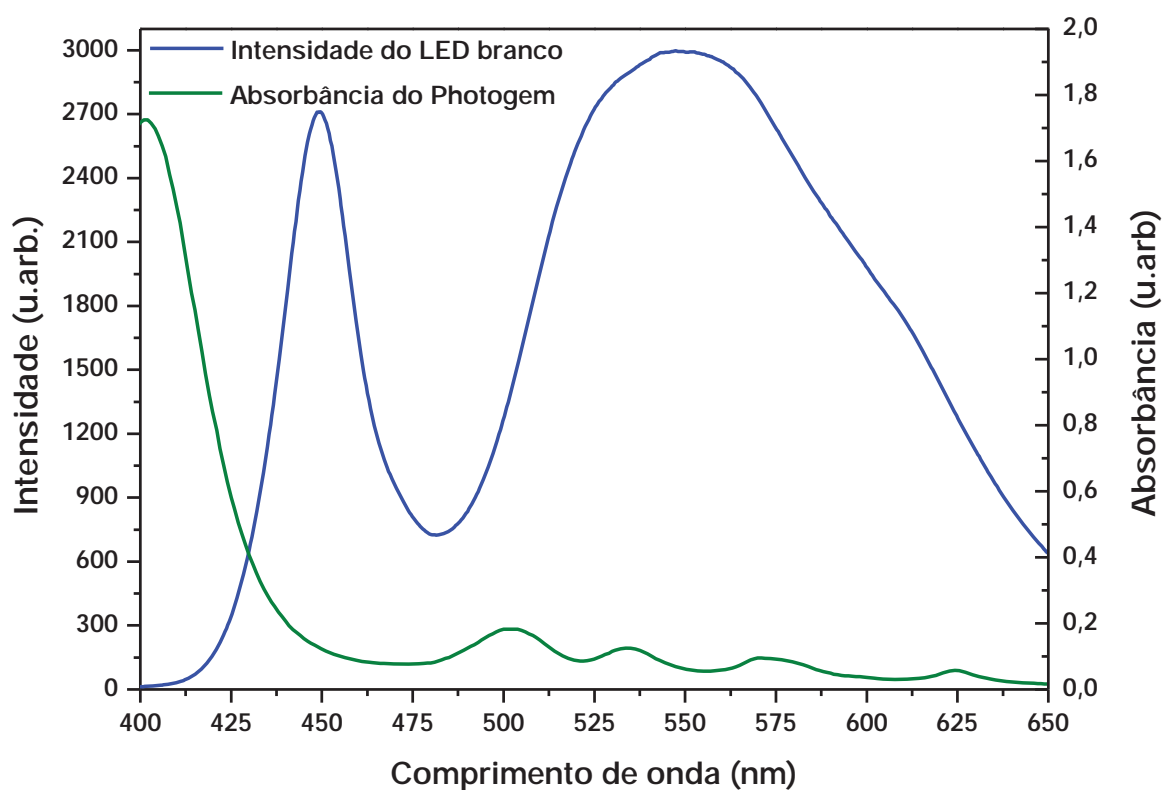


Figura 12 - Região de interesse dos espectros da fonte de luz e do fotossensibilizador.

A solução de FS foi preparada com a concentração de 17  $\mu\text{g/ml}$  de Photogem<sup>®</sup> em água destilada; valor este anteriormente verificado para o qual não há formação de agregados e que está no regime linear onde a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração da porfirina em solução<sup>19</sup>. Para o experimento, foi depositado o volume 1,00 ml da solução em uma cubeta de quartzo retangular (Varian<sup>®</sup>).

Há trabalhos que tratam a adição de um surfactante (moléculas que possuem atividade detergente) BRIJ-35 nos experimentos *in vitro* para simular a resposta da membrana celular de tecidos biológicos<sup>13</sup>.

Na Figura 13, observa-se um deslocamento no espectro ao se adicionar o surfactante, de forma que este passa a se assemelha mais ao espectro de absorção do fotossensibilizador no tecido; portanto, a solução de Photogem<sup>®</sup> foi preparada em água destilada com BRIJ-35 (na concentração de 5 mM).

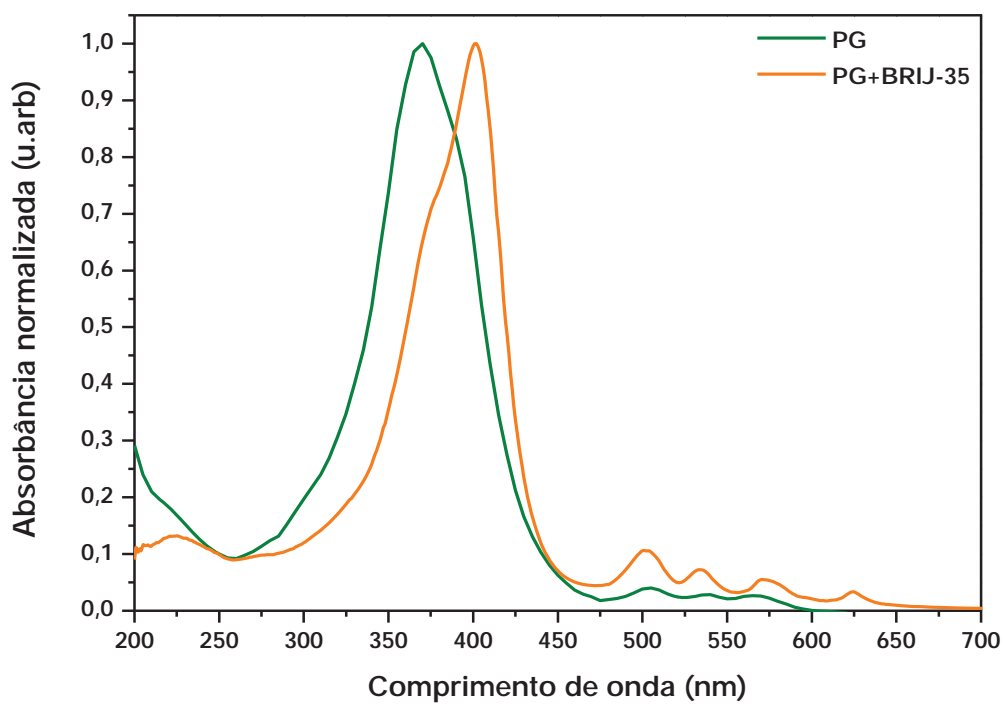


Figura 13 - Espectros de absorção da solução de Photogem<sup>®</sup> e o espectro de Photogem<sup>®</sup> com surfactante.

Para medir a intensidade de fluorescência da solução durante a fotodegradação foi utilizado o mesmo sistema descrito na seção 4.2, um espectrofotômetro (USB2000, OceanOptics Inc., EUA) acoplado a um computador e a um laser para excitação das amostras (laser ND:YAG de 532 nm).

Durante o experimento a cubeta com a solução era iluminada lateralmente pelo LED e protegida de luz ambiente. A solução foi irradiada com o LED branco durante 70 minutos, e a cada 5 minutos o LED era desligado e a coleta dos espectros de fluorescência realizada na face lateral da cubeta. Logo em seguida a iluminação era retomada.

Há alguns parâmetros que podem ser extraídos deste experimento, como por exemplo, a constante de decaimento ( $\tau$ ), que expressa quanto tempo é necessário para que a solução se degrade ao ser irradiada, e pode ser calculada através da equação (9):

$$C = C_0 \cdot \exp\left\{-\frac{t}{\tau}\right\}, \quad (9)$$

sendo  $C$  a concentração,  $C_0$  a concentração inicial (17  $\mu\text{g/ml}$ ) e  $t$  o tempo de iluminação.

Um parâmetro importante, obtido a partir de  $\tau$ , é o número de moléculas degradadas por segundo ou taxa de degradação, ( $\beta$ ) expressa em moléculas/s a partir da equação (10):

$$\beta = \frac{C_0}{MM_{por}} \cdot \frac{NA}{\tau}, \quad (10)$$

sendo,  $MM_{por}$  a massa molar da porfirina (600 g) e  $NA$  o número de Avogrado. A taxa de degradação também pode ser obtida pela equação (11), dada em  $\mu\text{M/s}$ :

$$\beta = \left. \frac{dC}{dt} \right|_{t=0} = -\frac{C_0}{\tau}. \quad (11)$$

#### 4.4 Penetração da luz

Para medir a intensidade da luz como função da posição foi utilizado um sistema montado no Laboratório de Biofotônica, Grupo de Óptica, IFSC/USP, que consiste de um espectrofotômetro (USB2000, OceanOptics Inc., EUA) acoplado a um computador.

Ao espectrofotômetro foi acoplada uma fibra óptica isotrópica (Isotropic Probe, IP85, Medlight S.A., Suíça), é uma fibra óptica de vidro com uma pequena esfera espalhadora de 0,85 mm de diâmetro em sua extremidade que faz a coleta da luz de forma isotrópica. Este tipo de sonda possui aplicação especialmente voltada para medidas de intensidade de luz difusa em tecidos biológicos. A fibra foi colocada nas diversas posições do sistema para a coleta dos espectros.

Para analisar a profundidade de penetração da luz foi preparado um *phantom*, solução que simula as propriedades ópticas de determinado meio. Um volume de 3 ml de *Lipofundin 20%* (solução espalhadora com absorção desprezível<sup>20</sup>) foi diluído em 300 ml de água destilada e 0,15 ml de nanquim (Acrilex) foi adicionado à solução como meio absorvedor a fim de mimetizar as propriedades ópticas de um tecido biológico.

Uma correlação entre o caminho percorrido ( $z$ ) e a variação espectral da luz branca incidente permite conhecer as propriedades do meio, ou seja, entender como cada comprimento de onda de luz branca se comporta no tecido biológico.

Na Figura 14, está ilustrada a montagem do experimento com o sistema de coleta, fonte de luz e o *phantom* espalhador.

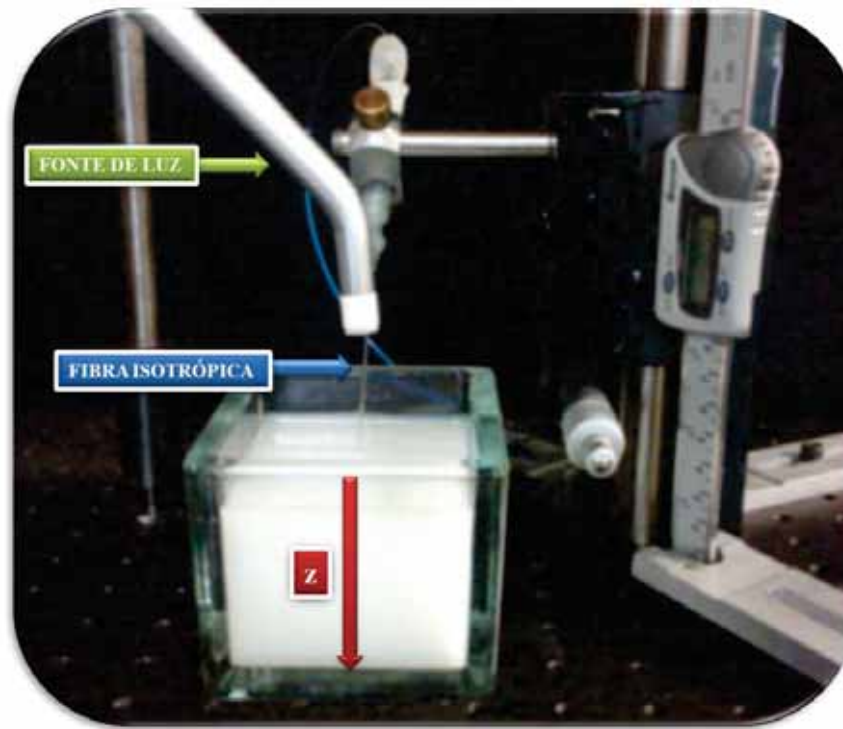


Figura 14 - Montagem para o estudo da penetração da luz em *phantoms*.

O ajuste exponencial utilizado nos dados foi realizado pelo programa *ORIGIN 8.0* (OriginLab Corp., Northampton-MA, EUA) a partir equação (12):

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot \exp\left[\frac{-z}{\alpha(\lambda)}\right], \quad (12)$$

sendo,  $z$  a posição de coleta dos espectros ao longo da profundidade do *phantom* (em milímetros) e,  $\alpha$  o coeficiente de decaimento da intensidade de luz. É possível associar a equação (12) com a lei de Beer-Lambert (abordada com mais detalhes na seção 4.5), desde que seja feita a definição da equação (13):

$$\mu(\lambda) \equiv \frac{1}{\alpha(\lambda)}. \quad (13)$$

sendo  $\mu(\lambda)$  o coeficiente de atenuação da solução para cada comprimento de onda, expresso em  $\text{mm}^{-1}$ . Portanto, quanto menor o valor do coeficiente de atenuação, mais o respectivo comprimento de onda penetra no meio.

#### 4.5 Modelo de dose limiar

Na TFD, o conceito de dose limiar (*Dth*, do inglês: *Threshold Dose*) refere-se à mínima dose de energia entregue ao tecido capaz de induzir um dano celular/tecidual permanente.

Costuma-se encontrar na literatura o valor da dose limiar estimado experimentalmente para alguns comprimentos de onda<sup>21</sup>, mas ao utilizar uma fonte de espectro amplo é fundamental conhecer o comportamento da dose limiar em função do comprimento de onda.

A Figura 15 é uma imagem de lâmina microscópica do Laboratório de Biofotônica, Grupo de Óptica, IFSC/USP, mostrando fígado sadio de rato tratado com terapia fotodinâmica, na qual é possível observar uma nítida separação de duas regiões por uma linha mais rosada, a linha da dose limiar. Este quadro é estabelecido devido ao fato de que à medida que a luz penetra no tecido, absorção e espalhamento vão atenuando a intensidade. Isto faz com que a dose de luz depositada diminua à medida que a luz penetra. No ponto onde a dose equivale ao limiar estabelece-se a separação entre as duas regiões.

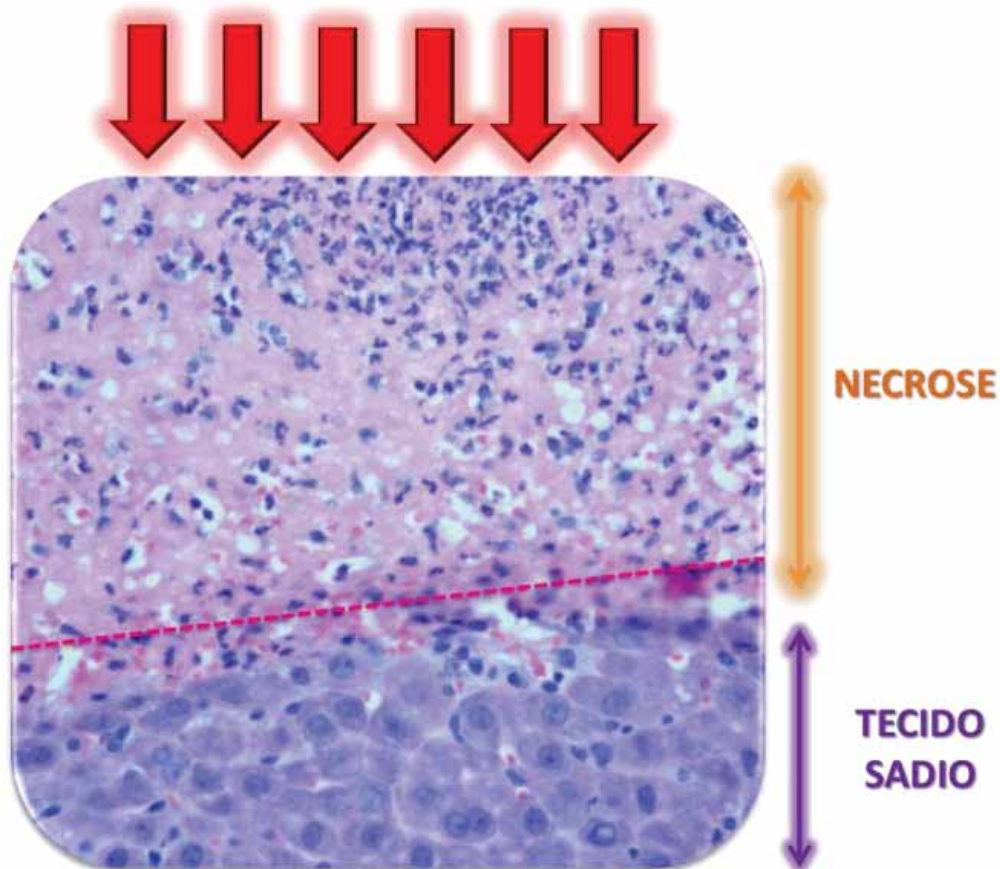


Figura 15 - Imagem de lâmina microscópica de fígado sadio de rato tratado com TFD.

Na parte superior, é possível observar que as células estão mortas devido à intensa presença de neutrófilos (que caracteriza um processo inflamatório) e a ausência de organização celular. Há uma pequena região intermediária contendo apenas algumas células e finalmente a região sadia, com células normais (com paredes bem demarcadas, núcleo organizado), a região do fígado que continha FS, mas na qual a dose de luz que chegou não foi suficiente para causar necrose, ou seja, a dose de luz entregue foi inferior à dose limiar.

Para o modelo, utilizou-se como base o número mínimo de fótons necessários de serem absorvidos para produzir necrose tecidual, que é bem instituído na literatura, como sendo da ordem de  $10^{19}$  fótons/cm<sup>3</sup>, segundo o modelo vigente. Este parâmetro independe do comprimento de onda, desde que sejam absorvidos pelo menos  $10^{19}$  fótons em um volume, haverá necrose<sup>22</sup>.

Quanto ao conceito de limiar, o fotossensibilizador é que deve ser capaz de absorver esta quantidade de fótons. Portanto, foi estabelecida na equação (14) uma relação com comprimentos de onda de absorção do FS através de seu coeficiente de atenuação:

$$D_{th}(\lambda) = \frac{T}{\mu_{FS}(\lambda)} \cdot \frac{hc}{\lambda}, \quad (14)$$

na qual  $T=10^{19}$  fótons/cm<sup>3</sup> representa a dose volumétrica de luz,  $\mu_{FS}(\lambda)$  coeficiente de atenuação do FS dependente do comprimento de onda,  $h$  a constante de Planck,  $c$  a velocidade da luz e  $\lambda$  o comprimento de onda. Nesta expressão,  $D_{th}$  representa a taxa superficial de energia fluindo pelo tecido em cada ponto.

Para realizar o cálculo da dose limiar do Photogem<sup>®</sup> em função do comprimento de onda foi preciso obter seu coeficiente de atenuação também em função do comprimento de onda. Este parâmetro pode ser obtido a partir da Lei de Beer-Lambert, expressa pela equação (15) e Figura 16:

$$I = I_0 \cdot \exp[-\mu \cdot z]. \quad (15)$$

Esta lei descreve como a intensidade de luz total ( $I_0$ ) é atenuada ao longo da profundidade ( $z$ ), de acordo com o coeficiente de atenuação do meio irradiado ( $\mu$ ). O coeficiente de atenuação pode ser expresso pela equação (16):

$$\mu = C \cdot \sigma, \quad (16)$$

na qual,  $C$  representa a concentração da solução e  $\sigma$  a seção de choque de absorção das moléculas presentes.

No experimento utilizou-se uma solução com a mesma concentração do experimento de fotodegradação (17 µg/ml de Photogem<sup>®</sup> em água destilada com adição de 5mM do surfactante BRIJ-35).

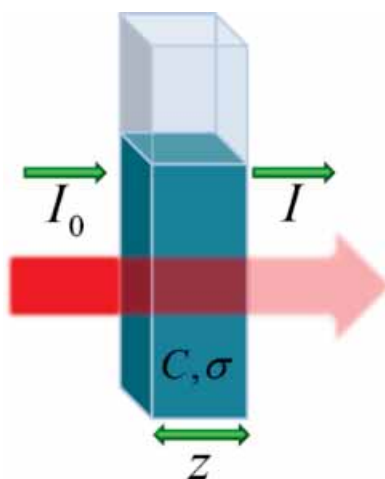


Figura 16 - Ilustração da Lei de Beer-Lambert.

A montagem para esta medida está ilustrada pela Figura 17. O sistema de aquisição dos dados é o mesmo descrito na seção 4.4. Primeiramente foi feita a coleta do espectro de intensidade total da fonte de luz na posição **a**,  $I_0(\lambda)$ . Depois, foi colocada a cubeta com a solução e coletado o espectro de luz na posição **b**,  $I(\lambda)$ , após a luz ter percorrido a solução e ter sua intensidade atenuada pelo fotossensibilizador.

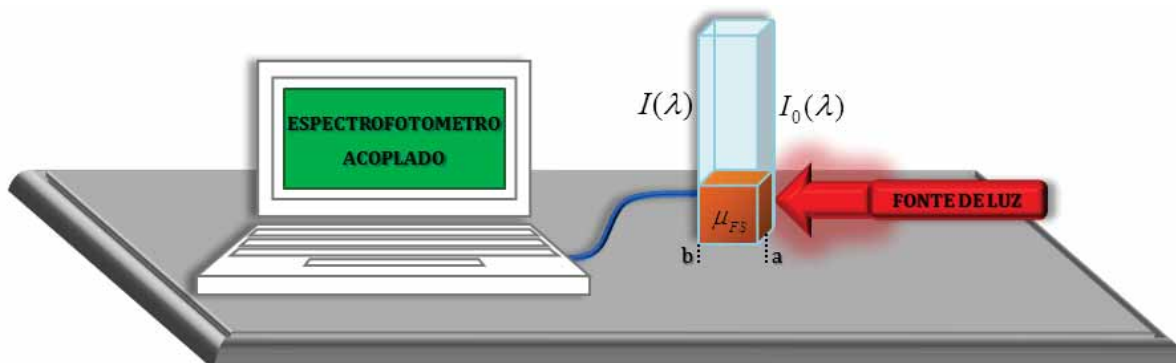


Figura 17 - Esquema experimental da determinação do coeficiente de atenuação o FS.

O caminho óptico da cubeta de quartzo é de 10 mm; ao aplicar-se logaritmo em ambos os lados da equação (15), obtém-se a equação (17), que fornece o coeficiente de atenuação em  $\text{cm}^{-1}$ . Ao substituir os valores de  $I_0$  e  $I$  para cada comprimento de onda,

$$\mu_{FS}(\lambda) = -\ln \left[ \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} \right]. \quad (17)$$

O coeficiente de atenuação obtido, expresso na Figura 18, será válido como primeira aproximação para o caso do fotossensibilizador presente no tecido, utilizado no cálculo do espectro de dose limiar da equação (14).

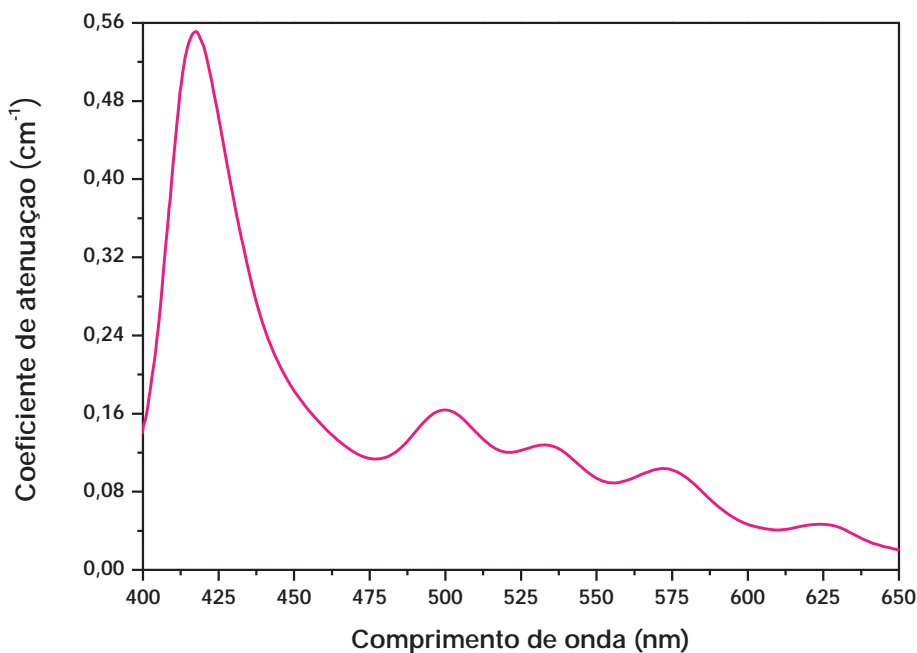


Figura 18 - Coeficiente de atenuação do Photogem<sup>®</sup> obtido experimentalmente.

#### 4.6 Modelo para profundidade de necrose

Para as aplicações da TFD, é importante a capacidade de quantificar qual a profundidade de necrose produzida pelo tratamento. A profundidade de necrose depende do FS utilizado, uma vez que sua dose limiar determina qual a dose de energia que deve ser fornecida para a terapia; e qual o tecido alvo, já que o coeficiente de atenuação do tecido interfere diretamente na penetração da luz. Para este modelo houve dois pontos de partida: uma análise a partir do modelo de dose limiar (seção 4.5) e, a partir da dose limiar expressa em fótons por unidade de volume estabelecida na literatura<sup>22</sup>.

- **A partir do modelo de dose limiar**

A base para esta análise foi a Lei de Beer-Lambert, com uma adaptação aos parâmetros da TFD, ao utilizar o coeficiente de atenuação do tecido de estudo, fígado sadio de ratos,  $\mu_{FIGADO}$ . Buscou-se obter este parâmetro em função do comprimento de onda. A partir de uma publicação (Figura 19), foi possível compor o coeficiente de atenuação em função do comprimento de onda do fígado sadio de ratos, através da equação (18):

$$\mu_{FIGADO}(\lambda) = \sqrt{\{3\mu_a(\lambda) \cdot [\mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda) \cdot (1 + g(\lambda))]\}}, \quad (18)$$

sendo que,  $\mu_a$  representa o coeficiente de absorção,  $\mu_s$  o coeficiente de espalhamento e,  $g$  a anisotropia (propriedade física que mostra valores diferentes em relação à direção em que a medida é feita).



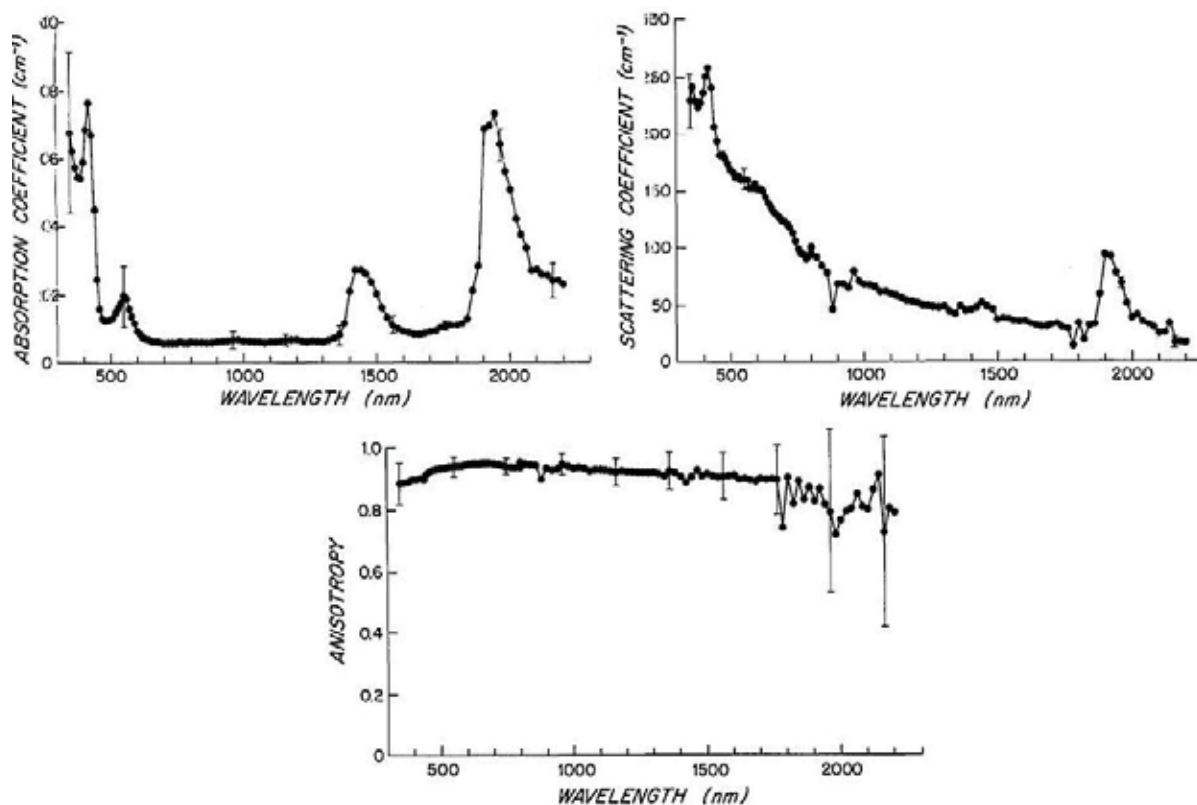


Figura 19 - Coeficientes de absorção, espalhamento e anisotropia do fígado de rato<sup>23</sup>.

Através do programa gratuito *ENGAUGE 4.1*, foi possível extrair da Figura 19 uma tabela com os valores estimados dos pontos de cada gráfico. Ao fornecer ao programa os valores dos eixos, ele relaciona a escala de cada imagem com a posição de cada ponto da curva que foi selecionado pelo usuário e estima seu valor. Ao substituir os dados obtidos na equação (18), obteve-se o espectro da Figura 20.

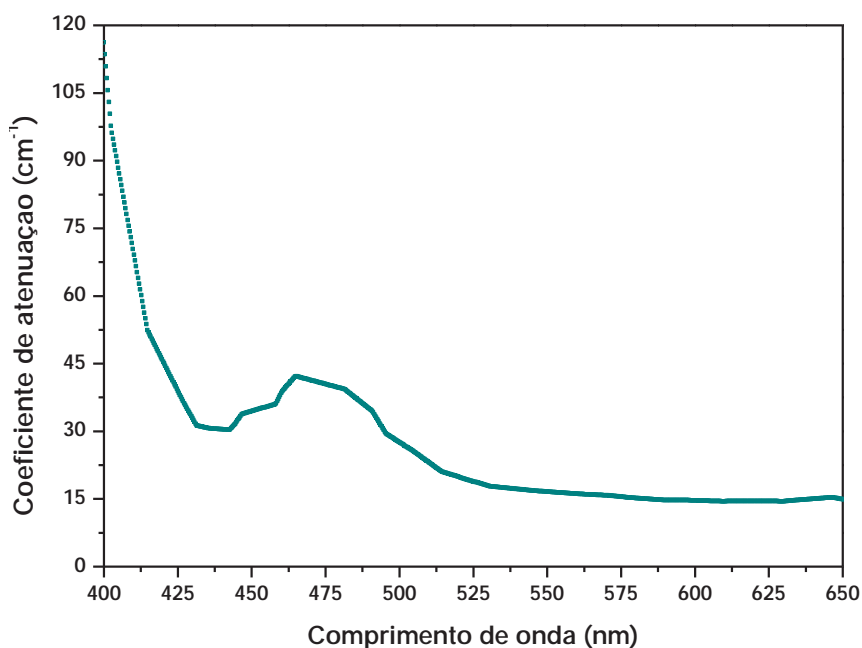


Figura 20 - Coeficiente de atenuação do fígado de rato.

O espectro contínuo de intensidade da fonte de luz (Figura 11) é inviável para o modelo, uma vez que ao considerar um tempo de 1200 segundos de irradiação, não haverá dose de energia suficiente em cada comprimento de onda para superar a dose limiar num determinado ponto (Figura 30).

Portando, foram calculados os espectros discretos de intensidade de luz para o LED branco e um LED vermelho, cuja intensidade no comprimento de onda médio representa a intensidade em um intervalo de aproximadamente 5 nm. É importante destacar que a intensidade total (350 mW/cm<sup>2</sup>) foi suposta para ambos os LEDs e distribuída proporcionalmente nos espectros contínuo e discreto, como ilustrado na Figura 21.

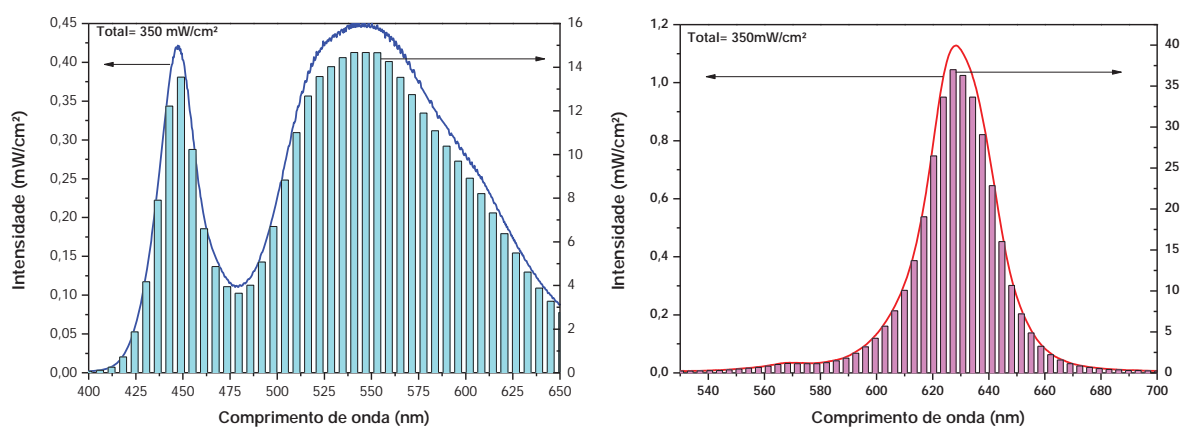


Figura 21 - Espectros de intensidades contínuo e discreto para os LEDs branco e vermelho.

A equação de Beer-Lambert nos parâmetros de TFD foi reescrita na equação (19):

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot \exp\left\{[-\mu_{FIGADO}(\lambda) + \sigma(\lambda) \cdot [FS]_{FIGADO}] \cdot z\right\}. \quad (19)$$

A multiplicação do espectro da seção de choque do FS,  $\sigma(\lambda)$ , pela concentração de fotossensibilizador no fígado,  $[FS]_{FIGADO}$ , é somada ao coeficiente de atenuação do fígado para complementar os efeitos que causam atenuação. A concentração do FS é um fator variável com o tempo de iluminação, já que o FS é degradado durante a irradiação e o tecido tem uma eliminação da substância através do fluxo sanguíneo. Contudo, para simplificar os cálculos, o modelo utilizou esse parâmetro como através da equação (20):

$$[FS]_{FIGADO} = C_0 \cdot \frac{NA}{MM_{porfirina}}, \quad (20)$$

sendo,  $C_0$  a concentração inicial de FS injetado no fígado (1,5 mg/kg do animal), ao considerar o fígado como líquido, foi estimado o valor de  $1,5 \times 10^{15}$  moléculas/cm<sup>3</sup>.

Ao multiplicar a intensidade total da luz da equação (19) pelo tempo de irradiação ( $t$ , 1200 s), obtém-se o que é chamado de dose, a quantidade de energia total entregue por  $\text{cm}^2$  ao tecido irradiado ( $D_0(\lambda)$ ,  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Ao multiplicar a intensidade,  $I(\lambda)$ , pelo tempo, tem-se o espectro de dose limiar,  $D_{th}(\lambda)$ , expresso na Figura 22 – obtida a partir do modelo da seção 4.5, com os dados interpolados para corresponderem aos mesmos comprimentos de onda dos espectros discretos da Figura 21. Aplicando-se o logaritmo, a profundidade de necrose para cada uma das componentes espectrais da fonte de luz pode ser obtida pela equação (21):

$$z_{nec}(\lambda) = -\frac{1}{\{\mu_{FIGADO}(\lambda) + \sigma(\lambda) \cdot [FS]_{FIGADO}\}} \cdot \ln \left[ \frac{D_{th}(\lambda)}{D_0(\lambda)} \right]. \quad (21)$$

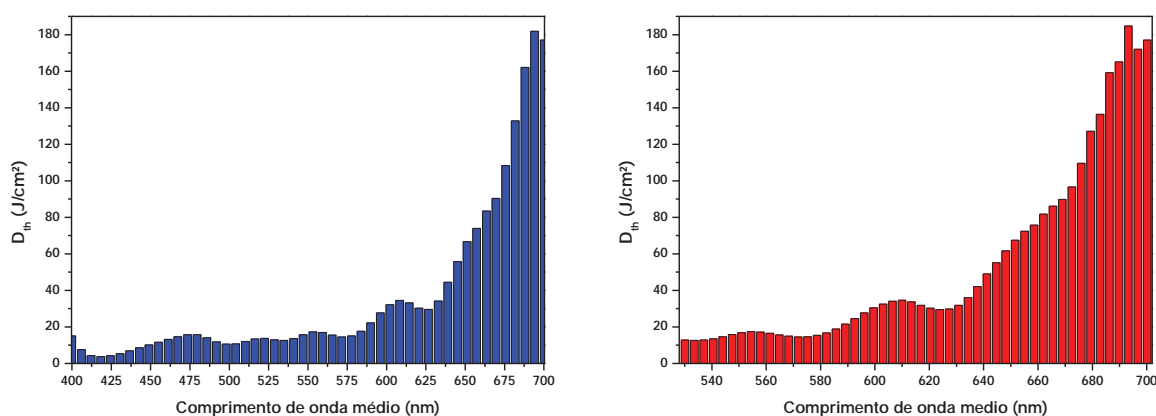


Figura 22 - Espectros discretos da dose limiar para os LEDs branco e vermelho.

A rotina do modelo, escrita em *MATLAB*<sup>®</sup> (The MathWorks, Inc., EUA) - ver APÊNDICE B - considera sempre que  $D_0(\lambda) > D_{th}(\lambda)$ , ou seja, a presença de luz é suficiente para causar necrose. Se em algum ponto do espectro  $D_0(\lambda) \leq D_{th}(\lambda)$ , o modelo estaria prevendo  $z_{nec} < 0$ , que não faz sentido. Neste caso, há a substituição dos valores de  $z_{nec} < 0$  por  $z_{nec} = 0$ , a luz não foi suficiente para causar necrose. Neste modelo o valor da necrose será o máximo valor de necrose obtido.

- **Através da quantidade de fótons absorvidos**

Este modelo é baseado na consideração de que a profundidade de necrose é uma variável e analisa-se a quantidade de fótons que realmente é absorvida ao longo de cada profundidade. Assumiu-se que as moléculas do FS estão distribuídas de forma homogênea no tecido, conforme está ilustrado na Figura 23.

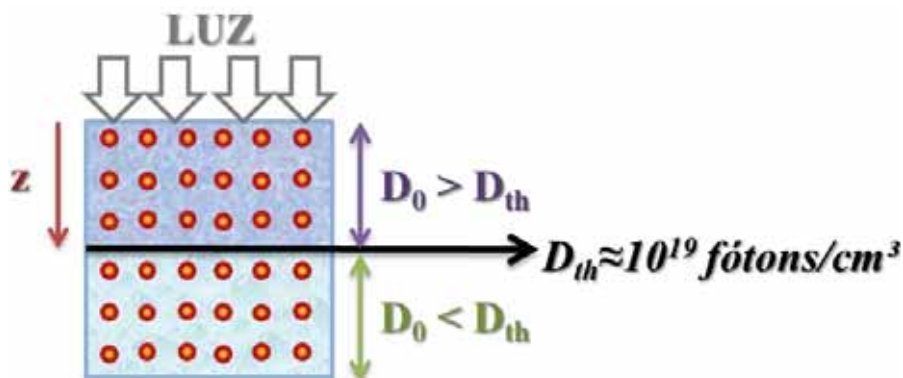


Figura 23 - Esquema base para o modelo de profundidade de necrose

Partiu-se novamente da Lei de Beer-Lambert, considerando o espectro de intensidade da fonte em  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ,  $I_0(\lambda)$ , decaindo exponencialmente pelo coeficiente de atenuação do fígado ao longo da profundidade, como na equação (22):

$$I(\lambda, z) = I_0(\lambda) \cdot \exp\{-\mu_{TECIDO}(\lambda) \cdot z\}. \quad (22)$$

É importante para o modelo avaliar quanto da luz que chega a cada profundidade do tecido é realmente absorvida pelo fotossensibilizador. Na equação (23), este fator foi levado em consideração:

$$I_{abs}(\lambda, z) = I_0(\lambda, z) \cdot A(\lambda), \quad (23)$$

na qual,  $A(\lambda)$  corresponde ao espectro de Absorbância do FS.

Multiplicando a equação (23) pelo tempo, obtém-se a dose absorvida em  $\text{J}/\text{cm}^2$ ; esta dividida pela energia do fóton resulta no número de fótons absorvidos por  $\text{cm}^2$ . Para ter o número total de fótons em função da profundidade, ou seja, sem dependência com o comprimento de onda, faz-se a somatória representada na equação (24):

$$\phi(z) = \sum_{\lambda=\lambda_i}^{\lambda_f} I_0(\lambda_i) \cdot \exp\{-\mu_{TECIDO}(\lambda_i) \cdot z\} \cdot t \cdot A(\lambda_i) \cdot \left[ \frac{\lambda_i}{hc} \right]. \quad (24)$$

O espectro gera o número de fótons que são absorvidos por  $\text{cm}^2$ , o modelo considera a profundidade de até 1 cm, é possível a associação com a dose limiar em fótons por  $\text{cm}^3$ , e assim estima a mínima necrose produzida nos parâmetros definidos. A rotina para os cálculos descritos deste modelo também foi escrita em *MATLAB*<sup>®</sup> (The MathWorks, Inc., EUA) - ver APÊNDICE C.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fotodegradação

Foi possível perceber, na Figura 24, que após a iluminação da solução de Photogem<sup>®</sup> com o LED branco por 70 minutos, a principal banda de fluorescência teve sua intensidade reduzida pela metade. Lembrando que, nos parâmetros utilizados, a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de FS, isto indica que houve uma considerável degradação do fotossensibilizador.

Este seria o primeiro indício de que pode haver vantagem no uso do LED branco como fonte de luz com Photogem<sup>®</sup> como fotossensibilizador em TFD. Esta foi a motivação para a análise de como o LED branco e o PG irão interagir com o tecido escolhido para tratamento, que foi abordado no modelo teórico descrito na seção 4.5.

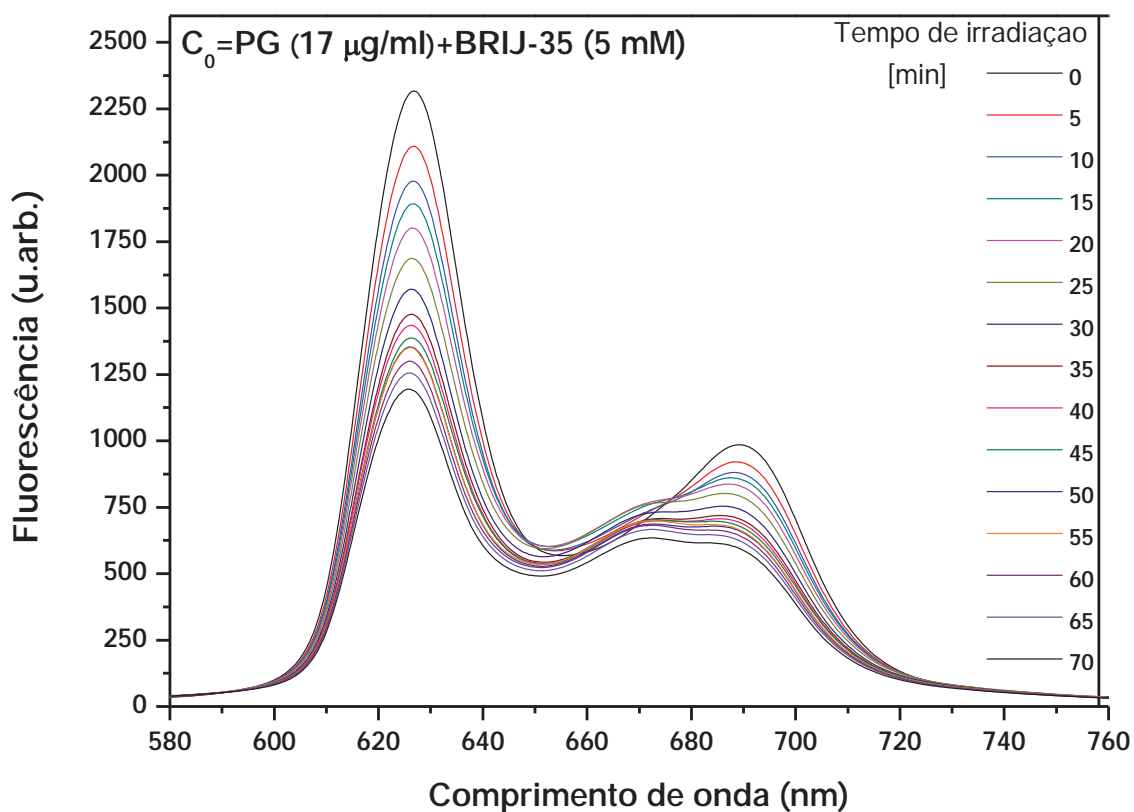


Figura 24 - Espectros de fluorescência coletados durante a fotodegradação

Há duas formas de calcular o decaimento de fluorescência: analisando como a intensidade de fluorescência no pico principal do espectro (626,78 nm) varia com o tempo, ou através do valor da área sob o espectro em cada tempo. Os dois cálculos considerados e os resultados obtidos foram os mesmos, expressos na Figura 25 a).

Considerando a proporcionalidade entre a fluorescência e a concentração do FS, foi possível à construção da Figura 25 b), na qual a exponencial ajustada aos dados determinou a constante de decaimento correspondente da equação (9). Optou-se pela análise até 50 minutos, pois o comportamento dos pontos se mostrou suficiente para constatar um decaimento exponencial.

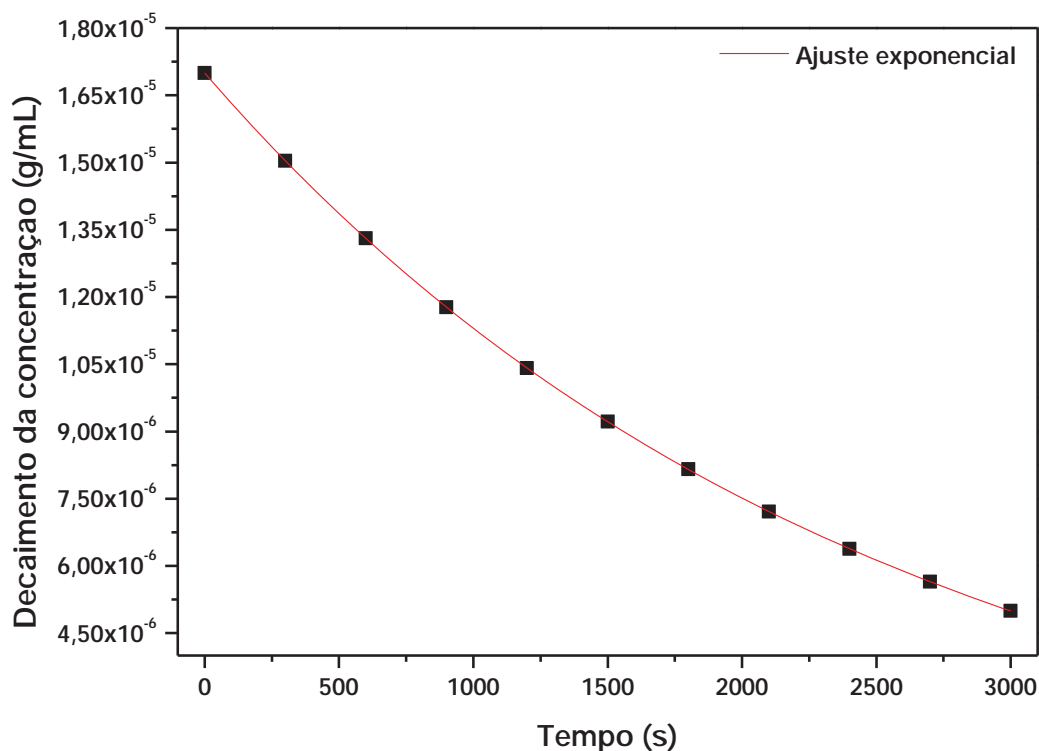


Figura 25 - Decaimento de fluorescência e concentração na fotodegradação

No experimento de fotodegradação descrito obteve-se aproximadamente 40,8 minutos para constante de decaimento da concentração;  $6,92 \times 10^{12}$  moléculas degradadas por segundo e  $0,01 \mu\text{M/s}$  na taxa de degradação.

## 5.2 Penetração da luz

Com os experimentos realizados foram obtidos os espectros de emissão do LED como função da profundidade em *phantom*. Todavia, deve-se utilizar os dados a partir de 2 mm de profundidade, devido ao fato de que ao coletar os espectros próximos a superfície, a fibra ainda não estará totalmente submersa e captará parte da intensidade de fora do *phantom* e de dentro ao mesmo tempo, não correspondendo ao valor apenas da solução.

No *phantom* espalhador, foram feitas medidas até 24 mm de profundidade (na qual o espectro de intensidade já tinha sido reduzido aproximadamente quatro vezes), como mostrado na Figura 26.

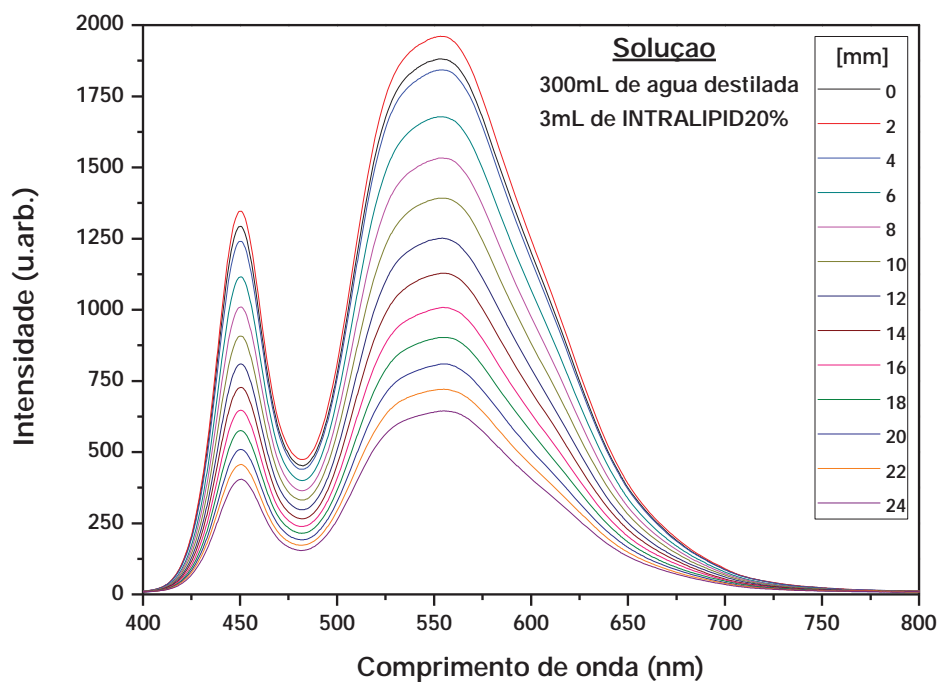


Figura 26 - Espectro de intensidades nas profundidades do *phantom* espalhador.

Já no *phantom* absorvedor, foram realizadas medidas até 6 mm de profundidade (onde o espectro medido já apresenta intensidade baixa) como mostrado na Figura 27.

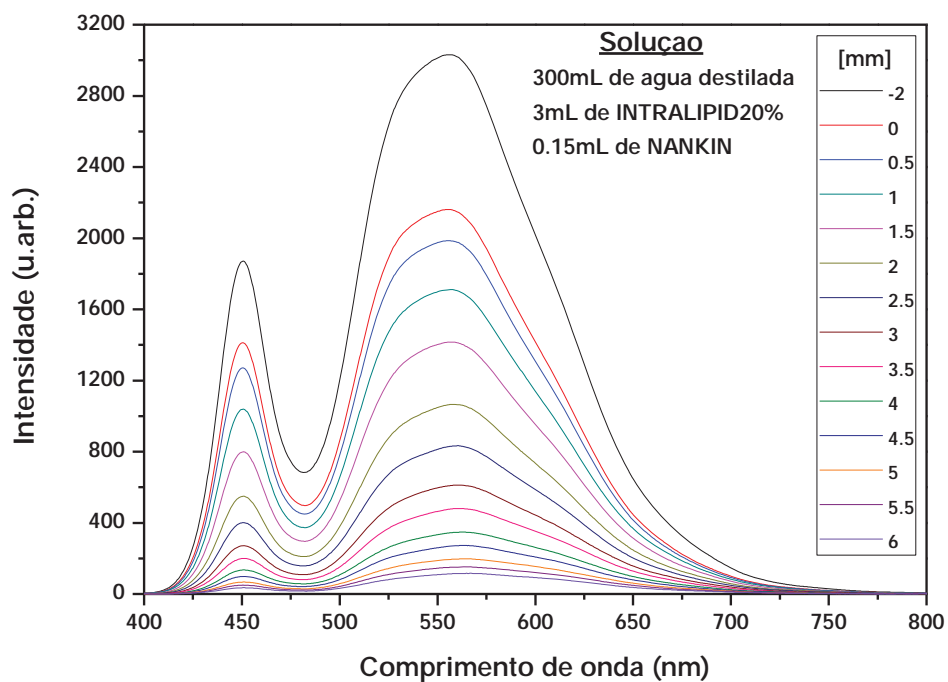


Figura 27 - Espectro de intensidades nas profundidades do *phantom* absorvedor.

Na Figura 28 foi graficado o comportamento das intensidades nos picos de emissão do LED em 450,51 nm e 555,87 nm no *phantom* absorvedor ao longo da profundidade.

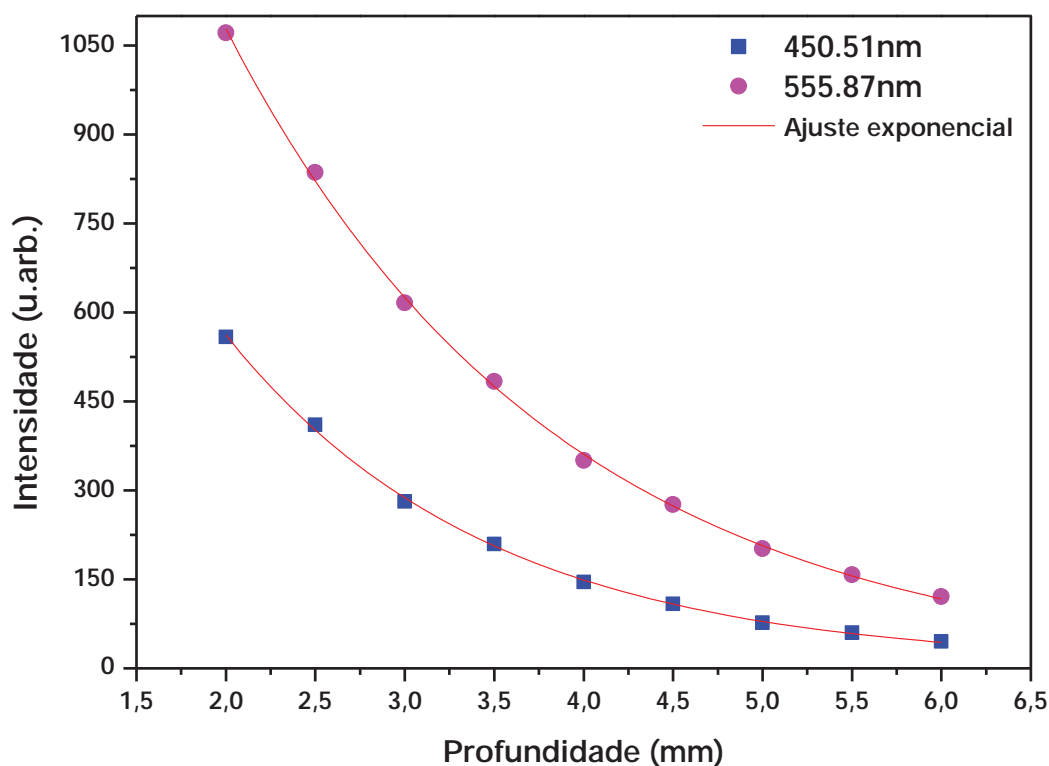


Figura 28 - Intensidade dos picos de emissão do LED branco em função da profundidade.

Através do ajuste exponencial nos dados experimentais da Figura 28, foi possível estimar o valor do coeficiente de atenuação da intensidade de luz referente aos comprimentos de onda dos picos de emissão do LED branco, estes valores estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Coeficientes de atenuação de intensidade nos picos do LED branco.

Comprimento de onda (nm)	$\mu$ ( $\text{mm}^{-1}$ )
450,51	0,68
555,87	0,54

Pode-se dizer que a intensidade no pico de 555,87 nm penetra mais que a do pico de 450,51 nm. Na Figura 29, analisou-se como os valores de intensidade da fonte de luz correspondentes nas bandas de absorção do Photogem<sup>®</sup> (selecionados partir da Figura 12) são atenuados no meio absorvedor.



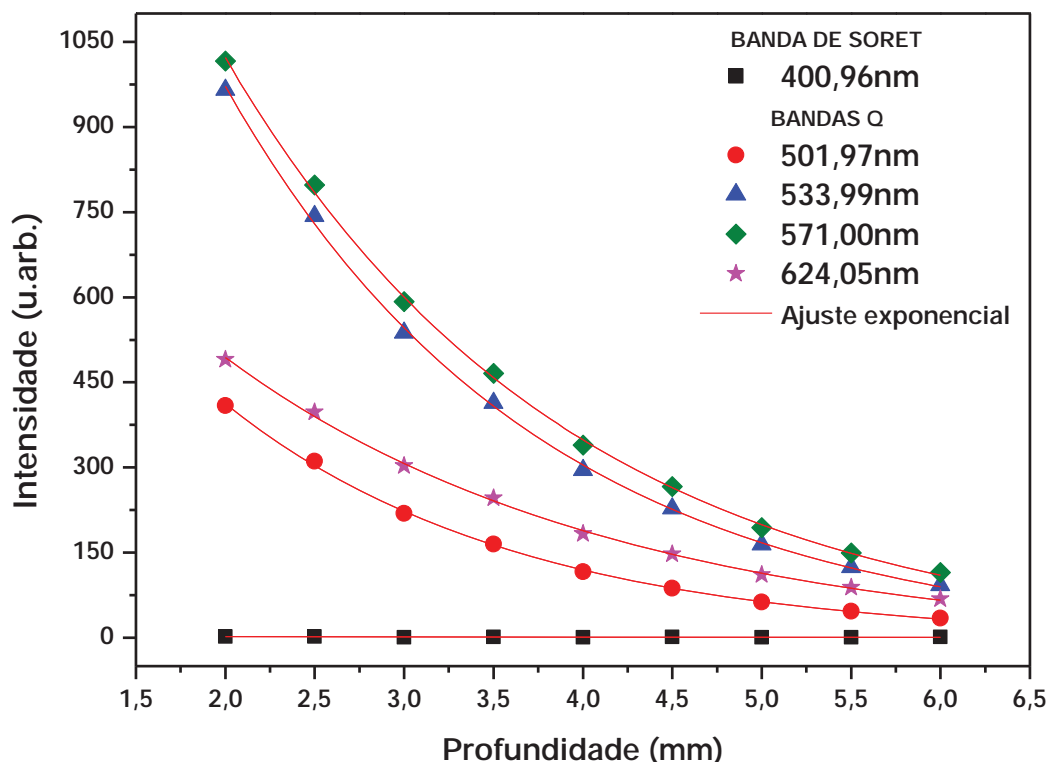


Figura 29 - Intensidade do LED branco nas bandas de absorção do Photogem® no phantom absorvedor.

Através do ajuste exponencial nos dados experimentais da na Figura 29, foi possível calcular o valor do coeficiente de atenuação da intensidade de luz referente aos comprimentos de onda das bandas de absorção do Photogem®, estes valores estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Coeficientes de atenuação de intensidade do LED branco nas bandas de absorção do Photogem®.

Comprimento de onda (nm)	$\mu$ ( $\text{mm}^{-1}$ )
400,96	$\approx 0$
501,97	0,61
533,99	0,57
571,00	0,52
624,05	0,47

É possível concluir que a emissão do LED branco na banda de Soret (400,96 nm) é muito baixa e por isso, alcança apenas região mais superficial do *phantom*. Referente aos comprimentos de onda das bandas Q de absorção do Photogem®; aqueles para os quais a intensidade da fonte de luz mais penetra no meio são: o 624,05 nm; 571,00 nm; 533,99 nm e 501,97 nm; respectivamente.

### 5.3 Modelo de dose limiar

Os cálculos de dose limiar realizados a partir do coeficiente de atenuação do Photogem® estão representados na Figura 30 e foram obtidos através da equação (14).

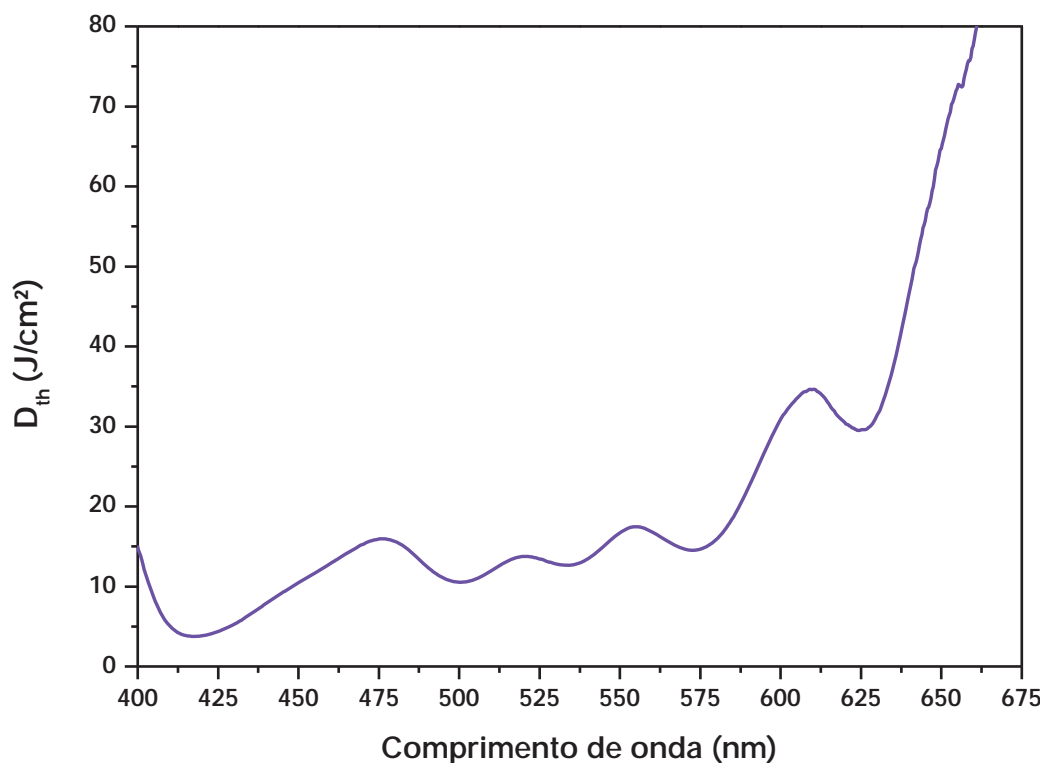


Figura 30 - Dose Limiar em função do comprimento de onda.

Para validação do modelo buscou-se a comparação com trabalhos publicados. Em 2007, foi estimado experimentalmente o valor dose limiar de TFD em fígado sadio de ratos utilizando Photogem<sup>®</sup> e um laser em 630 nm como fonte de luz<sup>24</sup>. Nas mesmas condições, em 2011, outro trabalho analisou os efeitos do uso de laser em 600 nm, 630 nm e 660 nm e da combinação entre eles, estimando-se o valor do  $D_{th}$ <sup>25</sup>.

A Tabela 4 mostra valores de dose limiar dos comprimentos de onda encontrados nos artigos e os correspondentes valores calculados pelo modelo.

Tabela 4 - Valores de dose limiar calculados pelo modelo da literatura.

$\lambda$ (nm)	Dose limiar (J/cm <sup>2</sup> )	
	Modelo	Literatura
600	30,1	134 <sup>25</sup>
630	31,5	86 <sup>25</sup> , 18 <sup>24</sup>
660	77,6	50 <sup>25</sup>

Ao tratar de experimentos realizados em animais deve-se levar em conta a grande variabilidade entre eles, portanto, o número de animais em um grupo para análise da variação dos valores obtidos é de grande importância.

No trabalho realizado em 2007 (dados que mais se aproximam ao modelo) foram utilizados 147 animais<sup>21</sup>, enquanto no publicado em 2011, foram utilizados apenas 15 animais<sup>25</sup>. É difícil quantificar quão preciso é o modelo, uma vez que poucos dados relacionados constam na literatura.

A comparação entre o modelo e os resultados obtidos experimentalmente estão praticamente dentro de um fator de 2 a 3. Sistemáticamente os valores do modelo estão abaixo. Deve-se observar que as medidas experimentais estão normalmente sujeitas à 50% de erro ou mais.

É importante ressaltar que o modelo é simplificado, ele não leva em conta: a rápida regeneração tecidual, fato que o torna naturalmente com valores inferiores; o espectro do coeficiente de atenuação no fotossensibilizador no fígado que difere do comportamento *in vitro*; utilizou-se a dose volumétrica com  $10^{19}$  fótons absorvidos por  $\text{cm}^3$ , este valor possui esta ordem de grandeza fixa mas, há trabalhos que mostram que para cada fotossensibilizador existe um fator multiplicado<sup>22; 24; 26</sup> que pode interferir nos resultados.

#### 5.4 Modelo para profundidade de necrose

Para comparação dos resultados do modelo, os cálculos foram feitos com o LED branco e um LED vermelho, supondo 20 minutos de irradiação e  $350 \text{ mW/cm}^2$  de intensidade total.

- **A partir do modelo de dose limiar**

Para o LED branco, o resultado obtido pelo modelo foi uma necrose de 0,18 mm em 442,80 nm, ilustrado na Figura 31.

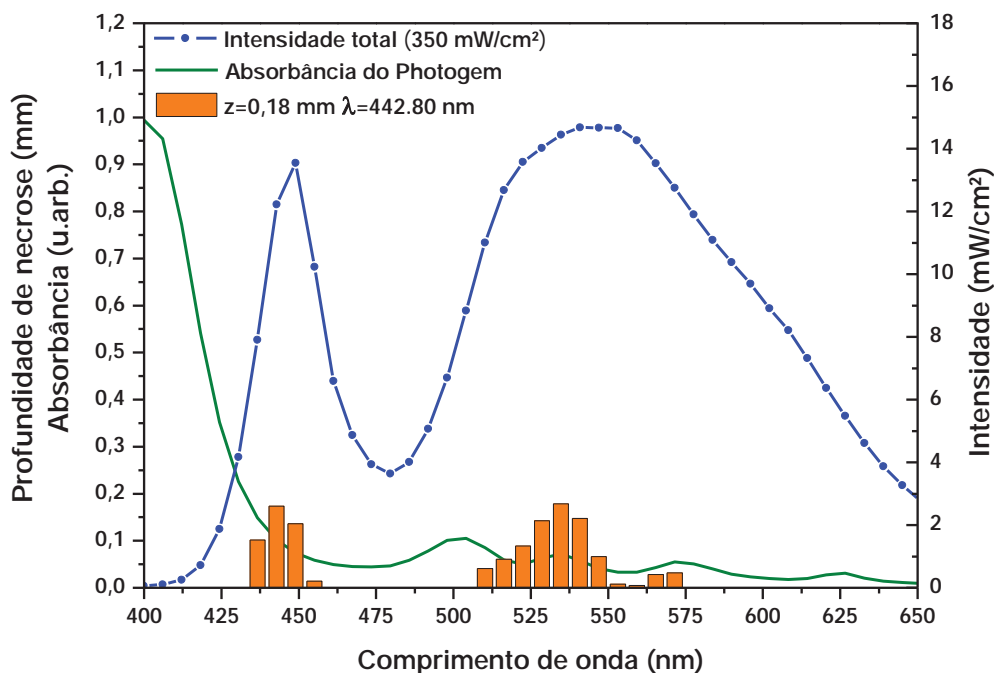


Figura 31 - Profundidade de necrose com LED branco e Photogem®.

A análise para um LED vermelho está ilustrada na Figura 32. Neste caso, o modelo prevê uma necrose de 0,23 mm em 627,29 nm.

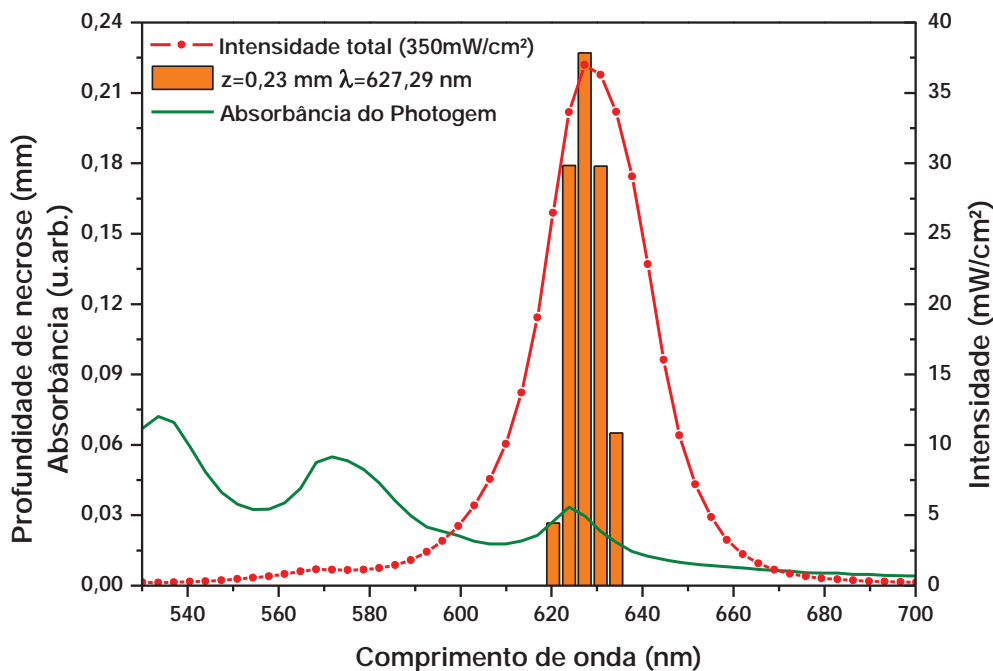


Figura 32 - Profundidade de necrose com LED vermelho e Photogem®.

Segundo esta análise do modelo, a necrose obtida no tratamento de TFD com Photogem® em fígado sadio de ratos mostra que o uso do LED vermelho seria melhor que o do LED branco.

- **Através da quantidade de fótons absorvidos**

Os resultados obtidos estão expressos na Figura 33, como descrito no modelo, tal que com  $10^{19}$  fótons absorvidos por  $\text{cm}^3$  será induzida a mínima necrose.

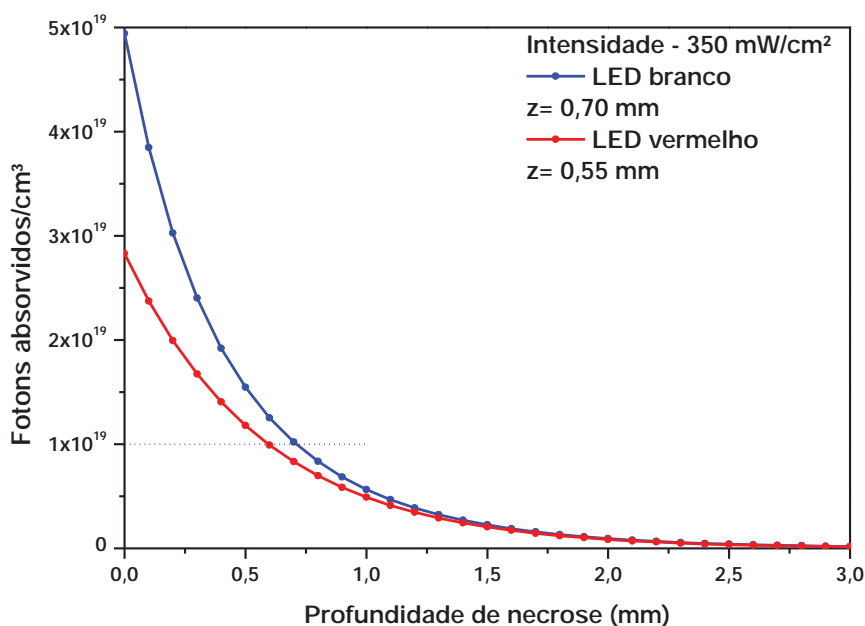


Figura 33 - Profundidade de necrose com LEDs branco e vermelho.

É possível observar que nos parâmetros escolhidos, a profundidade de necrose é de 0,70 mm para o LED branco e 0,55 mm para o LED vermelho. Ou seja, há maior viabilidade no tratamento com o LED branco que com o vermelho em TFD.

- **Comparação das análises**

Um artigo publicado em 2011, registou que a profundidade de necrose esperada para o tratamento de TFD em fígado sadio de ratos, com concentração de Photogem<sup>®</sup> de 1,5 mg por kg do animal é de: 0,2 mm para um laser de diodo em 630 nm e de 0,1 mm para um laser de argônio em 600 nm<sup>25</sup>. Um trabalho de 2007, mostra nas mesmas condições uma profundidade de necrose de 0,71 mm para um laser de diodo de 630 nm.<sup>24</sup> Isto indica que os resultados do modelo para profundidade de necrose para o LED vermelho; 0,23 mm e 0,55mm; estão na mesma ordem de grandeza das publicações encontradas.

Foi relatado na literatura o sucesso da Terapia Fotodinâmica com lâmpadas brancas associadas com filtros para o tratamento da doença de Bowen<sup>27</sup>.

Outro estudo mostrou que o uso de lâmpada branca em TFD para o tratamento de câncer de esôfago para lesões de até 2 mm é alternativa para o laser de diodo em 630 nm<sup>28</sup>.

Um trabalho publicado 2012, mostra que a TFD com luz branca combinada com Terapia Fototérmica, com ftalocianina de alumínio e AuNRs, é uma promissora estratégia para melhorar o tratamento de cânceres<sup>29</sup>.

Porém, não há relatos que mostram cálculos ou medidas experimentais de TFD com LED branco para comparação dos resultados obtidos pelo modelo.

Foi possível perceber, entretanto, que a profundidade de necrose através do modelo de dose limiar e pela quantidade de fótons absorvidos, divergem na viabilidade do uso do LED branco em vez do vermelho.

## 6. CONCLUSÃO

No experimento de fotodegradação foi possível concluir que o LED branco é capaz de degradar as moléculas de FS.

Pelo estudo da penetração da luz, constatou-se que os comprimentos mais próximos do vermelho do LED branco são os que mais penetram em um meio absorvedor, que por simular as propriedades ópticas de tecidos biológicos, pode ser associado ao tecido de tratamento.

Os resultados obtidos pelo modelo de Dose limiar são considerados satisfatórios na discussão realizada, considerando a dificuldade de obter este parâmetro de forma experimental, a simplicidade dos cálculos e as poucas publicações encontradas para o Photogem<sup>®</sup>. Pode haver a repetição do modelo para fotossensibilizadores mais utilizados em outros países em busca da validação do modelo a partir de um maior número de dados publicados.

Os modelos para estimar a profundidade de necrose são simples, com alguns ajustes, poderão se aproximar mais dos valores experimentais. A grande vantagem está em realizar o cálculo para uma fonte de luz, fotossensibilizador e tecido escolhidos para um determinado tratamento. O intuito é poder manipular os dados e indicar qual a melhor combinação possível. Esta parte do trabalho ainda está em estudo e visa aperfeiçoar os resultados obtidos com a introdução de novos parâmetros a serem considerados.

Há previsões para realização de Terapia Fotodinâmica com LED branco em animais para melhor compreensão dos dados dos modelos.

Neste trabalho mostrou-se que o uso de luz branca em Terapia Fotodinâmica é possível, e espera-se que esta combinação possa ser melhor entendida para otimização do tratamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, JUN 17 1998 ISSN 0027-8874.
- <sup>2</sup> POST, J. G.; POELE, J. A. M. T.; SCHUITMAKER, J. J.; STEWART, F. A. A comparison of functional bladder damage after intravesical photodynamic therapy with three different photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 63, n. 3, p. 314-321, MAR 1996. ISSN 0031-8655.
- <sup>3</sup> MACHADO, A. E. D. H. **Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas**: Química Nova: 237-243 p. 2000.
- <sup>4</sup> KURACHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L. G.; FILHO, G. A. C.; SOUZA, C. S.; BAGNATO, V. S. **Clinical experience of PDT in Brazil: a 300 patient overview**. Conference on Optical Methods for Tumor Treatment and Detection - Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XIV. San Jose, CA: Spie-Int Soc Optical Engineering. Jan 22-23, 2005. 218-226 p.
- <sup>5</sup> MIMA, E. G. D.; PAVARINA, A. C.; SILVA, M. M.; RIBEIRO, D. G.; VERGANI, C. E.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Denture stomatitis treated with photodynamic therapy: five cases. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 112, n. 5, p. 602-608, NOV 2011. ISSN 1079-2104.
- <sup>6</sup> MIMA, E. G.; VERGANI, C. E.; MACHADO, A. L.; MASSUCATO, E. M. S.; COLOMBO, A. L.; BAGNATO, V. S.; PAVARINA, A. C. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 10, p. E380-E388, OCT 2012. ISSN 1198-743X.
- <sup>7</sup> TRINDADE, F. Z.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, A. P. D.; BAGNATO, V. S.; VERGANI, C. E.; COSTA, C. A. D. Toxicity of photodynamic therapy with LED associated to Photogem (R): An in vivo study. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 403-411, MAR 2012. ISSN 0268-8921.
- <sup>8</sup> NORO, G. A.; CASARIN, R. C. V.; CASATI, M. Z.; GIOVANI, E. M. PDT in non-surgical treatment of periodontitis in HIV patients: A split-mouth, randomized clinical trial. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 4, p. 296-302, APR 2012. ISSN 0196-8092.
- <sup>9</sup> BAGNATO, V.S et. al. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. Brasil: Livraria da Física, 2008. ISBN 978-85-88325-97-5.
- <sup>10</sup> SABINO, L. G. **Modelo matemático de distribuição larga de dose limiar em tumores submetidos a múltiplas sessões de Terapia Fotodinâmica**. 2010. 76 Dissertação Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- 11 GRECCO, C. **Avaliação da resposta fotodinâmica em fígado normal de ratos utilizando fonte de luz pulsada no regime de femtossegundos**. 2009. 74 Dissertação Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 12 PRATAVIEIRA, S. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema de imagem multiespectral para o diagnóstico óptico de lesões neoplásicas**. 2010. 82 Dissertação Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 13 MENEZES, P. F. C. D. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006. 181 Tese Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 14 PERUSSI, J. Photodynamic inactivation of microorganisms. **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, JUL-AUG 2007. ISSN 0100-4042.
- 15 EMILIO, C. R. **Comparação da eficácia do ácido 5-aminolevuliníco com a de seu metil éster utilizando-se a Terapia Fotodinâmica no tratamento de carcinoma espinocelular felino**. 2008. 127 Tese Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 16 GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; ANDERSON, R. G. W.; RUSSELL, D. W.; SCHNEIDER, W. J. Receptor-Mediated Endocytosis - Concepts emerging from the LDL receptor system. **Annual Review of Cell Biology**, v. 1, p. 1-39, 1985. ISSN 0743-4634.
- 17 NSEYO, U. Photodynamic Therapy. **Urologic Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 591-599, AUG 1992. ISSN 0094-0143.
- 18 REQUENA, M. B. et al. Analysis of the feasibility of the use of white LED and Photogem® in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 2, p. 199, 2011. ISSN-1572-1000.
- 19 FERREIRA, J.; MENEZES, P. F. C.; KURACHI, C.; SIBATA, C. H.; ALLISON, R. R.; BAGNATO, V. S. Comparative study of photodegradation of three hematoporphyrin derivative: Photofrin®, Photogem® and Photosan. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 10, p. 743-748, OCT 2007. ISSN 1612-2011.
- 20 VANSTAVEREN, H. J.; MOES, C. J. M.; VANMARLE, J.; PRAHL, S. A.; VANGEMERT, M. J. C. Light-scattering in Intralipid-10-percent in the wavelength range of 400-1100 nm. **Applied Optics**, v. 30, n. 31, p. 4507-4514, NOV 1991. ISSN 0003-6935.
- 21 FERRAZ, R. C. M. C.; FERREIRA, J.; MENEZES, P. F. C.; SIBATA, C. H.; SILVA, O. C. E.; BAGNATO, V.S. Determination of Threshold Dose of Photodynamic Therapy to Measure Superficial Necrosis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 1, p. 93-99, FEB 2009. ISSN 1549-5418.
- 22 PATTERSON, M.; WILSON, B.; GRAFF, R. In vivo tests of the concept of Photodynamic Threshold Dose in normal rat-liver photosensitized by Aluminum Chlorosulfonated Phthalocyanine. **Photochemistry and Photobiology**, v. 51, n. 3, p. 343-349, MAR 1990. ISSN 0031-8655.



- 23 PARSA, P.; JACQUES, S.; NISHIOKA, N. Optical-properties of rat-liver between 350 and 2200 nm. **Applied Optics**, v. 28, n. 12, p. 2325-2330, JUN 15 1989. ISSN 0740-3224.
- 24 FERRAZ, R. C. M. C.; FERREIRA, J.; MENEZES, P. F. C.; SIBATA, C. H.; SILVA, O. C. E.; BAGNATO, V. S. Experimental determination of threshold dose in photodynamic therapy in normal rat liver. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 6, p. 469-475, JUN 2007. ISSN 1612-2011.
- 25 ATIF, M.; FAKHAR-E-ALAM, M.; SABINO, L. G.; IKRAM M.; ARAUJO, M. T.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S.; ALSALHI, M. S. Analysis of the combined effect of lasers of different wavelengths for PDT outcome using 600, 630, and 660 nm. **Laser Physics Letters**, v. 8, n. 5, p. 386-392, MAY 2011. ISSN 1612-2011.
- 26 FARRELL, T. J.; WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S.; OLIVO, M. C. Comparison of the in vivo photodynamic threshold dose for photofrin, mono- and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine using a rat liver model. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 3, p. 394-399, SEP 1998. ISSN 0031-8655.
- 27 STABLES, G. I.; STRINGER, M. R.; ROBINSON, D. J.; ASH, D. V. Large patches of Bowen's disease treated by topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 136, n. 6, p. 957-960, JUN 1997. ISSN 0007-0963.
- 28 MORDON, S.; MAUNOURY, V. Using white light during photodynamic therapy: visualization only or treatment? **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 7, p. 765-771, JUL 2006. ISSN 0954-691X.
- 29 WANG, J.; TANG, H. Y.; YANG, W. L.; CHEN, J. Y. Aluminum phthalocyanine and gold nanorod conjugates: the combination of photodynamic therapy and photothermal therapy to kill cancer cells. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 16, n. 7-8, p. 802-808, Jul-Aug 2012. ISSN 1088-4246. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000307022900009 >.

**APÊNDICE A - Rotina para conversão de unidades**

```
clear
clc

%Espectro de Intensidade da fonte de luz [u.arb.]
I=dlmread('I.dat');

%Comprimento de onda [nm]
L=dlmread('L.dat');

n=input('Insira o número de pontos: ');

for i=1:(n-1);

    d(i)=L(i+10)-L(i);
    A(i)=((I(i)+I(i+10))./2).*d(i);
    M(i)=(L(i)+L(i+10))./2;

end

%Area de intensidade da fonte de luz [u.arb x nm]
dlmwrite(A.dat',A);
disp('Arquivo salvo: A.dat');

%Comprimento de onda médio [nm]
dlmwrite('M.dat',M);
disp('Arquivo salvo: M.dat');
```

## APÊNDICE B – Rotina de profundidade de necrose: dose limiar

```

clear
clc

%Espectro de Intensidade da fonte de luz [mW/cm²]
I=dlmread('I.dat');
%Conversão para [W/cm²]
I=I*10^-3;

%Seção de choque do FS [cm²]
sc=dlmread('sc.dat');

%Dose limiar em função do comprimento de onda [J/cm²]
Dth=dlmread('Dth.dat');

%Coeficiente de atenuação do tecido (fígado) [cm⁻¹]
m=dlmread('m.dat');

n=input('Insira o numero de pontos: ');
t=input('Insira o tempo de irradiação em [s]: ');
C=input('Insira a concentração em [moléculas/cm³]: ');

for i=1:(n);
    D(i)=sc(i)*C;
    A(i)=(-1)/(D(i)+m(i));
    E(i)=I(i)*t;
    B(i)=log(Dth(i)/E(i));
    z(i)=A(i)*B(i);
    s(i)=0;
    if le(z(i),s);
        z(i)=0;
    end
end

%Espectro da profundidade de necrose [cm]
dlmwrite('z.dat',z);
disp('Arquivo salvo: z.dat');

```

### APÊNDICE C – Rotina de profundidade de necrose: fótons absorvidos

```

clear
clc

%Espectro de absorbancia do FS [u.arb.]
A=dlmread('A.dat');

%Espectro de intensidade da fonte de luz [mW/cm²]
I=dlmread('I.dat');
%Conversão para [W/cm²]
I=I*10^-3;

%Coeficiente de atenuação do tecido (fígado) [cm⁻¹]
m=dlmread('m.dat');

%Comprimento de onda [nm]
L=dlmread('L.dat');
%Conversão para [m]
L=L*10^-9;

n=input('Insira o número de pontos dos arquivos: ');
N=input('Insira a profundidade de necrose (z) final em [cm] a
ser avaliada: ');
Q=input('Insira o numero de pontos de z: ');
t=input('Insira o tempo de irradiação em [s]: ');

%Constante de Planck [J.s]
h=6.626068*10^-34;

%Velocidade da luz [m/s]
c=299792458;

B=(t)/(h*c);

dz=N/Q;

for z=0:dz:N

    f=0;
    for j=1:n
        f=(A(j)*I(j)*exp(-m(j)*z)*L(j)*B)+f;
    end

    h=int8((z/dz)+1);
    F(h,1)=z;
    F(h,2)=f;

```

```
dlmwrite('F.dat',F);  
  
end  
  
%Fotons absorvidos por cm2  
disp('Arquivo salvo: F.dat');
```