UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

DILLEYS FERREIRA DA SILVA

Alternativas para otimização da ação fotodinâmica no tratamento de câncer superficial

São Carlos
2014

DILLEYS FERREIRA DA SILVA

Alternativas para otimização da ação fotodinâmica no tratamento de câncer superficial

Versão Corrigida

(Original na unidade)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências e Engenharia dos Materiais.

Área de concentração: Desenvolvimento
Caracterização e Aplicação de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador
Bagnato

São Carlos
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

S587a Silva, Dilley's Ferreira da
Alternativas para otimização da ação fotodinâmica
no tratamento de câncer superficial / Dilley's Ferreira
da Silva; orientador Vanderlei Salvador Bagnato. São
Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais e
Área de Concentração em Desenvolvimento Caracterização
e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
Carlos; Instituto de Física de São Carlos; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2014.

1. Hidrogel. 2. Fototerapia. 3. Dosimetria. I.
Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **DILLEYS FERREIRA DA SILVA.**

Título da tese: "Alternativas para otimização da ação fotodinâmica no tratamento de câncer superficial".

Data da defesa: 28/11/2014.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Vanderlei Salvador Bagnato**
(Orientador)
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Aprovada

Dra. **Débora Marcondes Bastos Pereira Milori**
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA)

Aprovada

Dra. **Priscila Fernanda Campos de Menezes**
(Pós-Doutoranda/IFSC)

Aprovada

Prof. Dr. **Nivaldo Antonio Parizotto**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADA

Prof. Dr. **Luciano Bachmann**
(Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/FFCLRP-USP)

APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Titular **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Aos meus filhos, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vanderlei, pela atenção e apoio durante o processo de construção deste trabalho e orientação. A Prof^a Cristina Kurachi pelo auxílio e coorientação. Ao Dr. José Dirceu que me acompanhou para finalização desta tese. Ao grupo de Biofotônica e em especial ao Clovis, a Lilian, a Patrícia, a Michelle, a Alessandra, ao Sebastião e a Thereza que participaram diretamente da execução deste doutorado.

Aos amigos do grupo de Polímeros. As amigas, Rafa, Drika, Yurika e Vaninha pelo café e amizade. A Débora Balogh e ao Bruno Bassi pela ajuda no Laboratório.

Ao meu namorado Romain, minha filha Anahi, meu filho Anakin, minha tia Francisca, meus tios Gonzaga e Eunice e meu afilhado Luís Felipe, por preencherem minha vida de alegria. A minha avó Dona Domingas, que me ensinou a sorrir, a amar e a ter fé.

Ao Instituto de Física de São Carlos e a Escola de Engenharia de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“Porque eu amo infinitamente o finito,
Porque eu desejo impossivelmente o possível,
Porque quero tudo, ou um pouco mais, se puder ser,
Ou até se não puder ser.”

Álvaro de Campos

RESUMO

SILVA, D. F. **Alternativas para otimização da ação fotodinâmica no tratamento de câncer superficial**. 2014. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O estudo da distribuição e propagação da luz em tecidos biológicos é importante para diversas aplicações em fototerapias e diagnóstico. Os tecidos biológicos são considerados meios túrbidos, onde existe uma combinação de absorção e espalhamento, e a determinação do comportamento da luz dentro deles tem sido estudado através da aplicação de modelos que tem suas limitações. Então, determinar e manipular a distribuição para entrega da melhor dose de luz é crucial para o sucesso dos tratamentos. Para casos de Terapia Fotodinâmica, em particular, os tratamentos de lesões planas lisas, em grande parte dos casos, são bem sucedidos. Este sucesso deve-se ao fato de que existe uma boa possibilidade de distribuição uniforme da luz dentro do tecido da lesão tratada. Por outro lado, para tumores espessos de superfícies irregulares, a iluminação é dificultada devido à presença de sombras, rachaduras entre outras imperfeições sobre a lesão. Deste modo, a entrega da dose de luz inadequada e a iluminação não homogênea, resultam em regiões de necroses parciais e recidiva. Portanto, é decisivo melhorar o perfil da distribuição dentro do tecido. Neste trabalho avaliamos o acoplamento da luz utilizando um gel posicionado entre a fonte ($\lambda = 630\text{nm}$) e a superfície de um *phantom* sólido. O acoplamento do feixe foi melhorado incorporando baixas concentrações de espalhadores ao gel. Imagens do perfil de distribuição da luz foram coletadas e transformadas em matrizes de intensidades, e posteriores curvas de isointensidades. Nossos resultados mostraram uma grande melhora na uniformidade da distribuição. De fato, utilizando um meio acoplador, conseguimos entregar um feixe mais homogêneo promovendo uma melhor iluminação. Esta técnica elimina drasticamente os efeitos da rugosidade da superfície do *phantom* dentro do volume tratado. Acreditamos que esse trabalho mostra uma possibilidade de melhora na dosimetria para fototerapias.

Palavras-chave: Hidrogel. Fototerapia. Dosimetria.

ABSTRACT

SILVA, D. F. **Alternatives for optimization of photodynamic action in superficial cancer treatment.** 2014. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The light propagation and distribution studies in biological media are important for several phototherapy and diagnostic applications. The biological tissues are considered turbid media, where there is absorption and scattering combination, and determine the light behavior inside these tissues have been studied by models that have some limitations. Then, to determine and control the light distribution to improve the light dose delivery is important for the treatment to be successful. For particular cases, such as Photodynamic Therapy (PDT) applied on smooth planar lesions, treatment is appropriated, since there is a good possibility of uniform distribution of light within the tissue of the treated lesion. On the other hand, tumors with more thickness may not receive the needed doses of energy to cause its death. For an efficient treatment by photodynamic therapy, an optimal coupling of light inside the lesion tissue is required. Shadow effects, slits or physical irregularities in the lesion can lead to a non-homogeneous light distribution inside the tissue. The results can be partial necrosis regions and tumor recurrence. Therefore, it is crucial to improve the light profile inside the tissue to overcome these problems. In this study, we measured the light profile inside the *phantom* after the light passing through a gel as coupler. We used a solid *phantom* as biological tissue model and used a red laser ($\lambda = 630$ nm) as light source with an optical fiber to direct illumination. The coupling is controlled by introducing a gel with low concentration of scatterers between the fiber and the *phantom*. We collected pictures of the light profile with a camera and the data were processed with MatLab software. Our results show a strong improvement in the light distribution when the gel with scatterers is positioned between the fiber and the tissue. In fact, a more homogeneous laser beam is delivered to the tissue, promoting a better light distribution. This technique eliminates drastically the roughness effect of the *phantom* surface in the bulk. We believe that this work shows a possibility of dosimetry improvement for phototherapy.

Keywords: Hydrogel. Phototherapy. Dosimetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Luz incidente sobre uma interface plana sofre refração. O ângulo de refração θ_2 , é dado em termos do ângulo de incidência θ_1 , e os índices de refração n_1 e n_2 dos dois meios, sendo que o ângulo de reflexão é igual ao ângulo de incidência.....	27
Figura 2: Reflexão especular ocorre quando a luz é refletida por uma superfície opticamente lisa; reflexão em diversas direções ocorre quando a luz é refletida por uma superfície opticamente áspera.	28
Figura 3: Reflexão especular de um raio de luz usando a equação de Fresnel para luz não polarizada incidindo através do ar em meios de índice de refração 1,5 e 1,33.	28
Figura 4: Distribuição de luz não-uniforme dentro de um tecido com superfície irregular.	29
Figura 5 Esquema de um feixe de luz incidindo sobre um tecido com ângulo com relação à normal de uma interface ar-tecido. Uma parte do feixe é refletido especularmente com ângulo e o restante é transmitido com ângulo.	33
Figura 6: Espectro de absorção dos principais componentes dos tecidos e a chamada janela terapêutica óptica.	34
Figura 7 - Estrutura geral do Polímero carbopol	43
Figura 8: Experimental setup para aquisição de imagens. A fibra foi introduzida na cavidade preenchida pelo gel de carbopol e iluminou o sistema, enquanto a câmera CCD registrava as imagens de luz se propagando no meio.	50
Figura 9: Comparação curvas de isointensidades de Origin e MatLab, respectivamente.	51
Figura 10: Detalhes da cavidade moldada no phantom.....	52
Figura 11: esquema das diferentes formas de lesões estudadas, onde cada retângulo representa uma vista frontal da cavidade produzida no phantom e preenchida pelo gel. A) lesão plana de superfície rugosa; B) lesões de superfície verrugosa com parte superior íntegra; C) lesões de superfície verrugosa com parte superior ulcerada	53
Figura 12: esquema de aquisição de imagem <i>ex vivo</i> . A fibra perpendicular à superfície da pele ("Fibra") foi utilizada na iluminação superficial; a fibra paralela ("Fibra Difusora") foi utilizada dentro da hipoderme, no experimento intersticial.	55

Figura 13: Curvas de distribuição para diferentes composições de Gel/ Lipofundin®, com concentrações entre 0,2-1,2 µl/g, com intervalos de 0,1 µl/g. A concentração "zero" representa apenas o gel, para fins de comparação	59
Figura 14: Propagação da luz no <i>phantom</i> sem gel (SG), com gel (G) e com gel + espalhador (GE), respectivamente (tempo de exposição da câmera de 2 ms). O retângulo branco corresponde a área analisada para obtenção das curvas de isodoses, escolha de modo a evitar interface com o fundo da cavidade.	61
Figura 15: Propagação da luz dentro do <i>phantom</i> com Gel, sem Gel e com Gel + espalhador	62
Figura 16: Curvas de Isointensidades	64
Figura 17: Ajustes gaussianos para profundidade de 2 mm.....	65
Figura 18 Parâmetro R ² em função da profundidade.....	66
Figura 19: largura do feixe ao longo das profundidades.....	68
Figura 20: decaimento do feixe ao longo da linha de propagação Para SG, G e GE.....	69
Figura 21: Flutuação da dose de luz em torno de um valor mínimo; Nos casos com gel acoplador (GE) a distribuição é menos irregular e não cruzam a linha de valor mínimo.....	70
Figura 22: Lesões com forma verrugosa de superfície íntegra	72
Figura 23: Lesões com forma verrugosa lesionada sem parte superior (ulceradas)	72
Figura 24: Mudança na distribuição de luz na presença dos acopladores sobre as lesões verrugosas.	73
Figura 25: lesões verrugosa sem o topo, perfil melhorado na presença do gel acoplador.....	73
Figura 26: Diagrama de Arndt- Schulz	75
Figura 27: expansão do diametro do melanoma	78
Figura 28 (a) a luz não poderá penetrar na lesão, (b) injeção do gel (hidro gel) na região logo abaixo da lesão, (c) iluminação da lesão (d) borda da lesão sofrerá necrose (e) iluminação por fibra difusora (f) zona de subnecrose.....	79
Figura 29: Iluminação externa da pele suína <i>ex vivo</i> . Estas imagens já são as porções editadas para obtenção das curvas de isodose.....	81
Figura 30: Curvas de isointensidade obtidas das imagens de distribuição para iluminação externa em pele de porco <i>ex vivo</i>	82

Figura 31: iluminação intersticial pele suína.....	84
Figura 32: curvas de isointensidade intersticial	84
Figura 33: Histograma da quantidade de Pixels com uma determinada intensidade para a iluminação intersticial em pele de porco SG e CG.....	85
Figura 34: Ilha de células viáveis em regiões necróticas.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PDT – Terapia Fotodinâmica (do inglês, *PhotodynamicTherapy*)

PS – Fotossensibilizador (do inglês, *Photosensitizer*)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *ReactiveOxygenSpecies*)

LILT – Laser Terapia de Baixa Intensidade (do ingles, *low intensity laser therapy*)

OCT – Tomografia de Coerência Óptica (do inglês *Optical Coherence Tomography*)

TTR – Teoria do Transporte Radiativo

nm – nanômetros

g – grama

μL – microlitro

mW – miliwatt

ms – milisegundo

J – Joule

mm – milímetro

cm – centímetro

ml – mililitro

LISTA DE SÍMBOLOS

pH – Potencial hidrogeniônico

® - Marca registrada

° - Grau

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
1.1	PROPRIEDADES ÓPTICAS DOS TECIDOS BIOLÓGICOS E ACOPLAMENTO DE LUZ	26
1.1.1	Reflexão e refração na interface.....	26
1.1.2	Espalhamento	30
1.1.3	Absorção	31
1.2	DOSIMETRIA PARA FOTODIAGNÓSTICO E FOTOTERAPIAS	34
1.2.1	Técnicas para dosimetria.....	36
1.2.2	Teorias de transporte de luz no tecido.....	39
1.2.3	Casamento de interfaces.....	41
2	OBJETIVOS:	47
2.1	PRINCIPAL:	47
2.2	ESPECÍFICOS:	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	GEL ACOPLADOR - PREPARAÇÃO DO GEL ESPALHADOR	48
3.2	FONTE DE LUZ.....	49
3.3	APARATO DE IMAGENS	49
3.4	EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	51
3.4.1	<i>Phantom</i>	51
3.4.2	Análise de dados <i>in vitro</i>	53
3.5	EXPERIMENTO EX VIVO	54
3.5.1	Avaliação do modelo <i>ex vivo</i> para iluminação superficial e intersticial	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	GEL ESPALHADOR.....	57
4.2	EXPERIMENTO IN VITRO	60
4.2.1	Lesão plana rugosa.....	60
4.2.2	Lesão verrugosa (íntegra e ulcerada)	71
4.3	UMA PROPOSTA DE TERAPIA FOTODINÂMICA POR ISOLAMENTO.....	77
4.4	EXPERIMENTO EX VIVO	80
4.4.1	iluminação superficial.....	80
4.4.2	iluminação intersticial.....	83
5	CONCLUSÕES.....	87

REFERÊNCIAS 89

1. INTRODUÇÃO

As fototerapias, de um modo geral, vem conquistando um espaço cada vez maior nas aplicações médicas e não médicas. Tanto a parte de tratamento quanto a parte de manutenção vem aplicando a luz que deve interagir de forma eficiente com o tecido. Pois todo objetivo da fototerapia é a interação da luz com células. Contudo, atualmente a realidade nos mostra que ainda existem alguns problemas nas terapias fotônicas. Por exemplo, se olhamos as lesões de pele, onde é possível aplicarmos um tratamento utilizando terapia fotodinâmica (PDT), podemos observar que as lesões tem relevo, irregularidades, crosta e cores diferentes, tudo isso dentro de uma mesma lesão; outro exemplo pode ser dado simplesmente observando a pele de diferentes indivíduos em uma mesma região do corpo, podemos verificar diferentes cores de pele, diferentes texturas, existências de rugas, etc.

Deste modo, a luz precisa de alguma maneira agir sobre esses objetos, que diferem de uma aplicação para outra e de um indivíduo para outro. Entretanto, é extremamente importante ter controle sobre a entrega da luz, e uma forma de alcançar este fim seria a utilização de um princípio a priori simples e bem conhecido, o acoplamento da luz. Melhorando o acoplamento da luz poderíamos contornar essas particularidades das superfícies;

Esse princípio já é muito utilizado em outras áreas, como na ultrassonografia, entretanto em fototerapias o uso de um material acoplador para melhorar a iluminação ainda não é conhecido.

Para entender e analisar a melhora na distribuição de luz através do acoplamento óptico, é necessário compreender alguns processos básicos pois, a luz interage de diferentes formas ao encontrar as superfícies dos tecidos. As fototerapias dependem principalmente dos processos de reflexão de luz, espalhamento e absorção bem como as eventuais formas radiativas e não-radiativas de emissão da luz absorvida, como a fluorescência e os efeitos vibracionais.

Além disso, o arranjo estrutural do tecido também interfere na interação luz/tecido, uma vez que a disposição das diferentes biomoléculas presentes na organização celular e tecidual cria interfaces e guias para a luz, contribuindo para determinar seu comportamento dentro do tecido investigado.

1.1 PROPRIEDADES ÓPTICAS DOS TECIDOS BIOLÓGICOS E ACOPLAMENTO DE LUZ

Para entender como a luz é afetada em sua interação com os tecidos biológicos, é preciso ter em mente a fenomenologia e as grandezas básicas que dizem respeito à interação luz-matéria.

Os tecidos biológicos podem ser classificados como meios túrbidos. Num meio túrbido, a luz é espalhada e absorvida, devido às heterogeneidades e características do meio. Os tecidos biológicos são, predominantemente, espalhadores, com algum caráter absorvedor, e estes dois mecanismos de atenuação estão presentes conjuntamente [1]. Deste modo, estudos relacionados ao espalhamento de luz em meios túrbidos são de grande interesse para fototerapias e fotodiagnóstico em geral.

Portanto, o melhor controle dos efeitos terapêuticos e da evolução dos métodos de diagnóstico dependem da compreensão dos processos fotofísicos mais importantes a afetarem a propagação da luz dentro do tecido biológico: a refração, o espalhamento e a absorção. Ao conhecê-los, poderemos adequar os parâmetros de iluminação e individualizar procedimentos de diagnóstico e terapêuticos para as condições particulares do tecido alvo.

1.1.1 Reflexão e refração na interface

Quando a luz se propaga em um material com um determinado índice de refração e encontra uma interface com um segundo material, com um índice de refração diferente, o caminho da luz é redirecionado [2]. Se a largura do feixe é pequena comparada com a interface, ou com a curvatura desta, ocorrerão refração e reflexão (Figuras 1 e 2).

A quantidade de luz refletida e transmitida através da interface depende dos índices de refração dos dois materiais, do ângulo de incidência e da polarização da onda incidente. A relação entre o ângulo de incidência e o ângulo de refração para um feixe transmitido é dado pela lei de Snell (1):

$$\sin \theta_2 = \frac{n_1}{n_2} \sin \theta_1 \quad (1)$$

Para a incidência normal em uma interface plana, a fração da energia incidente que é transmitida através da interface é dada por (2):

$$T = \frac{4n_1n_2}{(n_1+n_2)^2} \quad (2)$$

Figura 1: Luz incidente sobre uma interface plana sofre refração. O ângulo de refração θ_2 , é dado em termos do ângulo de incidência θ_1 , e os índices de refração n_1 e n_2 dos dois meios, sendo que o ângulo de reflexão é igual ao ângulo de incidência. [2]

No processo de reflexão em superfícies planas, ou seja, para reflexão especular, o ângulo de incidência é igual ao ângulo de reflexão (Figura 2, à esquerda). A fração da energia que é refletida é dada por (3):

$$R = 1 - T = \frac{(n_1 - n_2)^2}{(n_1 + n_2)^2} \quad (3)$$

Esta reflexão que ocorre na interface também é conhecida como reflexão de Fresnel. Na reflexão especular, toda luz refletida deixa a superfície na mesma direção. Quando a superfície é rugosa (como a superfície seca da pele), a luz deixa a superfície em várias direções (Figura 2, à direita).

Enquanto as equações anteriores são verdadeiras para as interações luz-tecido, a realidade é que a maioria das superfícies dos tecidos não são opticamente lisas e, portanto, o

ângulo de incidência varia através do tecido. Como resultado, a intensidade da luz refletida varia ao longo da interface, e as direções da luz refletida e refratada também variam [3].

Figura 2: Reflexão especular ocorre quando a luz é refletida por uma superfície opticamente lisa; reflexão em diversas direções ocorre quando a luz é refletida por uma superfície opticamente áspera.
Fonte: Adaptado de [59]

Essa dependência com o ângulo de incidência está na Figura 3, justifica a divergência do feixe para superfícies biológicas, pois uma superfície rugosa nada mais é que uma soma de superfícies onde o feixe encontrará diferentes ângulos de incidência

Figura 3: Reflexão especular de um raio de luz usando a equação de Fresnel para luz não polarizada incidindo através do ar em meios de índice de refração 1,5 e 1,33. [14]

Portanto, durante a prática de tratamentos fototerápicos, a rugosidade do tecido pode se apresentar na forma de fendas ou irregularidades físicas sobre o tecido alvo ou lesão, causando efeitos de sombras durante a iluminação [4]. Estas irregularidades também levam às interações de reflexão e refração de forma difusa nesse tipo de interface, as quais resultam em uma distribuição heterogênea de luz dentro do tecido (Figura 4).

Figura 4: Distribuição de luz não-uniforme dentro de um tecido com superfície irregular. [74]

Uma iluminação não-uniforme pode resultar em danos ao tecido saudável e, para casos de tratamento de câncer utilizando técnicas ópticas, em áreas de necrose parcial e consequente recidiva tumoral [5,6]. Em lesões, a profundidade atingida pelas células do tecido alterado determina a espessura da lesão. A profundidade atingida e a espessura da lesão são os parâmetros que definem a probabilidade de haver metástases, o grau de invasão de tecidos profundos e a infiltração em camadas mais internas do tecido [7].

Um dos fatores limitantes tanto nas fototerapias quanto no fotodiagnóstico é a penetração da luz no tecido, especificamente para casos de Terapia Fotodinâmica (PDT). O tratamento de lesões espessas, em PDT, pode não ocorrer de maneira eficiente, pois partes

mais profundas da lesão podem não receber a dose mínima de energia necessária para causar a morte celular [6]. Para melhor compreender e controlar a entrega de luz no tecido, é preciso também conhecer as formas de espalhamento e absorção que se dão na interação da luz com o mesmo.

1.1.2 Espalhamento

Nos tecidos biológicos, as interações de espalhamento são frequentemente os mecanismos dominantes que afetam a propagação da luz. Na prática, o espalhamento é classificado em três categorias, definidas pelo tamanho relativo dos objetos espalhadores de luz: o espalhamento Rayleigh, o espalhamento Mie e o espalhamento no limite geométrico.

Abaixo do limite Rayleigh — para qual o tamanho das partículas espalhadoras são pequenas comparadas ao comprimento de onda (λ) — ocorre espalhamento elástico provocado pelos pequenos centros espalhadores (de cuja ordem de raio médio é de até $\lambda/10$), onde os fótons são espalhados igualmente nas direções entre 0° e 180° sem sofrer alteração na energia dos fótons. Dentro do regime Mie, o tamanho dos espalhadores é comparável ao comprimento de onda, e o espalhamento elástico — provocado por espalhadores de tamanho intermediário — ocorre preferencialmente para frente. Finalmente, acima do limite geométrico, o tamanho dos espalhadores é muito maior que o comprimento de onda da luz incidente. Neste caso, tratamos a luz como raios que refratam e refletem sobre fronteiras e obstáculos.

Para descrever o espalhamento de forma simplificada, consideramos uma onda plana incidente (onda de amplitude uniforme em qualquer plano perpendicular à direção de propagação). Inicialmente, dados os índices de refração de dois materiais e o tamanho e forma dos espalhadores, a radiação espalhada pode ser calculada. O espalhamento é quantificado pela seção de choque de espalhamento. Para uma onda plana monocromática que tem uma dada intensidade I_0 (em W/cm^2) que encontra um objeto espalhador, uma fração da potência P_s é espacialmente redirecionada (espalhada).

A razão entre a potência espalhada pela intensidade da onda incidente é a seção de choque de espalhamento, σ_s (4):

$$\sigma_s(\hat{\mathbf{s}}) = \frac{P_s}{I_0} \quad (4),$$

onde $\hat{s}$ é a direção de propagação da onda plana em relação ao espalhador.

Se o meio tem uma distribuição uniforme de espalhadores idênticos, podemos caracterizá-lo pelo coeficiente de espalhamento μ_s (5), onde ρ é a densidade de espalhadores.

$$\mu_s = \rho \sigma_s \quad (5)$$

O coeficiente de espalhamento é essencialmente a área da seção de choque por unidade de volume do meio. O livre caminho médio, l_s , (6) representa a distância média que o fóton viaja entre consecutivos eventos de espalhamento:

$$l_s = \frac{1}{\mu_s} \quad (6)$$

Para meios não-absorvedores, com caráter somente espalhador, a atenuação da luz pode ser descrita por $I(z)$, onde z é a direção de propagação da luz (7).

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_s z} \quad (7)$$

1.1.3 Absorção

A absorção, por sua vez, é um processo que envolve a extração de energia da luz por espécies moleculares. Os processos de absorção são importantes em diagnóstico e aplicações terapêuticas. Para aplicações em fotodiagnóstico, são usadas as transições entre dois níveis de energia moleculares que tem comprimentos de onda específico bem definidos, e que servem como a "impressão digital" espectral da molécula. Para fototerapias, a absorção de energia é o mecanismo primário que permite que a luz de um laser possa produzir efeitos sobre tecidos que servirão para os tratamentos propostos.

Para um dado absorvedor, a seção de choque de absorção (8) pode ser definida da mesma maneira que para o espalhamento:

$$\sigma_a = \frac{P_a}{I_0} \quad (8)$$

Na equação 8, P_a é a fração da potência absorvida de uma onda plana uniforme incidente de intensidade I_0 .

Um meio com uma distribuição uniforme de absorvedores idênticos pode ser caracterizado pelo coeficiente de absorção μ_a (9), onde ρ é a densidade de absorvedores.

$$\mu_a = \rho \sigma_a \quad (9)$$

Reciprocamente,

$$l_a = \frac{1}{\mu_a} \quad (10)$$

é o livre caminho médio para absorção, e representa a distância média que o fóton viaja antes de ser absorvido.

Para um meio absorvedor, de coeficiente de absorção μ_a , o decaimento da intensidade da luz ao longo do eixo z obedece a lei de Beer- Lambert (11):

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_a z} \quad (11)$$

Contudo, no meio túrbido, os efeitos de espalhamento e de absorção contribuem conjuntamente para atenuação da luz incident. Logo, a atenuação em tecidos depende de ambos os coeficientes de absorção e de espalhamento (12), o que resulta num coeficiente de atenuação total (μ_t).

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

A Figura 5 mostra um resumo das interações que ocorrem com um feixe ao encontrar a superfície de um tecido (pontualmente), onde estão presentes os processos de atenuação por absorção e espalhamento.

Figura 5 Esquema de um feixe de luz incidindo sobre um tecido com ângulo com relação à normal de uma interface ar-tecido. Uma parte do feixe é refletido especularmente com ângulo e o restante é transmitido com ângulo. [14]

Para avaliar a absorção, a transmissão, T , é comumente usada por ser medida de maneira direta, já que é definida pela razão entre a intensidade transmitida I e intensidade incidente I_0 :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (13)$$

A atenuação, também chamada de absorbância (A) ou densidade óptica (OD), de um meio atenuador é dada por:

$$A = OD = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = -\log_{10}(T) \quad (14)$$

Alternativamente, um gráfico de A versus λ é também uma outra forma de apresentar as propriedades de absorção.

A absorbância é extremamente importante nas fototerapias e em fotodiagnóstico devido, principalmente, ao conceito denominado "janela terapêutica óptica" (Figura 6), que se baseia no fato de que a penetração da luz em um tecido depende do grau de absorção.

É conhecido que a água é o componente mais abundante dos tecidos do corpo humano, e absorve a luz nas regiões do infravermelho ($\lambda > 1200$ nm) e do ultravioleta ($\lambda < 200$ nm). Na região do visível, porém, a água é transparente.

Os principais absorvedores biológicos na região abaixo do vermelho indo até o ultravioleta são as proteínas, a hemoglobina e a melanina, sendo estes os responsáveis pela pequena penetração de comprimentos de onda menores.

Entretanto, para os comprimentos de onda da ordem de microns, a absorção da água é muito importante, deixando um intervalo onde há penetração aceitável da luz para que haja aproveitamento terapêutico ou em diagnóstico somente entre 600 e 1300 nm, onde os componentes constituintes dos tecidos biológicos são menos absorvedores e a luz apresenta melhor penetração. Logo, o intervalo entre 600-1300 nm, onde a absorção da água e das outras biomoléculas é baixa, é denominado "janela terapêutica óptica".

Figura 6: Espectro de absorção dos principais componentes dos tecidos e a chamada janela terapêutica óptica.
Fonte: Adaptado de [74]

1.2 DOSIMETRIA PARA FOTODIAGNÓSTICO E FOTOTERAPIAS

O conceito idealizado de dosimetria, assim denominado mais comumente na área de fototerapia, mas igualmente válido para a de fotodiagnóstico, engloba a capacidade de estabelecer os parâmetros necessários – bem como o controle, quando possível – para a aplicação de uma determinada técnica.

No que diz respeito à luz, a dosimetria fundamentalmente vinculada à distribuição da luz, uma vez que a quantidade de fótons que atingem um determinado ponto do tecido precisa ser suficiente, seja para atingir um limiar além do qual o tecido sofre uma modificação induzida por um protocolo terapêutico, seja para promover excitação de estados eletrônicos ou vibracionais para diagnóstico – como no caso do dano promovido pelas espécies reativas formadas pela Terapia Fotodinâmica no primeiro, ou a geração de um sinal de fluorescência ou Raman, no segundo.

Existe um grande número de aplicações que podem representar a importância do conhecimento adequado da distribuição de luz nas áreas de fotodiagnóstico e de fototerapia. Em fotodiagnóstico, o uso de fontes de luz de diferentes origens e com variados arranjos de entrega, tanto nas modalidades de espectroscopia quanto nas de geração e coleta de imagens, faz com que distribuições das mais variadas possam ser observadas nos tecidos. A isso, soma-se o fato de que cada forma de entrega e coleta de luz sofre os efeitos do acoplamento da luz, que se modifica para cada tipo e estrutura tecidual, mesmo a nível individual.

Em fototerapia, por sua vez, os protocolos de tratamento dependem da distribuição de luz, uma vez que há sítios específicos a serem alcançados por ela. No caso de fototerapia de baixa intensidade (*low intensity laser therapy*, LILT), pontos específicos de estruturas musculares, tendinosas e nervosas conhecidas como “pontos gatilho” precisam ser irradiados com intensidade suficiente para iniciar, acelerar ou modular processos inflamatórios e regenerativos [8].

Estas estruturas apresentam uma organização fibrosa, que provoca a formação de “guias” para a luz, já que as modificações abruptas nos índices de refração geram interfaces, modificando a difusão dos fótons [9].

Já em terapia fotodinâmica (PDT) e outros tratamentos que envolvem destruição ou alteração dos tecidos, como a ablação tecidual [10], além do efeito que as estruturas provocam na distribuição da luz, as próprias propriedades ópticas dos componentes teciduais se alteram devido ao tratamento. Isto pode ser provocado tanto pela entrega e/ou eliminação da medicação fotossensível (que, portanto, obviamente modifica o comportamento dos fótons nos tecidos em que se apresenta conforme a concentração) utilizada, quanto pelas alterações físico-químicas das biomoléculas presentes, que se refletem em suas propriedades ópticas, tais quais a absorção e o espalhamento [11].

O conhecimento destes parâmetros é de importância fundamental nas fototerapias, e quando as alterações são dinâmicas, é preciso levá-las em conta e se adequar a elas, de

forma que não modifiquem as condições adequadas de tratamento, definidas pelo protocolo estabelecido pela dosimetria.

Falhar em realizar estas adaptações pode levar ao comprometimento do tratamento, promovendo sub-doses de irradiação, ou comprometendo estruturas anatômicas que a princípio seriam poupadas pela configuração original.

Contudo, apesar da grande importância que a obtenção deste conhecimento representa para estas áreas de dosimetria em geral, o estabelecimento de uma dosimetria de luz adequada ainda representa um desafio, a despeito do grande número de tentativas documentadas na literatura.

Em geral, protocolos clínicos para fototerapias e fotodiagnóstico são definidos com base em experiência empírica. A definição de parâmetros diversos, como para determinar as melhores sensibilidade e especificidade das técnicas de fotodiagnóstico, o uso de luz para biomodulação tecidual - seja no controle da dor, no estímulo regenerativo ou como agente anti-inflamatório - ou ainda para ativação de fotossensibilizadores, dependem do sucesso de um grande número de testes clínicos para serem estabelecidos.

Em sua grande maioria, estes testes de dosimetria estão baseados apenas em uma iluminação superficial dos tecidos estudados, dificultada em geral devido à limitação de penetração existente para a luz visível e ultravioleta (e mesmo a região mais próxima do infravermelho), mas utilizada sempre que possível dada a importância do uso de métodos não-invasivos.

Quando utilizam-se fontes inseridas no tecido a ser tratado, como no caso do uso de fibras difusoras [12], pode-se atingir maiores profundidades, mas além deste ser um procedimento mais invasivo e, portanto, nem sempre possível, também modifica a estrutura do tecido e por vezes provoca sangramentos — o sangue absorve intensamente a maior parte da luz na região do visível, criando obstáculos à difusão da luz, e criando "sombras" nas regiões mais profundas, que impedem-nas de serem iluminadas.

Além disso, as interfaces na superfície dos tecidos são comumente heterogêneas, especialmente em patologias estabelecidas. Esta heterogeneidade interfere de maneira importante no acoplamento da luz, pois a interface irregular de uma lesão, por exemplo, modifica a forma como um feixe de luz penetra no tecido.

1.2.1 Técnicas para dosimetria

Os estudos de dosimetria tanto para diagnóstico quanto para tratamento, por simplicidade, consideram em geral tecidos com propriedades ópticas uniformes e/ou isotrópicas [13].

Simplificações desse tipo visam viabilizar a modelagem, e são importantes pois facilitam o controle de parâmetros como as propriedades ópticas e suas modificações sem envolver uma grande quantidade de tempo de processamento [14].

Entretanto, mesmo quando modelos elaborados são utilizados, estas considerações raramente são capazes de gerar efeitos que possam simular de maneira satisfatória estas condições.

Técnicas como a microscopia confocal [15,16] a tomografia de coerência óptica (OCT, do inglês optical coherence tomography) [17,18], a tomografia fotoacústica [19,20], as técnicas de espalhamento elástico (ou refletância difusa) [21,22] e a espectroscopia de fluorescência [23 – 33] têm contribuído na tentativa de descrever de maneira mais apropriada as lesões, tanto para diagnóstico quanto para tratamento [34].

A microscopia confocal torna possível analisar amostras espessas de tecido biológico de forma tridimensional por varredura junto de um sistema óptico confocal. A ideia básica da técnica consiste numa fonte pontual de luz usada para investigar um ponto único de uma amostra. A radiação que vem da luz refletida ou da fluorescência deste ponto único é então detectada por um detector pontual do tipo *pinhole*.

A vantagem principal da técnica é a alta definição que permite, tanto em termos de resolução lateral quanto em profundidade, por utilizar iluminação e detecção pontuais. Esta alta resolução na profundidade é o que permite as varreduras em 3D, combinando varreduras de alta resolução em 2D.

Contudo, esta técnica sofre com dificuldades relacionadas à aberrações de absorção em lentes e movimentação de amostras (em especial *in vivo*). Associada à fluorescência, há ainda a questão de que a resolução pode ser reduzida devido à localização na qual a fluorescência é gerada ou coletada, por conta do espalhamento.

A técnica de OCT, por sua vez, torna possível realizar imagens de microestruturas internas de materiais e sistemas biológicos de alta resolução (aproximadamente entre 1 e 15 μm), utilizando luz retroespalhada ou refletida. OCT é algumas ordens de grandeza melhor resolvida que a ultrassonografia, e permite o uso *in situ*, com preservação da amostra e em tempo real, além de ser viável a baixo custo.

A técnica se baseia em detecção interferométrica associada a métodos de correlação, de modo semelhante à ultrassonografia; ela usa a reflexão ou o retroespalhamento da luz nas

diferentes camadas teciduais para determinar posições e estruturas, medindo a diferença de tempo entre os “pulsos” das ondas eletromagnéticas, como num radar.

Contudo, como a luz é cerca de um milhão de vezes mais rápida que o som, é preciso resolução ultrarrápida para detectar a diferença entre dois sinais de luz em curtas distâncias. Como a eletrônica direta não permite isso, técnicas de correlação que comparam a luz coletada com a referência, atravessando um caminho conhecido, são utilizadas.

A técnica apresenta boa resolução e sensibilidade, não exige nenhum contato com a amostra, e permite o uso de fibra óptica na aplicação, mas é limitada a profundidades de 2-3 mm com boa resolução da imagem, além de exigir alta sensibilidade de detecção para meios altamente espalhadores, como são a maioria dos tecidos biológicos; assim, o uso como biópsia óptica oftálmica acaba sendo o principal uso efetivo da técnica.

A tomografia fotoacústica é a reconstrução de imagens com base em detecção com resolução temporal de perfis de pressão acústica dos tecidos gerada pela absorção de pulsos ópticos. Os pulsos de luz são entregues mais rapidamente ao tecido do que a resposta acústica é capaz de viajar, considerando a resolução espacial desejada – 10 μm para um tecido onde a onda acústica viaje a 1 mm/ μs exige pulsos de duração menor que 0,01 μs .

É possível realizar investigação não-invasiva de tecidos com a fotoacústica, com resolução suficiente para detectar alterações de composição ou estrutura de materiais e tecidos, mas que depende da fonte da luz pulsada, da velocidade de resposta dos detectores, e da largura da banda de detecção de frequência dos transdutores. Somada a tais limitações quanto à resolução espacial de profundidade, ainda é preciso considerar a necessidade de uma geometria adequada de *arrays* de detectores de modo a definir a resolução.

Enfim, técnicas de refletância difusa ou de espalhamento elástico utilizam a propagação da luz através de um material ou tecido de forma a obter informações por meio do estudo das propriedades ópticas e suas transformações. Em geral, elas se associam a modelos computacionais de propagação de fótons, como as bem conhecidas simulações de Monte Carlo [35-37], ou a outras técnicas como a espectroscopia de fluorescência [38], para monitoração de propriedades ópticas de materiais e tecidos biológicos usando a Teoria de Aproximação da Difusão [39-41].

A refletância difusa é limitada pela dificuldade no domínio dos fenômenos que regem as interações de espalhamento para diferentes tamanhos e estruturas de partículas quando em meios heterogêneos. Em meios biológicos, este fator é especialmente válido, pois muitas partículas de tamanhos e propriedades diferentes estão distribuídos de forma única, dificultando a obtenção de conhecimento claro sobre quanto cada um dos diferentes

tipos de espalhamento (Raileigh, Mie etc) contribui com os fenômenos observados em um dado material.

Com relação às técnicas mencionadas, aquelas que tratam das teorias de transporte de luz são as que tem sido mais utilizadas nos modelos de simulação computacional, dado que em geral refletem mais apropriadamente os fenômenos físicos associados à propagação da luz em meios túrbidos, e discutiremos brevemente as principais delas a seguir.

1.2.2 Teorias de transporte de luz no tecido

A descrição da propagação da luz em tecidos pode ser feita através da imagem clássica que é usada para definir a dinâmica de transporte da luz matematicamente e o conceito de fóton, que também pode ser introduzido de uma forma particular, quando necessário (por exemplo, a consideração para os processos de transição moleculares, tais como absorção, luminescência e Raman).

Uma vez que os múltiplos espalhamentos são aspectos importantes da propagação da luz nos tecidos, a aplicação direta da teoria eletromagnética para o problema de óptica dos tecidos é complicada. Em lugar da abordagem direta de teoria eletromagnética, um modelo conhecido como teoria de transporte da luz é muito utilizado, o qual ignora os fenômenos de ondas, tais como a polarização e a interferência, e em vez disso trata apenas do transporte da luz no meio. A teoria do transporte radiativo (TTR) é a mais utilizada em óptica dos tecidos, em detrimento de abordagens analíticas usando as equações de Maxwell, também devido às heterogeneidades existentes nos tecidos biológicos.

O modelo da teoria de transporte, no entanto, implicitamente incorpora elementos das descrições clássicas e quânticas da luz. A TTR não é específica para a luz, e tem outras aplicações importantes em outras áreas como transporte de nêutrons e termodinâmica.

A TTR é a base para obtenção de parâmetros ópticos importantes em estudos de propagação da luz em tecidos. É necessária a conversão de medidas de valores observáveis (por exemplo, a reflexão) para parâmetros de propagação usando a TTR.

Os parâmetros associados à propagação de luz, para todos os modelos, são baseados na equação de transporte radiativo. Formulações da equação de transporte radiativo assumem que cada partícula espalhada é suficientemente distante dos seus vizinhos para prevenir interações entre efeitos de sucessivos espalhamentos, e não considera efeitos de polarização e fluorescência. Até recentemente, era considerado somente o transporte da luz no estado estacionário. Os cálculos da distribuição da luz baseados na equação de transporte

radiativo requerem o conhecimento dos coeficientes de absorção e espalhamento, bem como da função de fase.

As soluções são apresentadas para mostrar como as propriedades ópticas podem ser determinadas pelo uso de diferentes medidas. Para chegar a esses parâmetros, é preciso primeiro se ter a solução da equação de transporte.

Devido à dificuldade em resolver a equação de transporte de forma exata, várias aproximações têm sido feitas sobre a representação da radiância ou da função de fase. Formas destas soluções aproximadas para o cálculo da distribuição da luz dentro dos tecidos são dependentes do tipo de radiação (difusa ou colimada) e do casamento ou não de índices de refração das interfaces.

Felizmente, existem duas soluções simples da equação de transporte, que fornecem expressões para o espalhamento não-transmissivo, e para a razão de fluência assintótica profunda em um tecido volumoso, longe da fonte e das bordas. A luz não espalhada é atenuada exponencialmente seguindo a lei de Beer. Para luz passando por um pedaço de tecido e sem reflexões na superfície, a transmissão é dada pela transmissão primária ou colimada.

Uma aproximação para resolver a equação de transporte é usar a teoria de difusão. Nesta teoria, consideramos a radiância espalhada e não-espalhada, onde a parte não-espalhada satisfaz a lei de Beer, e a espalhada pode ser expressa exatamente com uma soma infinita de polinômios de Legendre. Contudo, a aproximação de difusão trunca esta soma nos dois primeiros termos (um isotrópico e um termo que direciona a propagação em linha reta, ligeiramente para frente) [42].

Algumas limitações da equação de difusão são dadas pela razão entre o espalhamento e a absorção, a anisotropia do espalhamento e as distâncias da fonte e da interface. A aproximação de difusão é uma boa aproximação para a profundidade de penetração da luz. Porém, próximo à fonte e às interfaces a estimativa para o padrão de difusão da taxa de fluência não funciona bem [14].

Uma alternativa é o uso da aproximação de Kubelka-Munk, onde é considerado que a distribuição de luz é isotrópica logo abaixo da superfície. Contudo, como a luz sofre vários eventos de espalhamento antes que seu perfil de propagação torne-se isotrópico, esta aproximação não é boa próximo da superfície [14].

Os perfis de espalhamento e absorção pode ser bem determinados através de simulações numéricas, como o método de Monte Carlo. Esta técnica consiste de um método estatístico, no qual são traçadas as trajetórias individuais dos fótons. Contudo, para que o

resultado seja preciso, é necessário um longo tempo de processamento dos cálculos computacionais, de forma que podem ser necessários dias de espera para obter o resultado — o que torna impossíveis aplicações de forma concomitante e interativa com procedimentos terapêuticos. Em termos de simulações, portanto, são obtidos ótimos resultados, mas que exigem alto potencial computacional, e demandam grandes períodos de tempo para processamento das rotinas de cálculo. Por conta destas particularidades apresentadas por cada método, a necessidade de conhecimento prévio sobre quais fenômenos e propriedades das partículas se fazem presentes no tecido a ser tratado é também um problema importante a considerar.

Quando se considera a importância do monitoramento em tempo real, estas características são determinantes, uma vez que o conhecimento anterior sobre as componentes teciduais nem sempre é possível; que o tempo requerido para obtenção do resultado pode ser longo, e que esta modalidade de investigação impossibilita o monitoramento contínuo de modificações teciduais.

1.2.3 Casamento de interfaces

Com base na discussão anterior, fica evidente que o estudo da distribuição e propagação da luz em tecidos biológicos é importante para diversas aplicações em fototerapias e diagnóstico, e que existem várias teorias que tentam prever o comportamento da luz dentro destes que são considerados meios túrbidos. Contudo, os modelos vigentes para lidar com estas dificuldades apresentam particularidades que fazem com que não sejam tão eficazes nas proximidades da fonte de luz e das interfaces. A passagem da luz através de uma interface entre dois meios é um problema importante a ser considerado para os estudos de propagação em meios túrbidos.

Levando em conta a importância de se melhorar os protocolos clínicos de diagnóstico e tratamento, o fato de que é preciso lidar de forma efetiva com as diferentes modificações que os tecidos sofrem tanto por conta das patologias quanto por seus tratamentos, e que as tentativas já reportadas não são eficientes para evitar as dificuldades existentes na distribuição de luz, é que este estudo entra em contexto.

O presente trabalho está direcionado, portanto, ao problema da uniformização da dose de luz dentro do tecido. É crucial garantir que a entrega da luz em uma lesão volumosa ocorra de forma adequada sobre toda a lesão, para melhorar a distribuição da luz dentro do volume tecidual e homogeneizar o resultado do tratamento ou diagnóstico [5], dado que a intensidade e, portanto, a energia adequada é que é responsável por provocar os efeitos

esperados para estas técnicas, e que manter controle sobre uma entrega homogênea torna mais factível o controle sobre o resultado destas técnicas, em especial para técnicas terapêuticas.

Portanto, o acoplamento entre os índices de refração destes dois meios é importante para uma melhor previsão do comportamento da luz nos respectivos meios. Ao utilizar uma fonte para uma aplicação de fototerapias e fotodiagnóstico, é interessante que esta esteja inserida em um meio cujo índice de refração ajude a melhorar o acoplamento da luz. O melhoramento do acoplamento luz-tecido foi a maneira de alcançar esse objetivo no intuito de diminuir os efeitos de reflexão e refração difusas causados pelas irregularidades da superfície, durante os tratamentos fototerápicos [43].

O emprego de um material, como um gel acoplador, entre a fonte de luz e o tecido, deverá promover uma melhora na distribuição da luz dentro do tecido tratado. A presença do gel permite um melhor acoplamento da luz emitida pela fonte ao tecido, devido à diminuição da diferença entre os índices de refração dos dois meios [44]. Além disso, poderá levar a melhores soluções dos modelos de distribuição de luz em meios biológicos em estudos futuros.

Outro benefício que pode ser obtido pelo uso de um gel acoplador é o de que parte da luz retroespalhada na interface pode ficar confinada no gel e voltar a se propagar na direção do segundo meio de modo a ser absorvida por ele, assim diminuindo as perdas por reflexões e também a influência da interface entre os meios [45]. As imperfeições presentes na interface (e, de fato, a própria interface em si), também terão consequentemente, menor influência, devido ao melhor acoplamento entre os índices de refração [46]; desta forma, os efeitos das irregularidades da superfície do tecido, como a formação de regiões de "sombra", onde há menor entrega de luz, deverão ser minimizados.

Entre as possibilidades de escolha do gel, os hidrogéis parecem uma escolha adequada de materiais acopladores, em particular o hidrogel carbopol (Figura 7), que possui muitas características favoráveis para aplicações de uso tópico.

Nesse contexto, os hidrogéis de carbopol [47] apresentam-se como possibilidade de aplicação com importantes vantagens sobre outros géis. Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros que podem intumescer em meio aquoso ou fluido biológico e reter uma grande quantidade de água na sua estrutura sem se dissolver. Esta capacidade de absorver água, sob condições biológicas, torna estes géis materiais ideais para o uso na entrega de drogas e imobilização de proteínas, peptídeos e outros compostos biológicos.

Por causa da presença de certos grupos funcionais ao longo das cadeias do polímero, os hidrogéis são freqüentemente sensíveis às condições do ambiente como temperatura, pH, força iônica do meio e composição do solvente. Assim, além da capacidade de intumescer na presença de água, estes géis podem, na sua ausência, tender a um encolhimento, com esta variação de volume induzida pelo meio [48].

Devido ao seu alto teor de água, esses géis assemelham-se a tecido natural vivo mais do que qualquer outro tipo de biomaterial sintético [49]. Estas redes têm uma estrutura tridimensional, reticulada, unida fisicamente (formando embaraços, cristais), ou quimicamente (formando nós, cruzamentos). Esta estrutura reticulada insolúvel permite a imobilização de agentes ativos, biomoléculas, bem como a liberação destes de um modo específico e bem definido.

Polímeros como carbopol apresentam grande absorção de água. Quando em meio aquoso e expostos a um ambiente de pH entre 4,0 e 6,0, eles incham até 1000 vezes o seu volume original, e 10 vezes o seu diâmetro original, para formar um gel. Eles também são usados permanentemente para suspender os ingredientes ativos em reservatórios transdérmicos, bem como em géis tópicos e cremes.

Figura 7 - Estrutura geral do Polímero carbopol [76]

O uso tópico do gel carbopol no tratamento de lesões de pele pode ser uma ferramenta eficaz em procedimentos de PDT. Os carbômeros são muito bem aceitos para formulações aquosas de dosagens de uso tópico [47]. Muito dos produtos comercialmente disponíveis tem sido formulados com esses polímeros, pois eles fornecem inúmeros benefícios às formulações tópicas como:

- Segurança e eficácia — Polímeros de carbopol tem uma longa historia de segurança e eficácia no uso tópico de géis, cremes, loções e pomadas. Isto é apoiado por extensivos estudos toxicológicos.

- Não-sensibilizante — O carbopol tem mostrado ter efeitos de irritação e sensibilização extremamente baixos após uso repetido.
- Ausência de efeitos sobre a atividade biológica das drogas — o carbopol é um excelente veículo para entrega de drogas. Devido ao seu alto peso molecular, ele não pode penetrar na pele ou afetar a atividade da droga.
- Excelentes propriedades espessantes, de suspensão, e emulsificação para formulações tópicas.
- Produtos com uma vasta gama de viscosidades e propriedades de fluxo têm sido formulados e comercializados com sucesso.

Dentre os tipos de carbopol, destaca-se o Carbopol 940. Este carbopol é um polímero, que se apresenta em seu estado básico na forma de um granulado semitransparente. Devido à sua solubilidade e à não-reatividade com os demais componentes da fórmula, ele é muito usado na indústria cosmética e farmacêutica como espessante e formador de diferentes tipos de gel para cabelo, gel pós-barba, "Doutorzinho" (solução canforada, comumente utilizada para tratar dores e pequenas inflamações por via tópica), álcool em gel anti-séptico, loções corporais veiculadas em gel e outros.

Este carbopol também é utilizado para suspender ingredientes insolúveis, como estabilizantes e agentes de consistência em emulsões. O Carbopol 940 é um agente gelificante, utilizado na preparação de géis transparentes, produzindo géis cristalinos, brilhantes aquosos ou hidroalcoólicos. É o de maior efeito espessante dentre as resinas de carbopol, e pode ser empregado apenas em preparações tópicas.

Contudo, sendo os hidrogéis transparentes no visível, toda luz que seja retroespalhada ou refletida na interface de um gel com um tecido tenderá a escapar do meio, com uma importante perda de intensidade. Por isso, é possível adicionar elementos espalhadores a estes géis para tentar aproveitar ao máximo os fótons desviados, buscando usar as propriedades de espalhamento para redirecioná-los ao tecido.

As emulsões lipídicas constituem bons agentes espalhadores, não-tóxicos, que podem ser agregados ao gel acoplador para melhor entrega da luz. O emprego de soluções lipídicas como agentes espalhadores já é conhecido [50]. Pesquisas de propagação da luz em meios túrbidos usam frequentemente emulsões como o Lipofundin®.

Essas emulsões lipídicas são similares a leite, consistindo de gotículas de lipídios suspensos em água, e são originalmente designadas para nutrição parental de pacientes. Elas

oferecem baixa absorção no visível e tem coeficiente de espalhamento facilmente ajustável; são baratas e acessíveis em ambientes clínicos, passíveis de esterilização, homogêneas, e disponíveis em grandes quantidades.

Devido sua relevância, elas têm sido tópico de muitos estudos [51]. Além disso, têm ocorrido estudos comparativos de diferentes emulsões lipídicas com diferentes concentrações de gordura [52]. Portanto, apresentam possibilidade de uso prático e seguro em associação com os géis de carbopol mencionados.

1.2.4 Aperfeiçoamento da entrega de luz nas técnicas ópticas

Para avaliar a possibilidade de se gerar um perfil de distribuição de luz mais efetivo através da melhoria do acoplamento de luz, por fim, este estudo pretendeu fazer uma abordagem experimental em modelos do tipo *phantom* óptico, utilizando um gel de carbopol para melhorar o acoplamento luz-tecido, uma vez que é possível obter, através deles, uma propagação de luz mais homogênea por meio de um acoplamento de índices de refração mais suave. A proposta difere do acoplamento da luz por ação de agentes osmóticos já apresentada na literatura [53], pois aqui o meio de acoplamento escolhido foi um hidrogel inerte, que não interage ou promove mudanças no tecido, preservando sua estrutura original.

Para a realização de estudos das propriedades ópticas *in vitro* de tecidos biológicos é comum a utilização de *phantoms*, que são meios que mimetizam características, especialmente de espalhamento e absorção desses tecidos. Eles são importantes para ajudar a melhorar a compreensão das interações da luz com os tecidos, auxiliando na evolução dos procedimentos direcionados para as fototerapias e fotodiagnóstico. Os *phantoms* podem auxiliar na calibração e testes de desempenho de instrumentos, além de simulações matemáticas [54].

Não existe um *phantom* ideal que seja capaz de simular todas as propriedades e características de um tecido biológico. É considerado um *phantom* ideal aquele que possui propriedades ópticas similares às do tecido biológico em um determinado comprimento de onda, tal que suas propriedades ópticas possam ser ajustáveis para simular diferentes tecidos, e que permita incorporar moléculas para que suas propriedades ópticas sejam variadas. As propriedades térmicas, químicas e a superfície do *phantom* devem ser similares às do tecido a ser simulado, e estáveis com o tempo e condições ambientes.

Um *phantom* com todas essas características poderia ser usado para qualquer aplicação, porém não há um phantom que possua todas essas propriedades. Nas aplicações reais, apenas algumas aplicações são importantes e as outras são desprezadas.

Há diversos tipos de *phantoms*. Eles basicamente consistem de uma matriz (água, hidrogel, polímeros), espalhadores e absorvedores. Os espalhadores mais usados são as emulsões lipídicas (Intralipid, leite), pós inorgânicos (alumina, ouro, dióxido de titânio) e microesferas de polímeros (poliestireno). Os absorvedores podem variar de sangue e células até corantes moleculares e tintas.

Fazer uso desta abordagem deve permitir lidar ao menos parcialmente com os desafios existentes para as técnicas ópticas na área da saúde, e contornar as dificuldades encontradas no uso das modalidades apresentadas na literatura. Um casamento adequado dos índices de refração do tecido e do meio em que se insere a fonte deverá reduzir o efeito prejudicial que as interfaces provocam na propagação da luz, permitindo que a entrega de luz possa resultar numa penetração mais eficiente e homogênea desta no tecido; isto permitirá maior controle da dose de luz necessária em todos os pontos, minimizando as chances de que pontos de interesse escapem ao diagnóstico ou ao tratamento.

2 OBJETIVOS:

2.1 PRINCIPAL:

Este estudo tem por objetivo melhorar o acoplamento da luz a tecidos biológicos e meios túrbidos semelhantes em geral, por intermédio da utilização de um material acoplador, para aplicações em fototerapias e fotodiagnósticos, cuja avaliação será feita com o auxílio de técnicas de imagem e de *phantoms* de tecido.

2.2 ESPECÍFICOS:

O primeiro objetivo específico é estudar modificações no perfil da distribuição da luz em experimentos *in vitro*, avaliando o acoplamento da luz ao utilizar iluminação superficial em modelos de *phantoms* que mimetizam lesões de diferentes geometrias. As formas estudadas *in vitro* serão:

- A) simulação de lesões planas de superfície rugosa;
- B) simulação de lesões de superfície verrugosa com parte superior íntegra;
- C) simulação de lesões de superfície verrugosa com parte superior ulcerada;

- O segundo objetivo específico é estudar modificações no perfil da distribuição da luz em experimentos *ex vivo* com iluminação superficial e intersticial, por meio de fibra difusora em tecido epitelial suíno. Será analisado o comportamento óptico do gel acoplador subcutaneamente para avaliar a possibilidade de tratamento de lesões pigmentadas, como melanomas através do uso de gel para isolar a lesão do tecido sadio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo relata como foram realizadas as duas modalidades de experimentos desta tese: os experimentos *in vitro* com iluminação externa superficial, e os experimentos *ex vivo* com iluminação intersticial. Ambos utilizaram o mesmo material acoplador, sistema de aquisição de imagens e mesma fonte acoplada a diferentes fibras. Portanto, foram descritas primeiramente estas informações, comuns a ambas as modalidades de experimentação, para posteriormente detalhar cada experimento.

3.1 GEL ACOPLADOR - PREPARAÇÃO DO GEL ESPALHADOR

Neste trabalho, usamos o gel de carbopol comercial, manipulado e fornecido pela Farmácia Amazon (São Carlos, SP, Brasil). A preparação do gel envolve o uso do emulsionante Carbopol 940, o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), que atuará como sequestrante, e água deionizada como veículo, devendo a mistura ser agitada até a dispersão total do carbopol.

Na sequência, é acrescentado o fenoxietanol para fins de conservação do gel, seguido da adição do neutralizante (gotejado até o ajuste do pH — estando a faixa de pH para a máxima viscosidade entre 6 e 11) e, finalmente, a glicerina, com a função de emoliente. O controle de pH otimiza a estabilidade dos gel; a estabilidade de géis de carbopol variam de acordo como tipo de carbopol. Esta base é interessante pois não inclui parabenos em sua composição, que são conservantes que podem ocasionar reações alérgicas.

Para avaliar se um gel espalhador poderia ter melhor desempenho do que o gel transparente para melhorar o acoplamento da luz, uma emulsão lipídica (Lipofundin®) foi incorporada ao gel de carbopol.

Diferentes concentrações de emulsão/gel foram avaliadas para determinar a existência de uma concentração ótima. Foram testadas 13 concentrações de emulsão lipídica no intervalo de 0 a 1,2 µl/g, variando-se de 0,1 µl/g.

As amostras de gel utilizadas foram centrifugadas com o objetivo de remover as bolhas existentes, as quais poderiam funcionar como agentes espalhadores indesejados. Uma seringa foi usada para que o gel fosse manipulado (injetado) cuidadosamente durante os experimentos.

3.2 FONTE DE LUZ

Como fonte de luz, utilizou-se um laser de diodo centrado em 630 nm (CW Eagle Heron, QuantumTech®, Brasil) com 8 mW de potência. Este laser permite o uso com fibra óptica via conector SMA.

A fibra utilizada nos experimento *in vitro* era do tipo multi-modos, com abertura numérica 0,2 (FT030, Thorlabs, Estados Unidos). A ponta distal da fibra foi posicionada a cerca de 2,5 cm acima da superfície do *phantom*, de modo que toda a área do fundo da cavidade seria iluminada.

No experimento *ex vivo* foi utilizada uma fibra cilíndrica de difusão isotrópica, com 20 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro. A fibra foi posicionada dentro da hipoderme de uma peça de pele suína. Foram utilizados 8 mW de potência óptica durante o experimento. Para os experimentos *ex vivo* com iluminação superficial, a fibra utilizada, foi a mesma dos experimentos *in vitro*, mantida a 2,5 cm da superfície da pele.

3.3 APARATO DE IMAGENS

O aparato experimental utilizado é mostrado no esquema da Figura 8. Para o experimento *in vitro*, injetamos o gel em uma cavidade desenhada no *phantom* sólido, para evitar variações de volume e forma. O phantom foi mantido dentro de uma caixa de vidro, e a fibra inserida dentro do gel de carbopol para cada formulação, com e sem emulsão lipídica.

A propagação da luz no phantom foi avaliada através de imagens [55]. Uma câmera de 1.3 megapixels (USB, Avantoscope Max, Avantgarde, China) foi posicionada perpendicularmente à direção de incidência da luz, e as imagens do perfil de distribuição da luz foram capturadas. O tempo de exposição foi fixado em 2 ms, para evitar efeitos de saturação. As imagens foram processadas usando rotina própria elaborada no ambiente matemático Matlab 7.8®.

Figura 8: Experimental setup para aquisição de imagens. A fibra foi introduzida na cavidade preenchida pelo gel de carbopol e iluminou o sistema, enquanto a câmera CCD registrava as imagens de luz se propagando no meio.

Para o experimento *ex vivo*, utilizamos um pedaço de pele suína colocado sobre uma base e posicionado em frente ao aparato de aquisição de imagens, de modo similar ao experimento *in vitro*.

O meio acoplador, gel de carbopol utilizado era transparente, e muito pouco turbido. Para a melhora da distribuição da luz, parâmetros como área de espalhamento dentro do *phantom* foram considerados.

A avaliação da distribuição foi feita com base em curvas de isodose obtidas a partir das imagens de distribuição de luz. Para a determinação das curvas de isodose, as imagens originais foram editadas, e foram consideradas a partir da interface com o *phantom*. Na sequência, foram transformadas para escala de cinza, e então foram extraídas as matrizes de intensidades, a partir das quais obtivemos as curvas de isointensidades.

Para fins de validação do método, a mesma análise foi realizada utilizando a ferramenta “*plot contour*” do Origin 8.0 (Origin Pro®, Canadá) e a equivalência foi verificada, como se pode ver na Figura 9.

Figura 9: Comparação curvas de isointensidades de Origin e MatLab, respectivamente.

3.4 EXPERIMENTO *IN VITRO*

Para avaliar os resultados obtidos em todos os experimentos *in vitro*, os índices de refração do ágar puro – que serviu como base para a fabricação do *phantom*, do gel de carbopol, e do gel com espalhador – foram mensurados para 656 nm no refratômetro de *Pulfrich* de prisma (Carl Zeiss®) e comparados para entender a melhora do acoplamento de luz.

3.4.1 *Phantom*

Foi proposta uma combinação simples de emulsão lipídica e tinta nanquim, com a adição de ágar, que torna esse meio sólido. Esse tipo de *phantom* foi utilizado em estudos de mamografia [56]. Outros estudos similares foram feitos utilizando gelatina alimentícia [57]. Contudo o uso do ágar propicia ao *phantom* maior dureza e estabilidade à temperatura ambiente.

Esses produtos são bem caracterizados, uma vez que eles estão em uso padrão em rotinas biológicas [58,59].

Para simular as propriedades ópticas dos tecidos biológicos, foi criado um *phantom* feito a partir de 2 g de ágar, 100 ml de água, 20 µl de emulsão lipídica (Lipofundin®, B. Braun- Alemanha) e 40 µl de tinta Nankin [58,60].

O Agar foi aquecido em autoclave a 120 °C, depois resfriado até 60 °C, quando foram acrescentados os espalhadores (emulsão lipídica) e absorvedores (tinta Nanquin). Os ingredientes foram misturados e vertidos em um recipiente de vidro de dimensões 20 cm x 20 cm x 20 cm onde uma cavidade com dimensões 3,0x1,5x1,5cm (Figura 10) foi moldada em uma das faces do *phantom*.

Figura 10: Detalhes da cavidade moldada no phantom

Com o intuito de simular diferentes tipos de lesões que podem ocorrer nos tecidos biológicos, foram utilizados moldes para simular lesões endofíticas e lesões exofíticas.

Os moldes foram inseridos no ágar antes que este se tornasse sólido, e após o tempo para gelificação, os moldes eram removidos.

A Figura 11 mostra um esquema das "lesões" criadas no phantom.

Figura 11: esquema das diferentes formas de lesões estudadas, onde cada retângulo representa uma vista frontal da cavidade produzida no phantom e preenchida pelo gel. A) lesão plana de superfície rugosa; B) lesões de superfície verrucosa com parte superior íntegra; C) lesões de superfície verrucosa com parte superior ulcerada

O perfil de propagação da luz no *phantom* foi avaliado para três diferentes condições de interface luz-phantom:

- sem gel, interface ar-phantom (SG);
- com gel transparente, interface gel-phantom (G); e,
- com gel espalhador, interface gel espalhador-interface (GE).

Conforme apresentado na Figura 6, durante a iluminação das condições G e GE, a ponta distal da fibra óptica encontrava-se no interior do gel.

3.4.2 Análise de dados *in vitro*

SIMULAÇÃO DE "LESÃO PLANA RUGOSA"

Avaliação do R^2

Comparamos as curvas de isointensidades de forma qualitativa, e avaliamos o parâmetro R^2 que é o termo de ajuste da curva real e experimental [60]. Foram avaliadas as curvas de variação de intensidade de luz ao longo de linhas perpendiculares à direção de propagação, para profundidades entre 0,5-2,5 mm com relação a superfície irradiada do *phantom*, em intervalos de 0,5 mm. Estas curvas foram ajustadas a modelos de curvas gaussianas, e o melhor ajuste foi obtido pelo melhor resultado do parâmetro R^2 , onde quanto mais próximo de "1", melhor o ajuste da curva. A avaliação do R^2 permitirá verificar quais condições permitem melhor acoplamento da luz, pela comparação com o feixe gaussiano.

Avaliação da cintura do feixe (W)

Avaliamos a cintura do feixe através do parâmetro de largura na meia altura do feixe gaussiano (W), de modo a avaliar o grau de distorção do feixe original devido ao gel acoplador dentro do *phantom*.

Avaliação da variação da intensidade em profundidade

Com relação à profundidade, também foram avaliadas curvas de intensidade em profundidade, perpendicularmente à irradiação, ao longo do eixo central da fibra. Essas curvas foram normalizadas com relação ao maior valor de intensidades observado para o conjunto das três configurações estudadas: SG, G, GE. Finalmente, os decaimentos das intensidades para cada condição foram comparados.

Comparação superfície de isodose real versus ideal

Foi adotado o valor arbitrário de isodose 40 J/cm^2 [61] e determinada a posição em que este valor de dose seria atingido dentro do *phantom* para um perfil ideal de iluminação (curva ideal). Para as mesmas posições, foram tomados os valores reais de dose, e os valores ideais e reais foram confrontados graficamente. Uma extrapolação para a dose de 40 J/cm^2 também foi avaliada.

SIMULAÇÃO DE "LESÃO VERRUGOSA" (ÍNTEGRA E ULCERADA)

As curvas de isodose foram determinadas da mesma forma que para o *phantom* de lesão de superfície plana rugosa (ver seção 3.3). Contudo, dada a grande distorção da luz acoplada, apenas uma análise quantitativa foi realizada.

3.5 EXPERIMENTO EX VIVO

Procuramos nesta parte do trabalho validar a hipótese de uma PDT por isolamento para lesões pigmentadas (Ver item 4.3). Para isso, escolhemos a pele suína devido as propriedades ópticas da pele deste modelo animal serem comparáveis as da pele humana [62,63] .

Amostras de pele de suína, constituídas por uma camada dérmica e uma camada subjacente de tecido adiposo, e músculo foram obtidas em um açougue local.

Utilizamos estas amostras para a obtenção de imagens do formato da distribuição de luz quando uma camada de gel é inserida abaixo da pele. Tecido de porco (comprado em um açougue local) abrangendo pele, gordura e músculo, com dimensões de aproximadamente 5 cm por 5 cm, foi utilizado para a obtenção de imagens do formato da distribuição de luz quando uma camada de gel é inserida abaixo da pele. O aparato experimental utilizado é mostrado na Figura 12.

A amostra foi iluminada em duas configurações diferentes: iluminação superficial e iluminação intersticial.

Figura 12: esquema de aquisição de imagem *ex vivo*. A fibra perpendicular à superfície da pele ("Fibra") foi utilizada na iluminação superficial; a fibra paralela ("Fibra Difusora") foi utilizada dentro da hipoderme, no experimento intersticial.

Para a iluminação superficial, uma fibra óptica com emissão gaussiana foi posicionada a 2,5 cm da superfície da pele. Para a realização do experimento com iluminação intersticial, posicionamos uma fibra difusora (a fibra utilizada é a descrita no item 3.2) entre a derme e hipoderme da pele suína. Em ambos os casos, o gel também foi inserido entre a derme e a hipoderme do tecido.

Os dois experimentos foram feitos tanto sem gel quanto com o gel espalhador na concentração de 0,4 $\mu\text{l/g}$ de espalhador para gel preparado conforme descrito na seção 3.1. Apenas o gel com o espalhador foi utilizado nos testes *ex vivo*, devido aos resultados obtidos *in vitro*.

3.5.1 Avaliação do modelo *ex vivo* para iluminação superficial e intersticial

As imagens foram coletadas com o aparato descrito na Figura 12 separadamente para os dois experimentos *ex vivo*. As curvas de isointensidade foram obtidas conforme descrito no item 3.3. As imagens foram coletadas e comparadas qualitativamente para as condições SG e GE. Histogramas da distribuição dentro do tecido foram gerados e analisados para o caso intersticial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo está dividido em três partes principais. Na primeira, serão apresentadas as medidas usadas para o estabelecimento da melhor concentração de espalhador. A partir disto, utilizaremos apenas essa concentração “ótima”, nomeada aqui como gel espalhador (GE), a qual compararemos sempre com a condição sem gel (SG) e gel puro (G). Na segunda, os resultados dos testes *in vitro* para a simulação das lesões plana rugosas e das verrugosas íntegras e ulceradas serão então apresentados para estas três condições.

Na terceira, uma vez considerado o efeito do gel no acoplamento da luz, serão apresentados os resultados do experimento *ex vivo* de iluminação superficial e intersticial, bem como a proposta de PDT por isolamento, como uma possibilidade de aplicação do gel acoplador.

4.1 GEL ESPALHADOR

Antes dos experimentos, foi necessário estabelecer qual seria a concentração de espalhador ideal a ser adicionada ao gel, visando o acoplamento mais eficiente da luz. Este é um ponto essencial para uma aplicação eficiente porque é bem conhecido que, quando uma grande número de eventos de espalhamento ocorre num meio, é observada uma menor quantidade de fótons se propagando na direção original de propagação, diminuindo o alcance médio da luz neste meio. Portanto, se por um lado a adição de um agente espalhador contribui com a homogeneidade da entrega de luz, uma concentração excessiva dele pode se tornar um obstáculo indesejado para os fótons que saem da fibra, atrapalhando a entrega da luz. Para encontrar o ponto ideal entre a escassez e o excesso de agente espalhador, foram testadas várias concentrações da emulsão lipídica Lipofundin[®] adicionadas ao gel, entre 0,2-1,2 µl/g, com intervalos de 0,1 µl/g.

Um comportamento importante a ser levado em conta, observado durante a preparação das amostras, foi que, à medida em que adicionava-se a solução lipídica ao gel, a viscosidade deste mudava, e a tendência a formação de bolhas diminuía — fator de interesse na propagação da luz.

A quantidade de bolhas foi reduzida tanto quanto possível através de centrifugação, para que estas não influenciassem o espalhamento tanto na determinação da concentração de espalhador adicionada ao gel quanto na própria aplicação. Ainda assim, durante a aplicação,

ocorreu a formação de uma quantidade mínima de bolhas no gel depositado no interior da cavidade.

Apesar das bolhas representarem um obstáculo que introduz heterogeneidades à propagação da luz no gel, por conta da adição de interfaces gel/ar, o fato de que sempre houve uma pequena quantidade delas deve ser levado em conta como dificuldade inerente da técnica; afinal, se mesmo em condições controladas é difícil eliminá-las por completo, é razoável considerar que em condições rotineiras de clínica esta dificuldade se apresentará com frequência.

As diferentes concentrações de gel com emulsão lipídica utilizadas foram avaliadas quanto ao seu poder de melhorar o acoplamento da luz ao *phantom*. Para isto, o gel foi colocado na cavidade criada no *phantom* e o perfil de distribuição da luz foi registrado, conforme discutido na seção 3.3, para cada concentração de gel, e é mostrado na Figura 13 como curvas de isodose.

Figura 13: Curvas de distribuição para diferentes composições de Gel/ Lipofundin®, com concentrações entre 0,2-1,2 $\mu\text{l/g}$, com intervalos de 0,1 $\mu\text{l/g}$. A concentração "zero" representa apenas o gel, para fins de comparação

Uma vez que o interesse principal do estudo é propiciar formas de melhorar o acoplamento luz/tecido, a análise foi feita no intuito de observar a homogeneidade do feixe dentro do meio, e das condições que propiciem sua otimização.

É importante notar que, para concentrações maiores que 0,7 $\mu\text{l/g}$, o feixe começa a sofrer distorções, e que ao atingir a concentração de 1,2 $\mu\text{l/g}$, pouca luz chega ao *phantom*. Por outro lado, é notável que com o aumento das concentrações de 0,2 a 0,4 $\mu\text{l/g}$, a quantidade de luz observada em profundidade aumenta substancialmente, e de forma homogênea — diferente do que acontece para a concentração zero. Isto mostra que o

aumento do espalhamento contribui para a entrega mais homogênea, mas que para altas concentrações de espalhador, a luz fica confinada no gel.

Por fim, com relação às concentrações, observamos que, para a concentração de 0,4 $\mu\text{l/g}$, maior intensidade de luz foi detectada a uma distância maior da superfície em comparação com as demais concentrações e, por isto, foi considerada a concentração ideal de espalhador para o gel acoplador.

Por esta razão, os demais experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados utilizando essa concentração para o formatoGE a ser comparado com as condições de G e SG.

4.2 EXPERIMENTO IN VITRO

4.2.1 Lesão plana rugosa

A Figura 14 mostra exemplos das imagens obtidas para as 3 condições de acoplamento da luz com o *phantom* no caso da simulação de uma lesão rugosa; a Figura 15 mostra a área de análise para as condições SG, G e GE já editada — as imagens nela são aquelas que foram processadas para obtenção das curvas de isodoses para cada condição (SG, G e GE).

É possível notar em ambas as figuras que, para a condição SG, a distribuição da luz é muito irregular, com pontos diferentes apresentando intensidades muito variadas entre si, e com pincéis de luz entremeados com sombras razoavelmente bem definidas. Para as cavidades com G e GE, a forma da distribuição torna-se mais regular. No caso do G, o perfil é muito mais homogêneo, e já não se observam os pincéis de luz definidos nem regiões de sombra importantes, como é possível observar nas imagens coletadas sem o gel. No caso de GE, nem mesmo é possível identificar a olho nu os pincéis de luz nas imagens. Estas imagens por si só mostram com clareza como o uso do gel melhora o acoplamento da luz com o *phantom*, eliminando os efeitos mais importantes da reflexão e da refração na interface irregular, e contribuindo com um perfil de distribuição de luz mais regular.

Para caracterizar a propagação da luz no *phantom* de forma mais quantitativa, foi delimitada uma área para análise, representada pelo retângulo branco na imagem para GE. Esta área de análise desconsidera a região de interface, pois existem muitas irregularidade causadas principalmente por conta das bolhas criadas junto à superfície no momento em que o gel é colocado.

Figura 14: Propagação da luz no *phantom* sem gel (SG), com gel (G) e com gel + espalhador (GE), respectivamente (tempo de exposição da câmera de 2 ms). O retângulo branco corresponde a área analisada para obtenção das curvas de isodoses, escolha de modo a evita interface com o fundo da cavidade.

Figura 15: Propagação da luz dentro do *phantom* com Gel, sem Gel e com Gel + espalhador

Processando as imagens para obter os contornos de isodose, é possível observar melhor as irregularidades na condição SG (Figura 16 acima, "Sem Gel"). A luz sofre distorções devido à irregularidades na interface ar-*phantom*. As irregularidades, de uma forma geral, tendem a se tornar mais "suaves" com a distância axial; é interessante notar, porém, que mesmo os efeitos de espalhamento do *phantom* não são capazes de homogeneizar a distribuição de luz — estas irregularidades continuam sendo relevantes mesmo após a luz ter se propagado por vários milímetros além da interface.

Na Figura 16 (centro, "Gel") ainda é possível observar algumas distorções nas curvas de isodose para a condição G, como observado para as imagens das Figuras 14 e 15; Elas são, porém, muito mais discretas comparadas com a condição SG. É interessante notar ainda que nas curvas de isodose mais distantes da superfície (a aproximadamente 7 mm), o perfil é bem mais homogêneo que o observado na mesma distância sem o gel.

A distribuição de luz mais homogênea obtida é vista para a condição GE, apresentada na Figura 16 (abaixo, "Gel Espalhador"). Pouco além de 1 mm abaixo da superfície, já é

possível notar que a propagação da luz é muito mais isotrópica com relação ao eixo central de propagação, apresentando um perfil que se aproxima bastante de uma curva normal quanto à distribuição dos fótons detectados em profundidade.

Uma observação interessante a ser feita, e que é favorável ao uso do gel, é a de que a luz chega praticamente à mesma profundidade em todos os casos, mas que o faz de maneira mais uniforme e previsível nos casos com gel.

De fato, para ambos os testes com gel, 10% da luz chega à profundidade de aproximadamente 7 mm. No caso sem gel, ela chega a 8 mm, mas com um perfil bastante irregular e praticamente impossível de prever sem o acesso da luz no corte transversal usado no *phantom*, o que obviamente não se teria no tecido biológico investigado clinicamente. A perda de penetração é da ordem de 12,5%, o que pode ser considerado bastante aceitável dado o ganho na uniformidade da entrega de luz, que permitiria uma possibilidade de estimativa real da determinação local de entrega de luz.

Figura 16: Curvas de Isointensidades

A uniformidade lateral da distribuição espacial de luz foi quantificada tomando como base a profundidade de penetração em 2 mm e graficando-se o comportamento da intensidade de luz como função da distância lateral. A profundidade de 2 mm foi escolhida

por ser a média da profundidade máxima de tratamento para fontes de luz em comprimento de onda 630 nm [14]. A Figura 17 mostra os gráficos para cada uma das condições avaliadas.

Figura 17: Ajustes gaussianos para profundidade de 2 mm

Observando os formatos das curvas, fez-se a aproximação Gaussiana na tentativa de modelar tais formatos mas, mais que isso, de verificar a semelhança com uma curva

gaussiana, o que permite assumir que há uma distribuição bem determinada dos fótons numa dada distância da fonte. As aproximações estão representadas na Figura 17 como linhas contínuas. É possível observar que o melhor ajuste foi obtido para GE (Figura 17). Para SG e G, notam-se algumas irregularidades como formato de picos em algumas regiões do gráfico, principalmente na parte central, mais próxima ao eixo de propagação de luz orientado com a fibra, perpendicularmente à superfície. Ainda assim é interessante notar a forma como a configuração apenas com gel já permite um melhor ajuste à uma distribuição gaussiana para boa parte da curva.

Para avaliar de forma mais quantitativa o quão adequado foi o ajuste pela função Gaussiana, o coeficiente de determinação R^2 — calculado pelo software Origin 8.0 (OriginLab, USA) — foi analisado. O valor de R^2 representa uma correlação entre pontos experimentais e o ajuste dos mesmos a uma determinada curva, e varia de 0 a 1, e o ajuste é melhor para valores de R^2 mais próximos de 1. A Figura 18 apresenta os valores de R^2 obtidos para cada condição experimental. Uma avaliação em diferentes profundidades foi realizada para que fosse possível verificar diferenças na correlação do ajuste com os pontos em função da profundidade.

Figura 18 Parâmetro R^2 em função da profundidade.

Pode-se notar pela Figura 18 que quando não há gel na cavidade (SG), as irregularidades existentes na interface *ar-phantom* afetam a distribuição da luz no *phantom*, tornando algumas direções de propagação preferenciais — preferência essa que depende

principalmente da irregularidade da superfície; e tais irregularidades continuam se propagando ao longo da profundidade.

Para SG, o valor de R^2 aumenta com a profundidade, indicando que conforme a luz se propaga no meio turbido e sofre atenuação e espalhamentos múltiplos, a sua distribuição torna-se mais regular.

Para a condição G, os valores de R^2 mostram uma distribuição bem mais regular que quando avaliados para a condição SG, tal que se ajusta melhor a uma curva gaussiana. Esta observação indica que o uso do gel transparente como material para melhorar o acoplamento da luz ao *phantom* — ou mesmo a um tecido biológico — pode diminuir as reflexões e refrações na interface e atenuar os efeitos das imperfeições que nela existam.

Entretanto, à medida que a luz se propaga em profundidade, o valor de R^2 diminui indicando que os valores experimentais já não se ajustam tão bem por uma curva gaussiana.

Para a condição GE, o valor de R^2 é o mais próximo de 1 para todas as profundidades avaliadas, indicando uma maior correlação dos pontos experimentais para GE que para os grupos SG e G, indício de que esta condição gerou uma distribuição mais homogênea da luz no *phantom*. Além disso, houve pouca alteração do valor do R^2 (aproximadamente 0,5%, em contraste) entre as diferentes profundidades analisadas, indicando que a propagação espacial da luz no *phantom*, quando se utiliza um gel espalhador entre a fonte de luz e o *phantom*, é evidentemente mais regular e mantém seu formato independente da profundidade de propagação da luz.

Uma análise da largura da curva gaussiana usada para o ajuste matemático (W), pode ser usada para avaliar a focalização ou defocalização do feixe conforme ele propaga-se no *phantom*. O parâmetro W corresponde à cintura do feixe Gaussiano obtida através do ajuste da curva teórica. A equação (15) mostra:

X_c – centro do Pico

w – largura a meia altura

Y_o – deslocamento (offset)

A – área

$$y = y_o + \left(\frac{A}{w \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \right) \exp \left(-2 \left(\frac{x-x_c}{w} \right)^2 \right) \quad (15)$$

A Figura 19 mostra a evolução da largura da Gaussiana como função da profundidade no *phantom*. Nota-se que para GE, a variação na largura do feixe é significativamente menor do que para os demais casos, o que indica que o uso do gel espalhador como um acoplador, faz com que o feixe de luz mantenha-se mais regular conforme sua propagação.

Figura 19: largura do feixe ao longo das profundidades

Os valores de W para cada profundidade são mais homogêneos para os testes com gel do que para os testes sem gel (representado pelas barras de erro) e que sua variação é linear (conforme demonstram os ajustes das curvas), enquanto que para os testes sem gel esta linearidade não é observada. É interessante notar ainda que a inclinação para as três condições é praticamente a mesma, o que é esperado pois a forma como o feixe se deforma dentro do meio depende das propriedades físicas do próprio meio, e não da presença ou não dos agentes de acoplamento da luz — o que indica que os géis não alteram o *phantom* em si, mas apenas a forma como a luz atravessa a interface.

Além disso, os menores valores de W observados para o gel, em especial para o gel com espalhador, implicam em maior penetração da luz no *phantom*, o que favoreceria tratamentos de lesões mais profundas, dado que ocorre menor dispersão do feixe de luz.

Figura 20: decaimento do feixe ao longo da linha de propagação Para SG, G e GE.

Para os casos em que a cavidade foi preenchida com gel (G e GE) na Figura 20, as intensidades de luz imediatamente após a interface foram maiores. No entanto, mesmo com as perdas ocorrendo através da passagem da luz pelo gel acoplador, as maiores perdas ocorreram nas reflexões que ocorrem quando os fótons encontram o *phantom* sem gel.

Isto ocorre porque as reflexões são causadas por mau acoplamento do vetor de onda, e uma vez que os vetores de onda são determinados pelos índices de refração, cobrir uma superfície com uma camada de material resulta num melhor acoplamento da luz [64].

A fim de avaliar a uniformidade da distribuição espacial da luz, tomamos curvas de isodose, ajustadas para uma parábola tomada a uma distância central de 2 mm, e suas intensidades foram tomadas ao longo dessa linha, de forma que quanto menor a dispersão em torno da linha, mais uniforme é a distribuição. Investigamos como os valores flutuam em torno de um valor médio, pretendendo analisar a energia entregue em torno de uma dose determinada de luz. Foi considerada a dose de 40 J/cm^2 como valor de escolha, por ser esta a dose mínima para ativar o FS usando 630 nm, usada em tumores de pele não-melanoma [61]. Essas doses são apresentadas na Figura 21.

Figura 21: Flutuação da dose de luz em torno de um valor mínimo; Nos casos com gel acoplador (GE) a distribuição é menos irregular e não cruzam a linha de valor mínimo.

Para alcançar uma necrose, uma dose mínima de luz (representada pela linha sólida) deve ser alcançada — o chamado conceito de dose limiar [65]. A presença de variações acima e abaixo do valor limiar significa que há regiões que não estão satisfazendo o critério para ter uma dose maior que a dose mínima.

As regiões onde a dose está abaixo da linha de dose mínima são aquelas que, num tratamento, não produzirão a morte celular necessária, deixando para trás células viáveis, e que em diagnóstico não receberão luz suficiente para gerar diagnóstico adequado [66].

O gerenciamento da dosimetria para uma entrega de luz em tecidos mais regular é mais simples que nos casos para os quais a distribuição de luz é muito irregular. Uma forma de superar de modo simples essa dificuldade é a divisão das aplicações de PDT em duas ou

mais sessões [67]. Apesar disso, o uso do gel pode reduzir consideravelmente a irregularidade do resultado destas aplicações.

4.2.2 Lesão verrugosa (íntegra e ulcerada)

Lesões verrugosas foram simuladas para dois diferentes formatos. As Figuras 22e 23 mostram como a propagação da luz é diferente para os diferentes tipos de lesão e também para os diferentes tipos de interface SG, G e GE.

Aspectos interessantes foram observados quando a luz passa do ar para o *phantom* nos dois formatos verrugosos. Nas Figuras 22 (SG) e 23 (SG), a luz sofreu uma espécie de focalização ao passar do ar para o *phantom*; as superfícies convexas atuaram como uma lente, direcionando a luz do feixe de modo que houve uma concentração dos feixes de luz no interior do *phantom*, criando regiões de maior intensidade em regiões bem definidas.

Quando o gel, com ou sem espalhador, foi adicionado entre a fonte de luz e o *phantom*, estes efeitos de focalização deixaram de existir, e a propagação da luz no *phantom* manteve basicamente o formato do feixe emitido pela fibra óptica. Este é um resultado imediato do uso do gel, mas que mostra como o acoplamento pelo gel pode representar uma importante contribuição nas técnicas ópticas, corrigindo efeitos importantes da estrutura da interface na propagação da luz dentro do meio de interesse.

Figura 22: Lesões com forma verrugosa de superfície íntegra

Figura 23: Lesões com forma verrugosa lesionada sem parte superior (ulceradas)

Curvas de contorno são apresentadas nas Figuras 24 e 25 para cada forma de lesão simulada, e mostram os formatos das curvas de isodose no interior do *phantom*. As imagens mostram que, para a condição SG, a distribuição de luz apresenta regiões de máximos e mínimos de intensidade bastante irregulares. Já para os casos G e GE, as curvas de isodose são mais regulares, especialmente para o GE.

Figura 24: Mudança na distribuição de luz na presença dos acopladores sobre as lesões verrugosas.

Figura 25: lesões verrugosa sem o topo, perfil melhorado na presença do gel acoplador

Podemos verificar que, para o caso da lesão verrugosa ulcerada (figura 25) na presença do gel com espalhador, o perfil é menos intenso que o esperado (já que nos outros testes a condição GE tinha alcance de penetração semelhante ao da condição G). A causa mais provável desta menor propagação foi a influência das bolhas que inevitavelmente se depositaram no caminho do feixe, e interferiram em como este foi entregue à lesão.

Os valores dos índices de refração obtidos por meio do refratômetro de Pulfrich confirmam a proposta do uso de gel como meio acoplador, pois os valores obtidos para o gel e gel acoplador foram bastante semelhantes aos do ágar utilizado como base para o *phantom*. Comparando com valores encontrados na literatura [68] para a derme, sangue e vasos para comprimentos de onda acima de 600 nm, o índice de refração seria aproximadamente 1,37.

Portanto, podemos ver que esses valores são bem aproximados, explicando a suavização importante do efeito da interface gel/*phantom*. Esses resultados confirmam a

importância da utilização de um meio acoplador em aplicações de fototerapia, já que parece que a passagem da luz do ar para o tecido não é a forma mais eficaz de realizar a aplicação destas técnicas. Isso mostra que, ao inserir o gel, seja ele transparente ou espalhador, ocorre um acoplamento expressivo dos índices de refração que faz com que a luz praticamente não perceba a existência da interface com o *phantom*. Este resultados mostram como o formato de uma lesão pode influenciar na propagação da luz no tecido biológico.

Os valores obtidos para 656 nm foram bastante semelhantes para as 3 amostras:

Gel de carbopol (G)	Gel de carbopol + Lipofundin ® (SG)	Ágar
1,338	1,338	1,333

A interação da luz com a interface do tecido é importante também na determinação da geometria da distribuição da luz dentro do tecido. O índice de refração dos tecidos biológicos fica no intervalo de 1,37 a 1,41 [69], o que faz com um feixe de luz incidente sofra um considerável desvio ao passar do ar (com índice de refração de aproximadamente 1,0) para o tecido.

Nos resultados obtidos nesta tese, quando foi avaliada propagação da luz ao passar pela interface entre o ar e o *phantom*, mostrou-se que as irregularidades existentes na superfície geraram irregularidades também na distribuição espacial da luz no interior do *phantom*. O uso do gel minimizou significativamente os efeitos das irregularidades presentes na interface.

A adição de espalhadores ao gel tornou a distribuição de luz ainda mais homogênea, praticamente sem comprometimento do alcance da luz no meio. A única exceção, para as análises em verrugosas, foi a ocorrência de uma perda de intensidade de luz antes do acoplamento, devido ao espalhamento nas bolhas do gel, de modo que em algumas situações, a penetração da luz no *phantom* foi muito menor do que quando utilizou-se o gel transparente.

O uso do gel espalhador causou um alargamento no feixe da luz no *phantom* tanto para as "lesões planas rugosas" quanto para as "lesões verrugosas". As evidências encontradas neste trabalho tornam-se importantes quando diferentes regiões anatômicas são tratadas com fototerapias. Uma região anatômica mais côncava, ou mais convexa (como a lesão verrugosa "íntegra" simulada), ou mesmo uma região cuja superfície é bastante irregular (como a "ulcerada" que foi simulada) pode representar um desafio para o estabelecimento de uma

dosimetria de luz adequada, visto que as irregularidades da superfície poderão causar sombras ou focalização dos feixes de luz no interior do tecido.

O efeito de "lente", focalizando a luz dentro do tecido, pode também levar a efeitos indesejados quanto ao tratamento utilizando luz. Em fototerapia, é comum se considerar o princípio de Arndt Schultz, que diz que a quantidade local de um fármaco interfere positiva ou negativamente nos efeitos sofridos pelo tecido, como válido.

A Figura 26 mostra esse princípio; segundo ele, a resposta biológica tem um ponto ótimo, sendo insuficiente se a dose depositada for menor, e prejudicial se a dose for excessiva. Assim, se a luz é acidentalmente focalizada no tecido, porções dele serão subtratadas, enquanto outras porções poderão sofrer efeitos negativos e indesejados, como dano térmico. Portanto, o uso de uma abordagem que evita tais efeitos, como o uso do gel, pode evitar que se incorra em resultados inesperados por conta do redirecionamento da luz causado pelas interfaces.

Figura 26: Diagrama de Arndt- Schulz
Fonte: traduzido de [77]

Lu et al. utilizaram simulação de Monte Carlo para estudar a distribuição da luz em modelo de pele com duas camadas, e concluíram que uma interface de tecido rugosa pode fortemente afetar a distribuição da luz proveniente de um feixe convergente, e que uma grande diferença entre os índices de refração nessas interfaces contribuem para aumentar ainda mais esse efeito [70].

Aqui nesta tese, o estudo de propagação de luz foi conduzido em um *phantom* homogêneo, com apenas uma camada. Múltiplas camadas com diferentes propriedades ópticas, podem apresentar resultados diferentes. Ainda assim, nestes casos os índices de refração no próprio tecido não podem ser modificados, e o da camada mais superficial, que seria aquele em contato com o gel para acoplamento da luz que sai na fibra, é que deveria ser levado em conta.

Por outro lado, uma vez que se demonstrou que o acoplamento do índices de refração permite melhor entrega e distribuição da luz, camadas de tecido conhecimente diferentes em seus índices de refração poderiam receber injeções de gel nas interfaces das camadas mais internas, com propriedades adequadas para casar os índices das camadas interiores. Além da obtenção de um gel com características próprias por camada, o que é de difícil aplicação dependendo da espessura das camadas do tecido em questão, é preciso também levar em conta potenciais efeitos prejudiciais que o deslocamento mecânico da lesão em diferentes camadas poderia causar na lesão. Assim, trabalhos futuros devem ser conduzidos a fim de analisar os tipos de irregularidades teciduais que podem ocasionar uma distorção no padrão de distribuição da luz.

Não encontramos na literatura nenhum trabalho que tenha reportado o uso de agentes ópticos para melhorar o acoplamento da luz com o tecido com finalidade terapêutica. Alguns artigos reportam o uso de gel ou de algum líquido para casamento de índices de refração com *phantoms*, ou para melhorar o desempenho de sistemas de fotodiagnóstico [71,72], porém nenhum deles avalia como uma interface irregular pode afetar a distribuição e o acoplamento da luz.

A dosimetria para fototerapias permanece um desafio para diversos grupos no mundo que realizam pesquisas nessa área. Por isso, este é um ponto interessante do trabalho desenvolvido; este dado mostra que tal uso dos géis para contribuir com a entrega de luz é uma abordagem pioneira no campo de pesquisa. Dada a simplicidade do processo, em especial quando a iluminação é superficial, esta tática apresenta grande vantagem sobre a irradiação comumente utilizada.

Este trabalho é um indicativo de que o uso de um material para melhorar o acoplamento da luz ao tecido torna a distribuição de luz mais regular; e que, nestas condições, a distribuição então observada possui uma relação muito mais direta com o formato da distribuição da luz emitida pela fonte, do que com as irregularidades inerentes à superfície do tecido.

Deste modo, o estabelecimento de uma dosimetria para uma determinada fototerapia, é mais fácil de ser determinada e os resultados da mesma podem ser melhor entendidos. Conhecendo perfis de entrega de luz, as possibilidades de avaliar apropriadamente o consumo de um fotossensibilizador num dado ponto do tecido, ou a previsão de um resultado terapêutico [73] podem receber inestimável contribuição, e mesmo os protocolos de tratamento já utilizados poderiam incorporar este método em seus protocolos com poucas alterações, dado que estes géis são passíveis de interação com o corpo humano e de uso comum em aplicações médicas.

4.3 UMA PROPOSTA DE TERAPIA FOTODINÂMICA POR ISOLAMENTO

Vistas as possibilidades que o uso do gel podem representar em atuações clínicas, no diagnóstico e especialmente no tratamento, esta seção se dedica a apresentar possibilidades de aplicação da técnica de associação do gel com a entrega de luz, no caso focando técnicas terapêuticas.

Os princípios básicos da Terapia Fotodinâmica (PDT) envolvem diversos aspectos, que devem ser levados em conta para um tratamento bem sucedido. Entre eles, está a capacidade de iluminar todo o tecido com intensidade de luz suficiente para que seja possível atingir a dose de limiar em tempos relativamente curtos (de modo a serem praticáveis clinicamente). Quando temos lesões altamente pigmentadas, contudo, isto pode não ser atingido, e a penetração insuficiente de luz compromete a aplicação bem sucedida da técnica.

Lesões do tipo melanoma estão hoje completamente fora da possibilidade de serem tratadas com a PDT, pois a alta chance de tratamento incompleto por conta desta barreira, associada à expressiva agressividade da lesão, torna a margem de sucesso bastante reduzida.

A luz no comprimento de onda em aproximadamente 630 nm tem uma grande absorção pelos melanócitos, fazendo com que a luz não penetre mais que alguns micrometros no tecido. Isto torna impraticável o uso da luz para o tratamento destas lesões.

O melanoma é o mais maligno dos tipos de tumores de pele, e afeta mais de 30 mil brasileiros por ano, e das lesões de pele é aquela que mais leva a complicações. Sendo extremamente metastático, o melanoma acaba sendo um dos mais perigosos tipo de câncer. Alternativas para seu tratamento, principalmente nos estágios iniciais, é uma forma de evitar as complicações da doença.

Na Figura 27 mostramos um melanoma no seu estágio intermediário. Enquanto ainda no início, a lesão está localizada praticamente na epiderme. Os estágios iniciais do melanoma envolvem preferencialmente uma expansão diametral e não em profundidade.

Figura 27: expansão do diametro do melanoma [74]

O fato de ser uma lesão localizada permite idealizar uma nova forma de tratá-la, aplicando uma filosofia diferente com base no que foi observado neste estudo.

A ideia desta abordagem diferenciada consiste em isolar a lesão do restante do tecido através do uso do gel e da PDT, impedindo qualquer fluxo entre as partes, e promovendo a morte da lesão por inanição e isolamento.

Para melhor entender a proposta, considere a sequência mostrada na Figura 28. Em uma lesão localizada de melanoma, (Figura 28(a)) a luz fica impedida de penetrar adequadamente na lesão por conta da pigmentação. Contudo, se o aporte de nutrientes e o acesso ao tecido sadio for negado, as células passam a sofrer a ausência desses nutrientes e a não ter por onde se infiltrar no tecido sadio ou como permitir que células sejam levadas pela corrente sanguínea (levando a uma metástase).

Portanto, seria possível realizar a injeção do hidrogel na região logo abaixo da lesão, como indicado na Figura 28(b). A ideia é fazer com que todas a região de células tumorais — e, claro, uma porção das células sadias nas bordas da lesão, a título de margem de segurança — seja isolada do restante das células por gel, e usar este mesmo gel como condutor da luz até esta região fronteira entre o tecido normal e o tumoral, para realização da PDT.

Assim, o procedimento (como desenhado na Figura 28) implicaria inicialmente em fotossensibilização do tecido (afinal, é preciso metabolismo e transporte funcionais no tecido para uma fotossensibilização eficiente).

Figura 28 (a) a luz não poderá penetrar na lesão, (b) injeção do gel (hidro gel) na região logo abaixo da lesão, (c) iluminação da lesão (d) borda da lesão sofrerá necrose (e) iluminação por fibra difusora (f) zona de subnecrose

Na sequência, seria feita a injeção do gel de modo que uma "bolsa" de gel fosse formada sob a lesão, e seria feita então a iluminação superficial (Figura 28 (c)) com o campo de iluminação indo além do tamanho da lesão. Neste caso, a bolsa de gel funcionaria como uma espécie de agente distribuidor da luz, garantindo que a região sob a lesão seja completamente tratada.

Como a luz não penetra na lesão, apenas sua borda sofrerá com o tratamento, chegando a sofrer necrose (Figura 28 (d)). Neste ponto, a lesão já está isolada pelo gel em sua parte inferior e em suas bordas pela necrose. Nesta situação, a lesão ficará isolada, e deverá também entrar em necrose.

A fim de tornar o processo ainda mais eficiente, uma fibra óptica difusora pode ser introduzida na bolsa de gel (Figura 28 (e)), produzindo iluminação sub-lesão aumentando a quantidade de luz que o gel entregará ao tecido, o que deverá garantir também a realização de uma zona de necrose sub-lesão (Figura 28 (f)).

O resultado desta abordagem seria o isolamento completo do melanoma e sua morte, sem de fato agredir a lesão, evitando uma resposta agressiva por parte das células tumorais, com prejuízo evidente para o paciente.

Contudo, para se chegar ao ponto de propor uma PDT por isolamento com eficiência de tratamento suficiente para que se torne uma alternativa de tratamento, os princípios da abordagem precisam ser provados. Para isto, diversos estudos devem ser realizados, no sentido de permitir o entendimento de todos os passos envolvidos. No presente estudo, alguns destes testes foram conduzidos de modo a melhorar este entendimento.

4.4 EXPERIMENTO EX VIVO

Os experimentos apresentados nesta seção são os testes em pele de porco *ex vivo*, visando demonstrar num primeiro momento a possibilidade de se propor tratamentos alternativos via PDT para lesões pigmentadas, através da demonstração da condução e distribuição da luz por meio do uso de hidrogel interstiial, e sua comparação com o uso superficial.

4.4.1 iluminação superficial

As imagens da Figura 29 (SG e GE) mostram a distribuição da luz quando há ou não gel inserido sob a pele e a iluminação é superficial.

Figura 29: Iluminação externa da pele suína *ex vivo*. Estas imagens já são as porções editadas para obtenção das curvas de isodose.

As imagens da Figura 30 (SG e GE), por sua vez, mostram as curvas de isointensidade para o caso da iluminação superficial.

Figura 30: Curvas de isointensidade obtidas das imagens de distribuição para iluminação externa em pele de porco *ex vivo*.

A comparação com os resultados *in vitro* deve ser feita levando-se em conta que a pele do animal utilizada é uma pele sadia, sem uma simulação de lesão ou uma lesão real, de modo que não há grandes alterações de interface a serem superadas. Além disso, é preciso ter em mente que a pele suína é extratificada, possuindo camadas de espessuras e composições diferentes, que podem ter comportamentos diferentes em termos de propagação de luz por conta das propriedades ópticas das células, moléculas e estruturas de suporte presentes em cada uma delas.

Dito isso: a Figura 30, em especial as curvas de isodose, permitem comparar a pele sem gel e a mesma pele com gel; nota-se que a luz alcança quase 1,0 mm a mais em profundidade (o que representa cerca de 30% mais penetração) na pele com gel. É interessante notar que, apesar disso, a parte da luz mais expressiva está aparentemente confinada nas primeiras camadas do tecido em ambos os casos, e com base na escala de cor, cerca de 50% da intensidade de luz entregue na superfície só é detectada até uma profundidade de 2 mm.

Este confinamento pode ser justificado pelas diferentes interfaces que a luz atravessa dentro da pele, após passar pela primeira interface ar/pele. Como as constituições das diferentes camadas podem levar a índices de refração médios diferentes, e as variações entre uma camada e a próxima não necessariamente só aumenta ou diminuem, pode haver um confinamento induzido meramente por conta dos índices de refração. Um estudo mais

pormenorizado, *in vitro*, utilizando camadas de *phantom* com diferentes índices de refração deverá ser realizado no futuro para fins de comparação com a pele.

Em termos de homogeneidade, ambos os casos parecem semelhantes, o que se justifica por conta da ausência de lesões no tecido investigado — isso torna a constituição e estrutura da interface muito semelhante nos dois casos, reduzindo a evidência do efeito acoplador. Contudo, este efeito não pode ser ignorado, visto o aumento da penetração da luz no caso com gel, o que mostra que mesmo sem grandes deformações na superfície, o gel tem um papel relevante no acoplamento da luz.

4.4.2 iluminação intersticial

Uma das alternativas para driblar as dificuldades que a iluminação superficial impõe é o uso de difibras difusoras. Essas fibras nada mais são que fibras ópticas com elementos difusores acoplados de modo a difundir simetricamente a luz na saída da fibra. Esse recurso elimina o efeito de colimação para fontes de luz laser, mas também contribui para que os fótons entregues sejam mais simetricamente distribuídos em toda a saída da fibra.

As imagens da Figura 31 mostram a distribuição da luz para o caso de iluminação intersticial com e sem gel inserido. Neste caso, uma fibra óptica com difusor cilíndrico de 2 cm de comprimento foi inserida dentro do gel, promovendo uma iluminação de dentro para fora. Para este caso, o gel utilizado foi gel espalhador, numa tentativa de aproveitar o efeito uniformizador que o espalhador tem sobre a luz, uma vez que estas fibras difusoras dificilmente apresentam um perfil absolutamente uniforme. A Figura 32, por sua vez, mostra as curvas de isodose referentes às imagens da Figura 31.

Figura 31: iluminação intersticial pele suína

Figura 32: curvas de isointensidade intersticial

Os resultados mostram que a inserção do gel permite que a luz seja conduzida por ele sem grandes perdas de intensidade, um indicativo de que o método de PDT por isolamento de lesão tem potencial para aplicação clínica. Na figura 32, a fibra está inserida no GE, e é possível visualizar a região onde o gel está inserido no entorno dela. Nestas regiões, nota-se que as maiores intensidade de luz são detectadas, em contraste com a fibra inserida sem gel, onde o sinal mais intenso de luz é detectado bastante próximo da fibra difusora apenas.

A penetração da luz nos testes com a fibra difusora usando o gel, na parte que diz respeito ao tecido, não é muito maior que nos testes sem o gel, ficando em torno de 2 mm. Contudo, o fato de se detectar maiores intensidades de luz dentro do gel, como se este fosse uma espécie de "extensão" da fibra, indica que a combinação GE é um bom condutor para a luz, mostrando que existe uma possibilidade real de ser usar o gel na aplicação sugerida na seção anterior, ao menos no que diz respeito a garantir que uma intensidade importante de luz chegue em pontos do tecido que não seriam alcançados sem seu uso.

No que diz respeito a preocupações sobre a inserção do gel no tecido, a escolha feita para o mesmo e para o espalhador permite que eventuais efeitos adversos sejam minimizados, uma vez que o hidrogel é atóxico e pode ser absorvido pelo tecido; e caso não o seja, não causará prejuízos a estrutura ou dinâmica físicoquímica do tecido no qual se encontra. Quanto ao agente espalhador, emulsões lipídicas como o Lipofundin[®] são perfeitas para a aplicação, já que por serem utilizadas para alimentação parenquimal, são absolutamente inofensivas para o tecido biológico, e qualquer porção que deixe o gel deverá ser naturalmente absorvida pelo tecido. A Figura 33 mostra um histograma da quantidade de pixels para as diversas intensidades da iluminação intersticial, o que de uma certa forma, mostra que na presença do gel temos maior quantidade de pixels nas intensidades mais altas.

Figura 33: Histograma da quantidade de Pixels com uma determinada intensidade para a iluminação intersticial em pele de porco SG e CG

5 CONCLUSÕES

Os resultados dos diferentes experimentos realizados neste estudo mostram como a forma de entrega de luz interfere profundamente na sua distribuição. Isto se reflete na reprodutibilidade dos procedimentos terapêuticos, que são sempre definidos por protocolos — e, por isso, precisam desta constância entre método e resultado para que sejam de fato aplicáveis.

Este estudo apresentou um possível método para aperfeiçoamento do resultado da PDT para tumores de superfície. O uso do carbopol gel associado a Lipofundin® fornece uma melhoria efetiva na uniformidade da iluminação, reduzindo efeitos da rugosidade superficial do tecido. A luz sofreu menos interferência da rugosidade porque houve uma redução na diferença entre os índices de refração do meio. O índice de refração do *phantom* utilizado foi de 1,333, e o do gel acoplador de 1,338.

Além disso, a profundidade alcançada pela luz é maior na presença do gel associado a um agente espalhador em comparação ao gel transparente. Uma explicação para este comportamento é a de que a luz parcialmente refletida na incidência sobre a interface não é completamente perdida. Fótons espalhados retornam ao gel com partículas espalhadoras, o que pode permitir que eles voltem a incidir sobre o *phantom*, contribuindo para maior eficiência de iluminação.

A limitação das fototerapias está, em grande parte, na entrega adequada de luz, uma vez que a não-reprodução de protocolos estabelecidos resulta em insucessos que podem trazer consequências graves clinicamente. Em terapia fotodinâmica, particularmente, esta limitação é uma grande barreira para o sucesso do tratamento, já que a indução de morte celular é dose-dependente. Por isso, o acoplamento adequado da luz ao tecido pode ser responsável por "ilhas" de células viáveis em regiões predominantemente necróticas (Figura 34), encontradas tanto no uso de fotossensibilizadores tópicos quanto sistêmicos, e que podem ser a causa de recrescimento tumoral e da piora do quadro clínico do paciente.

Figura 34: Ilha de células viáveis em regiões necróticas [79]

Portanto, a contribuição que este estudo oferece, dada a facilidade do uso do gel em lesões tumorais de pele e a importante melhoria apresentada por esta proposta na homogeneização da entrega de luz dentro do tecido, pode representar um avanço real na melhoria das aplicações de fototerapia quanto à homogeneidade — e, consequentemente, reprodutibilidade — dos resultados da aplicação de protocolos clínicos padronizados e à diminuição das recidivas.

REFERÊNCIAS

1. NIEMZ, M. H. **Laser-tissue interactions**. Berlin: Springer, c2007.
2. VO-DINH, T. (Ed.). **Biomedical photonics handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2003.
3. WELCH, A. J.; VAN GEMERT, M. J. C. (Eds.). **Optical-thermal response of laser-irradiated tissue**. 2nd ed. London: Springer, c2011.
4. BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER, I. The present and the future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 8, p. 497-508, 2004.
5. ALLISON, R. et al. A clinical review of PDT for cutaneous malignancies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 3, n. 4, p. 214-226, 2006.
6. ASAKAGE, T. et al. Tumor thickness predicts cervical metastasis in patients with stage I/II carcinoma of the tongue. **Cancer**, v. 82, n. 8, p. 1443-1448, 1998.
7. PINHEIRO, P. **Melanoma maligno: câncer de pele**. 2014. Disponível em: <<http://www.mdsaude.com/2008/11/cncer-de-pele-cancro-de-pele.html>>. Acesso em: 4 mar. 2014.
8. SOMMER, A. P. et al. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 19, n. 1, p. 29-33, 2001.
9. TUCHIN, V. V. et al. Light propagation in tissues with controlled optical properties. **Journal of Biomedical Optics**, v. 2, n. 4, p. 401-417, 1997.
10. NICOLODELLI, G. et al. Effect of photodynamic therapy on the skin using the ultrashort laser ablation. **Journal of Biophotonics**, v. 7, n. 8, p. 631-637, 2014.
11. BONNETT, R.; DJELAL, B. D.; NGUYEN, A. Physical and chemical studies related to the development of m-THPC (FOSCAN®) for the photodynamic therapy (PDT) of tumours. **Journal of Porphyrins Phthalocyanines**, v. 5, n. 8, p. 652-661, 2001.
12. HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technology in Cancer Research & Treatment**. v. 4, n. 3, p. 283-293, 2005.
13. STRINGASCI, M. D. **Investigação da dosimetria para TFD com o uso de fibra difusora - modelos em phantom e in vivo**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

14. MORIYAMA, L. T. Métodos simplificados para obtenção de distribuição de luz em tecidos biológicos: aplicação para terapia fotodinâmica. 2011. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
15. WANG, Y.H. et al. To record and direct visualization of cellular lipid peroxidation and glutathione (GSH) depletion in HepG2 cells exposed to laser irradiation-induced photodynamic effects (PDT) of BPD-M.A using confocal microscopy. **Free Radical Research**, v. 40, p. S170-S170, 2006.
16. WILSON, T. Confocal microscopy. In: VO-DINH, T. (Ed.). **Biomedical photonics handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.18 - 20.
17. FUJIMOTO, J.; BREZINSKI, M. Confocal microscopy optical coherence tomography imaging. In: VO-DINH, T. (Ed.). **Biomedical photonics handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2003.
18. HÜTTMANN, G. Optical coherence tomography (OCT) for early diagnosis of tumors and online-control of photodynamic therapy (PDT). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 2, p. 152, 2011.
19. XING, D. et al. Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12, n. 1, p. 014001-014001-8, 2007.
20. ORAEVSKY, A.; KARABUTOV, A. Optoacoustic tomography. In: VO-DINH, T. (Ed.). **Biomedical photonics handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.34-36.
21. MOURANT, J. Elastic-scattering spectroscopy and diffuse reflectance. In: VO-DINH, T. (Ed.). **Biomedical photonics handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2003.
22. JUZENIENE, A. et al. Reflectance spectroscopy and fluorescein angiography applied to assess photodynamic response in healthy mouse skin treated with topical hexylaminolevulinate. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 4, p. 239-245, 2010.
23. VO-DINH, T. Fluorescence spectroscopy for biomedical diagnostics. In: VO-DINH, T. (Ed.). **Biomedical photonics handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.50-57.
24. BOERE, I. A. et al. Monitoring in situ dosimetry and protoporphyrin IX fluorescence photobleaching in the normal rat esophagus during 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 3, p. 271-277, 2003.
25. BRAICHOTTE, D.R. et al. Optimizing light dosimetry in photodynamic therapy of early stage carcinomas of the esophagus using fluorescence spectroscopy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 340-346, 1996.

26. CHEUNG, R. et al. Correlation of in vivo photosensitizer fluorescence and photodynamic-therapy-induced depth of necrosis in a murine tumor model. **Journal of Biomedical Optics**, v. 8, n. 2, p. 248-252, 2003.
27. FARRELL, T. J. et al. Modeling of photosensitizer fluorescence emission and photobleaching for photodynamic therapy dosimetry. **Applied Optics**, v. 37, n. 31, p. 7168-7183, 1998.
28. GEORGAKOUDI, I. The color of cancer. **Journal of Luminescence**, v. 119, p. 75-83, 2006.
29. JARVI, M.T. et al. Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: current status, challenges and future prospects. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 5, p. 1198-1210, 2006.
30. RAMANUJAM, N. Fluorescence spectroscopy in vivo. In: MEYERS, R. A. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. New York: Wiley, 2000. p.20-56.
31. ROBINSON, D. J. et al. Fluorescence photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. **Photochemistry and Photobiology**, v. 67, n. 1, p. 140-149, 1998.
32. VOLLET-FILHO, J. et al. Correlation between photosensitizer degradation and depth of necrosis in PDT: possibility for real time dosimetry. **Lasers in Surgery and Medicine**, p. 9, res. 24, 2008.
33. VOLLET-FILHO, J. et al. Possibility for a full optical determination of photodynamic therapy outcome. **Journal of Applied Physics**, v. 105, n. 10, p. 102038-102038-7, 2009.
34. VOLLET-FILHO, J. D. **Correlação de fluorescência superficial e profundidade de necrose em terapia fotodinâmica**: possibilidade de dosimetria em tempo real. 2011. 127 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-22122011-135320/>>. Acesso em: 9 jun. 2014.
35. WILSON, B. C.; ADAM, G. A Monte Carlo model for the absorption and flux distributions of light in tissue. **Medical Physics**, v. 10, n. 6, p. 824-30, 1983.
36. BARAJAS, O. et al. Monte Carlo modelling of angular radiance in tissue phantoms and human prostate: PDT light dosimetry. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, n. 9, p. 1675-1687, 1997.
37. WANG, S.P. et al. **Monte Carlo simulation of the diffusely scattered polarized light in turbid media**. Bellingham: SPIE, 2005. (SPIE, 5630).

38. COTTRELL, W.; OSEROFF, A.; FOSTER, T. Portable instrument that integrates irradiation with fluorescence and reflectance spectroscopies during clinical photodynamic therapy of cutaneous disease. **Review of Scientific Instruments**, v. 77, n. 6, p. 064302, 2006.
39. ISHIMARU, A. Diffusion of light in turbid material. **Applied Optics**, v. 28, n. 12, p. 2210-2215, 1989.
40. CONTINI, D.; MARTELLI, F.; ZACCANTI, G. Photon migration through a turbid slab escribed by a model based on diffusion approximation. I. Theory. **Applied Optics**, v. 36, n. 19, p. 587-4599, 1997.
41. MARTELLI, F. et al. Photon migration through a turbid slab described by a model based on diffusion approximation. II. Comparison with Monte Carlo results. **Applied Optics**, v. 36, n. 19, p. 4600-4612, 1997.
42. CHEONG, W. F.; PRAHL, S A.; WELCH, A. J. A review of the optical properties of biological tissues. **IEEE journal of quantum electronics**, v. 26, n. 12, p. 2166-2185, 1990.
43. MARCUSE, D. **Light transmission optics**. 2nd ed. Florida: Robert e Krieger, 1982.
44. WEIR, V. M.; WOO, T. Y. Photo-assisted epilation - review and personal observations. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 1, n. 3, p. 135-143, 1999.
45. LEKNER, J; DORF, M. C. Why some things are darker when wet. **Applied Optics**, v. 27, n. 7, p. 1278- 1280, 1988.
46. ROSS, E. V. et al. Theoretical considerations in laser hair removal. **Dermatologic Clinics**, v. 17, n. 2, p. 333-355, 1999.
47. HOSMANI, A. H.; THORAT, Y. S.; KASTURE, P. V. Carbopol and its pharmaceutical significance: a review. **Pharmaceutical Reviews**, v. 4, n. 5, p. 377-386, 2004.
48. PEPPAS, N. A. Physiologically responsive hydrogels. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 6, n. 3, p. 241-246, 1991.
49. LIN, C.-C.; METTERS, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 12-13, p. 1379-1408, 2006.
50. FIXLER D.; ZALEVSKY, Z. Estimation of flow rate and direction of medium with low scattering coefficient via linear polarization measurement. **Optics and Lasers Engineering**, v. 51, n. 2, p. 91 –95, 2013.
51. MICHELS, R.; FOSCHUM, F.; KIENLE, A. Optical properties of fat emulsions. **Optics Express**, v. 16, n. 8, p. 5907–5925, 2008.

52. CHOUKEIFE, J.; L'HUILLIER, J. Measurements of scattering effects within tissue-like media at two wavelengths of 632.8 nm and 680 nm. **Lasers in Medical Science**, v. 14, n. 4, p. 286–296, 1999.
53. GALANZHA, E. I. Skin backreflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 14, p. 1739-1739, 2003.
54. POGUE, B. W.; PATTERSON, M. S. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. **Journal of Biomedical Optics**, v. 11, n. 4, p. 041102-041102, 2006.
55. MCKENZIE, A. L.; BYRNE, P. O. Can photography be used to measure isodose distributions of space irradiance for laser photodynamic therapy? **Physics and Medicine in Biology**, v. 33, n. 1, p. 113, 1988.
56. CUBEDDU, R. Absorption spectrum of hematoporphyrin derivative in vivo in a murine tumor model. **Photochemistry and Photobiology**, v. 60, n. 6, p. 582–585, 1996.
57. MADSEN, S. J.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. The use of India ink as an optical absorber in tissue-simulating phantoms. **Physics and Medicine in Biology**, v. 37, n. 4, p. 985, 1992.
58. CUBEDDU, R. et al. A solid tissue phantom for photon migration studies. **Physics and Medicine in Biology**, v. 42, n. 10, p. 1971-1979, 1997.
59. VAN GEMERT, M. J. C. et al. Skin optics. **IEEE Transactions On Biomedical Engineering**, v. 36, n. 12, p. 1146-1154, 1989.
60. EISENHAEUER, J. G. Regression through the origin. **Teaching Statistics**, v. 25, n. 3, p. 76-80, 2003.
61. VALENTINE, R. M. Monte Carlo simulations for optimal light delivery in photodynamic therapy of non-melanoma skin cancer. **Physics and Medicine in Biology**, v. 57, n. 20, p. 6327-6327, 2012.
62. VARDAXIS, N. J. et al. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: Implications for human wound healing studies. **Journal of Anatomy**, v. 190, n. 4, p. 601–611, 1997.
63. ROSS, E. V. Comparison of carbon dioxide laser, erbium:YAG laser, dermabrasion, and dermatome, A study of thermal damage, wound contraction, and wound healing in a live pig model: Implications for skin resurfacing. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 1, p. 92–105, 2000.
64. LEKNER, J.; DORF, M. C. Why some things are darker when wet. **Applied Optics**, v. 27, n. 7, p. 1278- 1280, 1988.

65. SABINO, L. G. et al. Experimental evidence and model explanation for cell population characteristics modification when applying sequential photodynamic therapy. **Laser Physics Letters**, v. 8, n. 3, p. 239-246, 2011.
66. LINDBERG-LARSEN, R.; SOLVSTEN, H.; KRAGBALLE, K. Evaluation of recurrence after photodynamic therapy with topical methylaminolaevulinate for 157 basal cell carcinomas in 90 patients. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 92, n. 2, p. 144-147, 2012.
67. RAMIREZ, D. P et al. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: preliminary results of a national Brazilian project. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 1, p. 22-26, 2014.
68. LISTER, T.; WRIGHT, P. A.; CHAPPELL, P. H. Optical properties of human skin. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 9, p. 0909011-09090115, 2012.
69. BOLIN, F. P. Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method. **Applied Optics**, v. 28, n. 12, p. 2297-2303, 1989.
70. LU, J. Q.; HU, X. H.; DONG, K. Modeling of the rough-interface effect on a converging light beam propagating in a skin tissue phantom. **Applied Optics**, v. 39, n. 31, p. 5890-5897, 2000.
71. CHURMAKOV, D. Y.; MEGLINSKI, I. V.; GREENHALGH, D. A. Amending of fluorescence sensor signal localization in human skin by matching of the refractive index. **Journal of Biomedical Optics**, v. 9, n. 2, p. 339-346, 2004.
72. BUDWIG, R. Refractive index matching methods for liquid flow investigations. **Experiments in Fluids**, v. 17, n. 5, p. 350-355, 1994.
73. VOLLET-FILHO, J. et al. Correlation between photosensitizer degradation and depth of necrosis in PDT: possibility for real time dosimetry. **Lasers in Surgery and Medicine**, n. 24, p. 9, 2008. 28th Annual Conference of the American-Society-for-Laser-Medicine and Surgery, 2008.
74. FAY, L. INTRAcel skin rejuvenation system. 2014. Disponível em: <http://cosmeticdoctor.ie/skin-treatments/intracel-skin-rejuvenation-system>>. Acesso em: 16 jul. 2014.
75. HUANG, Y.Y.; ARON, C. H. C. A. ;HAMBLIN, M. Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm, **SPIE Newsroom**, v. 10, n. 2, p. 1669-1669, 2009.
76. COLGATE-PALMOLIVE CO. Evgueni E. Pashkovski et al. **Fragrance-containing gel for delivering fragrance from structured liquid detergent compositions**. US 6562770 B2, 27 mar. 2001, 13 maio 2003.
77. WATSON, T. **Key concepts in electrotherapy**. 2014. Disponível em: <http://www.electrotherapy.org/modality/key-concepts-in-electrotherapy>>. Acesso em: 22 mar. 2013.

78. MELANOMA. 2014. Disponível em:
<http://www.patientresource.com/Melanoma_Staging.aspx>. Acesso em: 17 jan.
2013.
79. FERREIRA, J. C. et al. **Islands of surviving cells within necrotic volume at liver induced by PDT**. Seattle: SPIE, 2009. (SPIE, 7380).