UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR EM
TECIDO HEPÁTICO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E
SUA IMPORTÂNCIA NA TERAPIA FOTODINÂMICA**

José Dirceu Vollet Filho

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Tit. Vanderlei
Salvador Bagnato

São Carlos
2007

Vollet Filho, José Dirceu

Identificação e quantificação de fotossensibilizador em tecido hepático por espectroscopia de fluorescência e sua importância na Terapia Fotodinâmica / José Dirceu Vollet Filho.—São Carlos, 2007

95 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Tit. Vanderlei Salvador Bagnato

1. Espectroscopia de Fluorescência. 2. Terapia Fotodinâmica
3. Fotossensibilizador. I. Título.

Dedico este trabalho à minha família, por me fazer uma pessoa FELIZ, por me dar condições de ser melhor a cada dia, e porque sem seu apoio, amor, carinho e paciência, este trabalho nunca teria sido realizado.

Meu muito obrigado a vocês, de todo o meu coração! Eu os amo muito!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Bem Maior, a Vida, e porque em sua Infinita Bondade me permitiu ver além dos olhos e encontrar razões e meios para levar adiante a tarefa à qual escolhi dedicar minha vida.

Aos meus pais, Sandra Maria e José Dirceu, pelo seu amor, pelo carinho, pelas lições de vida, pela preocupação comigo, pela paciência nas minhas presenças e ausências, pelo sempre presente desejo de me ver bem e pelo apoio incondicional em todas as escolhas que eu fiz na vida. Muito obrigado! Amo vocês!

À minha irmã Aline, pelo carinho e amor, pela paciência comigo e por, sem perceber, me ajudar a aprender sobre mim mesmo e a ser uma pessoa melhor! Amo você! Obrigado!

À Isabel e Thiago, por em tão pouco tempo se tornarem tão queridos em minha vida e na nossa família, ao passarem a fazer parte dela. Obrigado pelo carinho!

À minha avó Ana e aos meus tios(as) e primos(as), pelo carinho e pela torcida constantes pelo meu sucesso, e aos meus avós João, Antenor e Maria, pelo que representaram e representam para mim, ontem, hoje e sempre. Obrigado!

Ao João Sérgio e ao Alexandre, com quem dividi o teto e todos os períodos bons e ruins dos últimos dois anos... Obrigado!

Aos amigos (muitos, graças a Deus) que se fizeram presença constante em minha vida ainda que à distância, sendo apoio e ânimo em todos os momentos. Não os enuncio um a um para não cometer injustiças ao não citar alguém, mas vocês sabem quem são! Obrigado a vocês!

Aos professores, funcionários e técnicos do Grupo de Óptica e do Instituto de Física de São Carlos, pela atenção dispensada, pelo auxílio e ensino em tarefas diversas. Obrigado!

Às secretárias do Grupo de Óptica, Isabel e Benê, pela atenção, carinho, pelo auxílio com os muitos encargos administrativos e por estarem sempre dispostas a ajudar. Obrigado!

Aos amigos dos laboratórios LIEPO, LAT e da Atômica, por me auxiliarem nas dificuldades técnicas (que foram muitas!) e pela amizade dedicada. Obrigado!

Aos amigos queridos do Laboratório de Biofotônica, onde este trabalho foi desenvolvido: Alessandra, Augusto, Clóvis, Cristina, Denis, Emery, Eurico, Everton, Fernando, Jeison, Jucaíra, Juliana, Karina, Lílian, Marcela, Maristela, Mardoqueu, Mônica, Priscila, Rosane, Ruy, Vitória, Wilma e Zé Bulhões, que acompanharam meu trabalho, auxiliando-me de várias formas e em várias etapas, e demonstraram seu apoio, carinho e paciência sempre, tornando melhores os muitos os dias e noites de trabalho dos últimos dois anos. Obrigado, pessoal!

Dentre os últimos, devo especiais agradecimentos:

- ao amigo *Clóvis Grecco*, pela paciência, boa-vontade e sempre presente disposição em me auxiliar em todos os procedimentos experimentais e no aprendizado sobre o uso e cuidado dos equipamentos e do espaço de trabalho. Muito obrigado Clóvis!

- ao amigo *Emery Lins*, pelo auxílio e pelas discussões quanto a etapas da parte experimental, pelas conversas sobre conhecimentos de Física, Matemática e Computação e pelo auxílio ao lidar com os mesmos. Muito obrigado Merê!

- à amiga *Juliana Ferreira*, por ter me auxiliado a planejar, realizar, analisar e compreender várias das etapas experimentais, ensinando-me muito sobre a TFD e trabalhando vários dias (e algumas noites!) comigo para tanto. Muito obrigado Ju!

- à amiga *Lilian Tan Moriyama*, pelas produtivas discussões e por seu empenho incansável ao me auxiliar a corrigir e a melhorar a versão final deste texto (além de, claro, pelas ilustrações, muito melhores que as minhas!). Muito obrigado Lili!

- ao amigo *Mardoqueu Martins*, por me ensinar a utilizar recursos que agilizaram o processamento dos meus dados e pelas rotinas elaboradas. Muito obrigado Mardô!

- à amiga *Mônica Caracanhas*, porque sua disposição, criteriosidade, e trabalho duro foram contribuição fundamental em todas as etapas deste trabalho. Sem você, este trabalho certamente não seria possível. Muito obrigado Moniquinha!

- à amiga *Cristina Kurachi*, cujos conhecimentos, paciência, apoio, auxílio e amizade foram essenciais em todos os momentos desse trabalho, me ensinando sobre a seriedade da pesquisa, sobre a espectroscopia de fluorescência e me ajudando desde a elaboração inicial, realização e interpretação dos experimentos, até as últimas discussões e conclusões do trabalho, mesmo que à distância. Muito obrigado Cris!

Aos professores Hidetake Imasato (IQSC-USP), Orlando de Castro-e-Silva Jr e Ajith Kumar Sankarankutty (FMRP-USP), pela contribuição com colocações, discussões e sugestões durante o julgamento desta dissertação. Obrigado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro por meio de bolsa (CAPES) e do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF – programa CePID/ FAPESP).

E, por fim, mas não menos importante, ao meu orientador Vanderlei Salvador Bagnato, pelos muitos conhecimentos transmitidos, por seu entusiasmo contagiante, por sua vontade, persistência, paciência e confiança desde o início, que serviram de ânimo e de apoio durante as dificuldades encontradas ao longo deste trabalho. Seu empenho em fazer da ciência um meio para se alcançar uma sociedade melhor, ao invés de um fim por si só, é um exemplo a ser seguido. Muito obrigado Vanderlei!

Sumário

Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas ou Siglas	viii
Lista de Símbolos.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Objetivos.....</i>	<i>10</i>
2. Composição do espectro de fígado de ratos Wistar a partir dos espectros de seus fluoróforos endógenos.....	12
2.1. <i>Objetivos.....</i>	<i>12</i>
2.2. <i>Metodologia.....</i>	<i>13</i>
2.2.1. <i>Sistema para espectroscopia de fluorescência</i>	<i>13</i>
2.2.2. <i>Uso de Animais</i>	<i>15</i>
2.2.3. <i>Espectros de fluorescência das substâncias endógenas</i>	<i>16</i>
2.3. <i>Resultados e Discussão</i>	<i>20</i>
2.4. <i>Conclusões.....</i>	<i>23</i>
3. Estudo da fluorescência de fluoróforos isolados <i>in vitro</i> e da recuperação desta em meios turvos.....	24
3.1. <i>Objetivos.....</i>	<i>24</i>
3.2. <i>Metodologia.....</i>	<i>26</i>
3.2.1. <i>Sistema de espectroscopia de fluorescência</i>	<i>26</i>
3.2.2. <i>Uso de Animais</i>	<i>26</i>
3.2.3. <i>Obtenção dos espectros dos corantes in vitro</i>	<i>26</i>
3.2.4. <i>Avaliação da presença dos corantes em fígado de ratos Wistar sadios</i>	<i>29</i>
3.2.5. <i>Avaliação da fluorescência dos corantes para laser em tecido hepático macerado.....</i>	<i>29</i>
3.3. <i>Resultados e Discussão</i>	<i>31</i>
3.3.1. <i>Espectros de fluorescência dos corantes in vitro.....</i>	<i>31</i>
3.4. <i>Conclusões.....</i>	<i>57</i>
4. Avaliação da distribuição de fotossensibilizador em tecido hepático sadio através da espectroscopia de fluorescência.....	59
4.1. <i>Objetivos.....</i>	<i>59</i>
4.2. <i>Metodologia.....</i>	<i>60</i>
4.2.1. <i>Sistema para espectroscopia de fluorescência</i>	<i>60</i>
4.2.2. <i>Uso de Animais</i>	<i>60</i>
4.2.3. <i>Correlação entre fluorescência e quantidade de FS em variadas regiões do fígado</i>	<i>61</i>
4.2.4. <i>Correlação entre quantidade ou distribuição de FS e as profundidades de necrose</i>	<i>64</i>
4.2.5. <i>Modelo para correlação profundidade de necrose (Y_{nec}) - concentração</i>	<i>66</i>
4.3. <i>Resultados e Discussão</i>	<i>70</i>
4.3.1. <i>Obtenção dos espectros de fluorescência no fígado</i>	<i>70</i>

4.3.2. <i>Profundidades de necrose e sua relação com a fluorescência</i>	75
4.3.3. <i>Proposição de ajuste ao modelo</i>	80
4.4. <i>Conclusões</i>	87
5. Conclusões Gerais	89
ANEXO	92
Bibliografia	93

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema do sistema de diagnóstico “Spectr-Cluster”. Na figura pode-se observar o caminho da luz de excitação e da luz coletada, bem como a forma como se distribuem as fibras de excitação e coleta na extremidade de investigação da sonda.	13
Figura 2: Representação do tratamento dos espectros de emissão de fluorescência para obtenção dos coeficientes de contribuição, de forma a se obter seus respectivos coeficientes de contribuição para o espectro do tecido hepático. (a) e (b): Demonstração da idéia original da obtenção dos coeficientes. (c) Tratamento dos dados para viabilizar o cálculo para a obtenção dos coeficientes.	18
Figura 3: Recuperação dos espectros a partir de cada conjunto de coeficientes C#.	20
Figura 4: Espectro de autofluorescência (AF) obtido do fígado de ratos Wistar sadios com excitação em 442 nm e a recuperação de um espectro a partir da média dos coeficientes C#.	21
Figura 5: Espectros de fluorescência do Eagle para as excitações em 442 nm (esquerda) e 532 nm (direita).	31
Figura 6: Espectros de fluorescência com excitação em 442 nm para a anilina vermelha em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.	32
Figura 7: Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm para a anilina vermelha em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.	32
Figura 8: Espectros de fluorescência com excitação em 442 nm para a anilina verde em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.	33
Figura 9: Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm para a anilina verde em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.	33
Figura 10: Espectros de fluorescência com excitação em 442 nm para a anilina azul em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.	34
Figura 11: Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm para a anilina azul em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.	34
Figura 12: Espectros de fluorescência da mistura das anilinas vermelha e verde ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 1:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).	39
Figura 13: Espectros de fluorescência da mistura das anilinas vermelha e verde ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 4:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).	39
Figura 14: Espectros de fluorescência da mistura das anilinas vermelha e verde ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 1:4 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).	40
Figura 15: Espectro de fluorescência da mistura das anilinas azul e vermelha ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 1:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).	40

Figura 16: Espectro de fluorescência da mistura das anilinas azul e vermelha ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 4:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).	41
Figura 17: Espectro de fluorescência da mistura das anilinas azul e vermelha ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 4:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).	41
Figura 18: Espectros de Fluorescência do LDS ($\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$) em soluções de metanol, metanol com Eagle e metanol com sangue.	44
Figura 19: Espectros de Fluorescência do Coumarin ($\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$) em soluções de metanol, metanol com Eagle e metanol com sangue.....	44
Figura 20: Espectro de fluorescência da mistura de LDS e Coumarin ($\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$) em proporção 1:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).	46
Figura 21: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$. Verifica-se uma diminuição na intensidade de fluorescência como um todo.	48
Figura 22: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$. Verifica-se um aumento na intensidade de fluorescência como um todo.....	49
Figura 23: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina vermelha e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$	49
Figura 24: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina vermelha e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$	50
Figura 25: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina verde e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$	50
Figura 26: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina verde e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$	51
Figura 27: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina azul e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$	51
Figura 28: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina azul e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$	52
Figura 29: : Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução de LDS em metanol e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$, bem como a emissão da solução isoladamente.	52
Figura 30: Fluorescência do corante LDS ($\lambda_{ex}=442 \text{ nm}$) em solução de metanol e Eagle na mistura envolvendo macerado de tecido hepático.	55
Figura 31: Fluorescência do corante Coumarin ($\lambda_{ex}=442 \text{ nm}$) em solução de metanol e Eagle na mistura envolvendo macerado de tecido hepático.	55
Figura 32: Esquema dos cortes e dos pontos para os quais foi obtida a fluorescência ao longo do fígado do animal. (a) As linhas verticais representam os cortes para a obtenção das fatias A, B, C... M, N, O; (b) representação dos eixos dos eixos seguidos ao longo do fígado para obtenção das medidas em seu interior em uma fatia; (c) representação dos pontos em que se obtiveram as medidas para a avaliação pela superfície do fígado.	62
Figura 33: Espectros de fluorescência do Photogem [®] in vitro e in vivo (excitação em 532 nm). O pico do FS in vitro apresenta seu primeiro máximo em 613 nm, enquanto in vivo apresenta-o em 619 nm, e o segundo em 675 nm, ou 683 nm in vivo.....	63

Figura 34: <i>Perfil gaussiano do feixe do laser para uma intensidade com máximo de 158 mW/cm².</i>	64
Figura 35: <i>Esquema da iluminação para obtenção das necroses no fígado. (a) animal 1; (b) animal 2; (c) animal 3. As regiões em vermelho correspondem às necroses, e os detalhes abaixo das figuras correspondem a cortes nas linhas cinzas traçadas.</i>	65
Figura 36: <i>(a) Esquema demonstrando a diminuição da intensidade de luz (dose D) como função da penetração (y); (b) representação esquemática da profundidade de necrose Y_{nec}, onde D é a luz incidente e Y_{nec} a linha observada e medida nas lâminas histológicas, delimitando a fronteira entre o tecido necrosado e sadio.</i>	67
Figura 37: <i>Exemplo da subtração da AF de um espectro. Na figura, verifica-se o espectro do tecido hepático na fatia A, no eixo central com sua AF, a própria AF deste ponto e a fluorescência do ponto depois de descontada a AF.</i>	70
Figura 38: <i>Curva de nível com base nos máximos de emissão, representando a distribuição de FS no tecido hepático. Os eixos 1, 2 e 3 são, respectivamente, os eixos denominados Inferior, Central e Superior, e posições das fatias são equivalentes a 1=A, 2=B, 3=C, 4=D, 5=E, 6=F, 7=G, 8=H, 9=I, 10=J, 11=K, 12=L, 13=M, 14=N e 15=O.</i>	71
Figura 39: <i>Máximos de fluorescência medidos ao longo do eixo Superior no interior do fígado. Verifica-se que o máximo de emissão encontra-se na região onde a veia cava chega ao fígado próximo às fatias H e I, e que há dois máximos entre as regiões centrais e as extremidades de cada lobo (fatias C e N).</i>	71
Figura 40: <i>Máximos de fluorescência medidos ao longo do eixo Central no interior do fígado. O máximo de emissão encontra-se na região onde a veia cava chega ao fígado (próximo às fatias H e I), e segundo a curva estimada há dois máximos nas regiões centrais dos lobos (fatias C e L).</i>	72
Figura 41: <i>Máximos de fluorescência medidos ao longo do eixo Inferior no interior do fígado. O máximo de emissão encontra-se na região onde a veia cava chega ao fígado (próximo às fatias H e I), não apresentando os máximos próximos ao centro dos lobos como os outros eixos.</i>	72
Figura 42: <i>Máximos de fluorescência medidos ao longo do eixo Central na superfície do fígado. O máximo de emissão encontra-se na região onde a veia cava chega ao fígado (próximo à fatia I), com máximos por volta das regiões das fatias D e L.</i>	73
Figura 43: <i>Curvas para a concentração estimada de FS ao longo do eixo superior, obtida pela relação direta com a intensidade de fluorescência observada.</i>	74
Figura 44: <i>Curvas para a concentração estimada de FS ao longo do eixo central, obtida pela relação direta com a intensidade de fluorescência observada.</i>	74
Figura 45: <i>Curvas para a concentração estimada de FS ao longo do eixo inferior, obtida pela relação direta com a intensidade de fluorescência observada.</i>	75
Figura 46: <i>Perfil de necrose obtido para as medidas de Y_{nec} no animal 1.</i>	76
Figura 47: <i>Máximos do primeiro pico de fluorescência para pontos afastados de 3 mm uns dos outros no interior da área iluminada do animal 1. A pouca variação na concentração dentro da mesma área está dentro do erro, do que se pode inferir a uniformidade da concentração nesta região.</i>	77

- Figura 48: *Perfil de necrose obtido para as medidas de Y_{nec} no animal 2. Nos perfis, as linhas horizontais apontam os valores médios das necroses, evidenciando a variação entre as necroses em cada região.*..... 78
- Figura 49: *Perfil de necrose obtido para as medidas de Y_{nec} no animal 3. Nos perfis, as linhas horizontais apontam os valores médios das necroses, evidenciando a variação entre as necroses em cada região.*..... 78
- Figura 50: *Máximos do primeiro pico de fluorescência do FS no fígado para o animal 2, nos pontos medial e distal do lobo esquerdo do fígado, com as linhas horizontais apontando as respectivas médias de intensidade. É clara a diferença de intensidade de fluorescência entre ambas as regiões.*..... 79
- Figura 51: *Perfil de necrose previsto através da função do modelo Y_{nec} para $C(x) = \text{constante} = 1,5 \text{ mg/kg}$ para uma área iluminada de 1 cm^2 .*..... 81
- Figura 52: *Pontos para $C(x)$ a partir da Equação (15) e a função estimada para a concentração – a qual trata-se de um polinômio de grau 5.* 83
- Figura 53: *Gráfico comparando as Y_{nec} : os pontos pretos são os valores medidos para a profundidade de necrose de uma lâmina observada, os pontos azuis representam a aplicação do modelo para uma concentração constante $C=1,5 \text{ mg/kg}$ de massa corpórea, e os pontos vermelhos representam a previsão da necrose para a função $C(x)$ obtida com base na informação de que $C(x)$ não é constante.*..... 84
- Figura 54: *Absorção da luz pelo vaso sanguíneo. A região branca no centro é um feixe circular de luz vermelha (630 nm) focado sobre um vaso sanguíneo presente numa peça de tecido humano. Os gráficos acima e à direita representam, em escalas arbitrárias, a intensidade de luz captada pela câmera nas linhas que interceptam o vaso na figura.*..... 85

Lista de Tabelas

Tabela 1: Coeficientes C_i para as misturas verde/vermelha.....	42
Tabela 2: Coeficientes C_i para as misturas azul/vermelha.....	42
Tabela 3: Coeficientes C_i para a mistura LDS e Coumarin	47

Lista de Abreviaturas ou Siglas

TFD – Terapia Fotodinâmica

FS – fotossensibilizador

J – Joule

mm - milímetro

μm – micrômetro

nm – nanômetro

mg – miligrama

kg – quilograma

s – segundo

(m)W – (mili)Watt

EEM – *Excitation-Emission Matrices* (matrizes de excitação-emissão)

Y_{nec} – profundidade de necrose

Lista de Símbolos

λ – Comprimento de onda

λ_{ex} – Comprimento de onda de excitação

λ_{em} – Comprimento do onda de emissão

$M\#, E\#, C\#$ – representações genéricas das matrizes $M1-M5$, $E1-E5$ e $C1-C5$, respectivamente.

C – Concentração do fotossensibilizador

D – Dose ou fluência de luz

D_0 – Máximo da dose de luz na superfície do tecido

D_{th} – Dose limiar de luz (dose mínima para obtenção da necrose)

γ – Coeficiente de atenuação da luz no tecido

μ_s – Coeficiente de espalhamento da luz no tecido

μ_a – Coeficiente de absorção da luz no tecido

μ_{ao} – Coeficiente de absorção da luz do tecido devido ao próprio tecido

α – coeficiente de contribuição do fotossensibilizador para a absorção da luz

A – parâmetro que relaciona a dose limiar e a concentração do fotossensibilizador

δ_0 – parâmetro que determina o coeficiente de espalhamento μ_s

β – parâmetro que relaciona o parâmetro δ_0 e o coeficiente de contribuição do fotossensibilizador α

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica que provoca dano celular pela ação de um fotossensibilizador (FS), com seletividade de localização em tecido tumoral; a luz que, absorvida pelo FS, leva-o a um estado tripleto metaestável; e oxigênio molecular, o qual recebe a energia absorvida pelo FS, passando a um estado singlete de alta capacidade oxidativa. A técnica é bem sucedida no tratamento de lesões como câncer, mas enfrenta, entretanto, dificuldades para a determinação de sua dosimetria. Uma delas é a quantificação da distribuição do FS no tecido tratado. Este trabalho tem três objetivos: a obtenção de informação quantitativa por espectros de fluorescência de fluoróforos em meios turvos; a demonstração da distribuição do FS Photogem[®] em fígados saudáveis de ratos Wistar e suas implicações na dosimetria; e a melhoria de um dos modelos existentes para previsão da profundidade de necrose (Y_{nec}), importante parâmetro no estudo da TFD. Realizaram-se os experimentos em três fases: na primeira, tentou-se reconstruir o espectro do fígado sadio a partir de uma composição de espectros isolados de fluoróforos endógenos do fígado. Na segunda, realizaram-se estudos com corantes alimentícios Coralim-Mix[®] nas cores azul, verde e vermelho e com corantes Exciton[®] (Coumarin-480 e LDS-722) *in vitro* e *in vivo*, visando identificar os espectros dos corantes em misturas com meios turvos e entre eles. Na terceira, aplicou-se Photogem[®] em ratos Wistar e se coletou a fluorescência do FS nos fígados, relacionando-se a variação na intensidade de fluorescência com a concentração de FS presente e com perfis de necrose obtidos por TFD. Aplicou-se, por fim, os resultados obtidos na melhoria do modelo para previsão da Y_{nec} . A reconstrução dos espectros não foi bem sucedida, tal qual a recuperação dos espectros dos corantes. Os resultados mostraram que muitos fatores contribuem para a distorção da fluorescência coletada, e que a informação obtida é prejudicada se estes forem ignorados. Verificou-se que a distribuição do FS não é homogênea num órgão fotossensibilizado. Obteve-se uma função para distribuição do FS no tecido e, através dela, foi possível melhorar o modelo para a previsão da Y_{nec} . Observou-se que a turbidez do meio afeta de maneira complexa a coleta de fluorescência, criando obstáculos para a quantificação direta de fluoróforos nele inseridos. Fica evidente a necessidade do aprofundamento dos estudos sobre a interação da luz com as partículas dos meios turvos para remover as distorções geradas por estas. Demonstrou-se ainda a importância do mapeamento da distribuição do FS num tecido fotossensibilizado como parte da dosimetria da TFD, e que a espectroscopia de fluorescência é forte candidata à técnica mais apropriada para este mapeamento, desde que dominados os obstáculos à coleta de fluorescência.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a technique that implies in cell damage by the action of a photosensitizer (PS) with tumor tissue localization selectivity; light at PS absorption spectrum wavelengths, which leads the PS to a metastable triplet state; and molecular oxygen, which earns the energy absorbed by the PS, reaching a high oxidative potential singlet state. The technique has found success on the treatment of lesions as cancer. However, it finds difficulties for its dosimetry establishment, like the quantification of PS distribution in a photosensitized tissue. This work has three purposes: obtainance of fluorophores quantitative information into turbid media through fluorescence spectroscopy; to show the distribution of the PS Photogem[®] in healthy Wistar rats' livers and its consequences on dosimetry; and the upgrade of an existing model for depth of necrosis (Y_{nec}) forecast. There were three experimental stages: the first one was an attempt to rebuild a healthy liver spectrum from a composition using mathematical weights for isolate liver endogenous fluorophores spectra. On the second stage, *in vitro* and *in vivo* studies were performed using Coralim-Mix[®] blue, green and red food dyes and the Exciton[®] dyes Coumarin-480 and LDS-722, aiming to recover dyes spectra from dyes in turbid solutions and dyes mixtures. On the third one, Photogem[®] was administered to Wistar rats and fluorescence was collected on rats' livers, and a relationship was established between the changes on fluorescence intensity, PS concentration in the tissue and necrosis profiles obtained via PDT. Results were applied to the upgrade of the Y_{nec} forecast model. Spectra rebuilding, as well as dyes spectra recovering, were not completely reached. Results showed that a great deal of factors contribute to distortions at the collected fluorescence. It was verified that PS distribution is inhomogeneous in a photosensitized organ. It was found a function for the PS tissue distribution and it made possible to upgrade the Y_{nec} forecast model. It was showed that medium turbidity affects in a complex manner the collected fluorescence, making difficult to quantify directly fluorophores in such medium. A need to go deeper into the investigation of light interactions with turbid media so that we may remove distortions they introduce into fluorescence spectra became evident. It was also showed how important is to track PS distribution in a photosensitized tissue as a part of PDT dosimetry, and how fluorescence spectroscopy seems to be appropriate to perform such tracking, as long as the difficulties on fluorescence collection are overcome.

1. Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica que provoca dano celular por meio de três elementos-chave: um *fotosensibilizador* (FS), com seletividade de localização em tecido tumoral; a *luz*, em comprimentos de onda equivalentes ao espectro de absorção do FS, que a absorve alcançando um estado eletrônico metaestável (triplete); e o *oxigênio molecular*, ao qual as moléculas do FS transferem a energia absorvida por um processo de transição não-radiativa, fazendo-o passar a um estado singlete de capacidade oxidativa muito alta. Assim, a célula fotossensibilizada, com oxigênio suficiente e sob luz de comprimento de onda adequado, sofre dano. Se a concentração de oxigênio e de FS alcançarem níveis limiares sob uma intensidade de luz adequada, ocorre a morte celular [1-5].

A técnica tem sido utilizada cada vez mais freqüentemente para o tratamento de lesões neoplásicas [6-11], devido à afinidade que determinados FS apresentam com as células tumorais [3, 12]. Esta seletividade é refletida pelo fato destes reterem mais o FS quando as células sadias já eliminaram seu excesso. Os tratamentos oncológicos tradicionais envolvem eliminação do tumor por vias mecânica, química ou por radiação ionizante – cirurgia, quimioterapia ou radioterapia, respectivamente. Entretanto, apesar da eficiência que estes tratamentos evidenciam, em inúmeros casos eles demonstram variadas limitações. Para estas situações, a cirurgia radical era

a única opção, a qual, no entanto, pode resultar no comprometimento da função e/ou anatomia do órgão ou região restante do mesmo. Portanto, devido à citada afinidade dos FS pelas células tumorais, a TFD tem se mostrado uma nova alternativa de tratamento.

Apesar da TFD já ter alcançado relativo sucesso, ainda há limitações sérias a serem superadas. Os estudos de dosimetria mais relevantes em TFD são os que levam em conta: 1) a *distribuição da luz* utilizada para excitar a molécula do FS no tecido (as variadas estruturas e composições teciduais alteram a forma como a luz se propaga, modificando o perfil inicialmente previsto para a iluminação, de forma que a quantidade de luz necessária pode não ser atingida em determinados pontos), 2) a *oxigenação do tecido* a ser tratado e o consumo do oxigênio (a quantidade de oxigênio presente no tecido determinará a eficiência do “mecanismo do oxigênio”, ou seja, da produção do oxigênio singlete e, portanto, da intensidade de dano celular), e 3) a *variação da concentração do FS* no tecido fotossensibilizado (a concentração de FS determina a intensidade de luz que deve chegar a uma dada região do tecido para que ocorra efeito fotodinâmico de maneira suficiente para causar a morte do tecido tumoral).

Atualmente, não existe padronização para os protocolos clínicos quanto aos parâmetros de dose* e de concentração de FS. Dessa forma, para lesões variadas, em diferentes pacientes e regiões anatômicas, não há padronização para as quantidades de FS, injetado conforme a massa corporal, de luz ou para os intervalos entre fotossensibilização e iluminação.

No entanto, o uso dos mesmos valores para cada um destes parâmetros leva a respostas individuais diferentes. Isto ocorre por motivos variados, como o

*Para a TFD, *dose* é a fluência de luz, ou a distribuição superficial da energia luminosa irradiada sobre o tecido.

metabolismo de cada indivíduo e a diferente estrutura e composição dos tecidos e lesões tratados. Os tempos necessários para a distribuição e o acúmulo do FS em diferentes órgãos são distintos, assim como também são encontradas variações entre os indivíduos. Acredita-se que o ideal é a individualização da dosimetria para cada paciente/lesão a serem tratados.

As características clínicas da lesão – como a vascularização, a coloração e o volume – são importantes fatores com influência na interação entre luz e tecido biológico. A vascularização, por exemplo, determina a quantidade de hemoglobina (que absorve intensamente a luz em determinadas regiões do espectro visível) e de oxigênio molecular (supressor de fluorescência) na região da lesão, enquanto regiões com coloração mais escura indicam a presença de maior quantidade de elementos absorvedores e, portanto, maior absorção da luz incidente. Por isso, devem ser considerados na determinação e planejamento dos parâmetros de iluminação. Outro fator que, em condições ideais, deveria também ser considerado é o tipo celular do tumor, uma vez que diferentes graus de susceptibilidade à TFD podem ser encontrados em linhagens distintas de células [13, 14].

Estas diferenças na resposta refletem-se na *profundidade de necrose* (Y_{nec}), parâmetro que determina a espessura de tecido necrosado a partir da superfície irradiada. Este parâmetro dá idéia da extensão do efeito fotodinâmico em um determinado tecido fotossensibilizado e irradiado. Por isso, uma vez que se consiga individualizar a dosimetria através do conhecimento da distribuição de luz no tecido sadio e alterado, da forma com que o FS distribui-se no tecido e de como isso influencia a absorção da luz, e da forma com que a dinâmica da oxigenação e do mecanismo de oxigênio ocorrem no tecido alterado, será possível prever com maior precisão a Y_{nec} e, portanto, a extensão dos efeitos fotodinâmicos letais objetivados no

tecido alvo. Isto permitirá produzir necrose mais controlada. Esta individualização, portanto, aumentará as chances de sucesso do tratamento, contribuindo para o uso amplo da TFD como técnica de combate a lesões neoplásicas.

Como se pode ver, o principal propósito nos estudos da TFD não é simplesmente medir os parâmetros já citados (luz, oxigênio e FS), mas desenvolver a capacidade de monitorá-los. Da mesma forma, é necessário otimizar com relação à aplicação da terapia os parâmetros passíveis de serem modificados, como a forma de iluminação para obtenção da distribuição de luz desejada no tecido e o tempo de espera para a aplicação da terapia após a administração do FS, de forma a se trabalhar o mais próximo possível de seu máximo de concentração no tecido em questão. É preciso ainda relacionar estes parâmetros, bem como os instrumentos utilizados na aplicação da terapia, às condições clínicas, através do desenvolvimento, particularização e otimização de protocolos clínicos para a aplicação da TFD.

A motivação principal deste trabalho, portanto, é a melhoria da TFD através do desenvolvimento da dosimetria para esta. Este desenvolvimento envolve a compreensão da forma como a efetividade da terapia depende não só da distribuição espacial da luz, mas também do FS. De posse deste conhecimento, será possível obter melhorias na previsão do efeito fotodinâmico no tecido e, portanto, nos protocolos clínicos para a TFD.

Para o estudo da distribuição de FS em tecidos fotossensibilizados, foco deste trabalho, uma das técnicas que se apresenta mais interessante (em especial quando se considera seu uso nas condições clínicas) é a *espectroscopia de fluorescência*. A espectroscopia de fluorescência é baseada na detecção dos fótons emitidos por espécies fluorescentes quando excitadas a partir de uma fonte de fótons de energia bem conhecida (em geral um *laser*, devido a uma de suas principais características: a

monocromaticidade – característica de uma fonte que emite de fótons de comprimento de onda bem determinado). Ela tem sido apontada como técnica alternativa para a diferenciação óptica de tecidos biológicos e para a identificação de alterações metabólicas em tecidos, bem como para um diagnóstico auxiliar para vários tipos de lesões [15-20].

Para explicar o funcionamento da técnica de espectroscopia de fluorescência e as vantagens de seu uso neste trabalho (e nas aplicações clínicas da TFD), segue uma rápida explicação sobre os tipos de *luminescência* (a emissão de fótons a partir de estados eletrônicos excitados), da qual a fluorescência é uma das formas.

Dependendo da natureza do estado fundamental e dos estados excitados de uma molécula, o processo de emissão de luz recebe diferentes denominações. Num estado excitado singlete, o elétron no orbital de maior energia tem orientação de *spin* diferente da do elétron no orbital de menor energia – eles são ditos desemparelhados ($S = 0$). Num estado tripleto, os elétrons estão emparelhados, o que significa que eles têm a mesma orientação de *spin* ($S = 1$). A conversão para um estado fundamental não exige alteração na orientação de *spin*, mas ela é necessária para uma transição entre um estado singlete e um tripleto ou vice-versa. A fluorescência é o fenômeno de emissão de fóton por meio de uma transição radiativa entre estados de mesma multiplicidade de *spin* (elétrons emparelhados ou desemparelhados em ambos os níveis de energia), e a fosforescência a emissão a partir de transição para o estado fundamental de elétrons entre estados de diferente multiplicidade (geralmente transitando de tripletos para singletos). Transições do tipo das que ocorrem na fluorescência são “permitidas” pelas regras de seleção da mecânica quântica (ou seja, tem alta probabilidade de ocorrerem), e têm altas taxas de emissão – da ordem de 10^8 s^{-1} – que resultam em tempos de vida (tempo médio de existência dos estados

excitados) da ordem de 10 ns. Já as transições que geram a fosforescência são “proibidas” pelas regras de seleção (ou seja, pouco prováveis de acontecerem) e, portanto, apresentam baixas taxas de emissão – taxas essas cujas ordens variam de milissegundos a segundos. [20, 21]

As moléculas em estados excitados que surgem devido à absorção de um fóton são pouco estáveis energeticamente, e por isso tendem a liberar a energia absorvida novamente na forma dos fótons. Em gases sob condições de baixa pressão e temperatura, onde a interação das moléculas é relativamente pequena, esses fótons liberados tendem a ter a mesma energia (e, portanto, o mesmo comprimento de onda) dos fótons que provocaram a excitação da molécula, fenômeno que recebe o nome de *fluorescência ressonante*. Ela não acontece, entretanto, em condições de pressão ou temperatura mais elevadas, nem em sólidos e líquidos, pois a interação vibracional entre as moléculas nestes meios e condições (que dura cerca de 10^{-15} s) faz com estas percam parte da energia absorvida, levando as moléculas ao menor nível vibracional do estado eletrônico em que se encontram.

Portanto, quando a fluorescência ocorre, a energia do fóton liberado pelas moléculas é menor que a dos fótons absorvidos e, conseqüentemente, seu comprimento de onda é maior que o dos absorvidos. Isto faz com que a fluorescência observada seja deslocada na direção da região do vermelho do espectro eletromagnético com relação à região de excitação [20-22]. Segundo Lakowicz, uma vez que os espectros de emissão resultantes da fluorescência refletem os níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental da molécula excitada, é possível empregá-los para a caracterização e identificação desta [21, 22].

Nas ciências dos materiais, a espectroscopia de fluorescência é bastante utilizada para a determinação de composições químicas, o que é possível uma vez

que cada composto químico tem uma fluorescência característica relacionada com o comprimento de onda de excitação. Num material cristalino ou num meio transparente, é possível mesmo quantificar a concentração de um dado composto que dele faça parte, posto que a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade do composto investigado no material ou meio desde que não sejam atingidas as condições de saturação do sistema (onde a concentração máxima foi atingida, sem que haja agregação ou precipitação). Entretanto, fazer o mesmo em meios turvos, como é o caso dos tecidos biológicos, é extremamente mais complicado, visto que tanto a luz da excitação quanto da fluorescência sofrem a influência de variados efeitos físicos decorrentes da própria constituição e estrutura desses tecidos [20, 23-28].

Tecidos biológicos possuem uma imensa quantidade de moléculas que interagem diferentemente com a luz, as quais se denominam *cromóforos*. Existem três tipos principais de cromóforos: *fluoróforos* (grupos químicos que absorvem a luz e a convertem em fluorescência), *absorvedores* (grupos que absorvem a luz mas não a convertem em fluorescência) e *espalhadores* (estruturas que modificam a direção do fóton que com ela interage, sem entretanto modificar sua energia e, portanto, seu comprimento de onda). As propriedades ópticas de cada cromóforo variam com o comprimento de onda de excitação e com sua própria estrutura – e, desta forma, da composição do tecido investigado. O metabolismo do tecido também interfere com estas propriedades, uma vez que os cromóforos e a sua conseqüente interação com a luz sofrem a influência dos meios em que se encontram [20, 22].

A turbidez é uma associação de fenômenos ópticos que implica na maior incidência dos fenômenos de espalhamento e absorção com relação à fluorescência. Ao penetrar um meio turvo, a luz de excitação perde intensidade (devido aos

compostos absorvedores) e percorre um caminho tortuoso, difícil de ser previsto (devido ao efeito de cromóforos espalhadores no meio). Além disso, também a luz da fluorescência emitida por um fluoróforo inserido no meio passa por estes obstáculos antes de deixar o meio e poder ser coletada na superfície por um detector. A luz originada na fluorescência é espalhada pelos compostos espalhadores – moléculas e estruturas de tamanhos variados, que acabam por modificar a direção original dos fótons que sobre elas incidem, semelhante ao que ocorre com a luz de excitação. Parte da fluorescência pode ser absorvida por cromóforos absorvedores presentes no meio (sendo a hemoglobina a principal, em tecidos biológicos), o que acaba modificando a intensidade de fluorescência observada para os comprimentos de onda absorvidos, e às vezes chega mesmo a mascarar a existência de fluorescência em dadas regiões do espectro, podendo ser observado como depressões ou vales no espectro. A fluorescência coletada, portanto, é a parte da mesma que consegue chegar à superfície do tecido, e que geralmente sofreu a influência destes efeitos antes de fazê-lo. Por isso, é bastante complexa a investigação da presença e a quantificação da concentração de compostos específicos em meios turvos através de técnicas ópticas [25, 26, 29-31].

Na TFD, a espectroscopia de fluorescência pode ser empregada para o rastreamento dos FS *in vivo*, uma vez que estes em geral são fluoróforos com alto rendimento quântico (isto significa que a razão entre fótons emitidos por fluorescência e os absorvidos é alta). Existem grandes vantagens na verificação da presença de FS no tecido e de obter-se uma quantificação do mesmo através da espectroscopia de fluorescência. Uma delas é que esta é uma técnica não-invasiva, isto é, não é induzido nenhum tipo de alteração no tecido a ser investigado, nem há a necessidade de coleta de uma amostra tecidual e os procedimentos posteriores

associados a uma análise química, por exemplo. Além disso, é possível obter uma avaliação em tempo real devido à rápida resposta da fluorescência à excitação. Isto torna mais rápidos e seguros os procedimentos clínicos, uma vez que é possível identificar imediatamente a presença ou ausência do espectro do FS no tecido. Desta forma, não se faz necessária a espera por análises laboratoriais, que levariam tempo e poderiam prejudicar a identificação do momento em que há máxima presença do FS no tecido [1].

Há uma grande barreira a ser superada, e esta é a turbidez do meio. Apesar das variadas interações que a luz originada da fluorescência sofre ao sair do tecido devido à sua turbidez, a determinação da concentração do FS dentro do tecido dificilmente poderia ser feita de outra forma que não a quantificação da intensidade de fluorescência observada na superfície do tecido fotossensibilizado investigado. Outras técnicas certamente exigiriam remoção tecidual ou outros recursos que igualmente provocariam danos ou prejuízos ao paciente ou à aplicação da terapia.

1.1. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- obter informação quantitativa a partir de espectros de fluorescência de substâncias fluorescentes em meios turvos;
- demonstrar a distribuição do fotossensibilizador Photogem[®] em fígado sadio de ratos Wistar, e suas implicações no efeito fotodinâmico esperado, mostrando a importância do mapeamento do FS como parte da dosimetria;
- melhorar, levando em conta as estimativas obtidas pela observação experimental da fluorescência do FS no tecido e o perfil da irradiação no tecido investigado, um dos modelos existente para a previsão da profundidade de necrose.

O primeiro objetivo tem grande importância com relação ao alcance do segundo, dando subsídios ao mesmo. Através da compreensão mais precisa da fluorescência em meios turvos, será possível compreender melhor a mesma em tecidos biológicos, os quais são em geral meios de grande turbidez. A melhoria do modelo de previsão de necrose também tem grande importância, uma vez que a Y_{nec} é um parâmetro bastante utilizado nos estudos da TFD.

Para atingir tais objetivos, neste trabalho, realizou-se uma série de experimentos e análise dos resultados, descritos com detalhes nos próximos capítulos. Eles se resumem a: (a) combinação de espectros de fluorescência de substâncias endógenas de fígado sadio de ratos Wistar, de forma a determinar o grau de relevância da contribuição de cada espectro particular para o espectro final do tecido

hepático, bem como para verificar a possibilidade de identificar alterações ou substâncias desconhecidas inseridos no tecido através deste processamento espectral (capítulo 2); (b) análise dos espectros de fluorescência de corantes isolados e de suas combinações, de forma a recuperar seus espectros originais através de processamento matemático simples e empírico, evitando as complexas teorias existentes na literatura (capítulo 3); e (c) experimentos *in vivo* com o objetivo de avaliar e quantificar a quantidade de FS no tecido hepático de ratos Wistar sadios, através da obtenção de espectros de fluorescência de variadas regiões do lobo esquerdo do órgão e da correlação destes espectros com as Y_{nec} obtidas para as mesmas concentrações de FS em diferentes regiões do lobo (capítulo 4).

2. Composição do espectro de fígado de ratos Wistar a partir dos espectros de seus fluoróforos endógenos

2.1. Objetivos

Na primeira etapa do trabalho, foi avaliada a possibilidade da reconstrução de um espectro de fluorescência obtido em fígado de ratos Wistar saudáveis a partir dos espectros de fluorescência intrínsecos de fluoróforos conhecidos presentes no tecido hepático. O objetivo desta etapa foi determinar um modelo que permita avaliar o grau de relevância de cada um dos espectros (respectivos a cada fluoróforo) na constituição do espectro tecidual obtido por fluorescência. A intenção em se verificar essa possibilidade é a de, com base nela, combinar a fluorescência destas substâncias endógenas do fígado à de substâncias exógenas (como é o caso do FS aplicado em pacientes de TFD), de maneira a identificar sua presença no tecido hepático e quantificá-la quando necessário.

2.2. Metodologia

2.2.1. Sistema para espectroscopia de fluorescência

O sistema utilizado para a realização da espectroscopia de fluorescência é um sistema elaborado para diagnóstico via espectroscopia de fluorescência constituído do equipamento russo “Spectr-Cluster” (Cluster, Moscou, Rússia), apresentado esquematicamente na Figura 1. Ele é composto de dois *lasers* para excitação, uma sonda de aplicação tipo Y, um espectrofotômetro e um computador. Os *lasers* que compõem o sistema possuem comprimento de onda de 442 nm (*laser* de HeCd, com potência óptica aproximada de 15 mW) e 532 nm (*laser* de Nd³⁺:YAG, com gerador intracavitário de segundo harmônico e potência óptica aproximada de 10 mW).

Figura 1: Esquema do sistema de diagnóstico “Spectr-Cluster”. Na figura pode-se observar o caminho da luz de excitação e da luz coletada, bem como a forma como se distribuem as fibras de excitação e coleta na extremidade de investigação da sonda.

A potência na extremidade da sonda de investigação é entre 7 e 10 mW para ambos os *lasers* de aplicação. A sonda de investigação é chamada “tipo Y” por possuir um conjunto de fibras ópticas disposto de tal forma que se apresentem três extremidades.

Uma delas, com uma das fibras ópticas (chamada fibra de excitação, com 110 μm de diâmetro), é acoplada à saída do *laser* de excitação utilizado, conduzindo a luz do *laser* até uma segunda extremidade, a qual chega até o alvo da investigação. Esta extremidade, além da fibra de excitação, possui seis outras fibras dispostas ao seu redor (cada uma com 100 μm de diâmetro), que coletam toda a luz originada no objeto da investigação e a conduz até a terceira extremidade, que reúne as seis fibras de coleta e as conecta ao espectrofotômetro.

O espectrofotômetro possibilita a análise entre os comprimentos de onda 378 nm e 842 nm do espectro eletromagnético, avaliando a intensidade de luz para cada comprimento de onda emitido. Na entrada do espectrofotômetro, onde a luz é coletada, há um conjunto de filtros. Um dos filtros é selecionado de forma a minimizar a quantidade de luz retroespalhada de mesmo comprimento de onda que o da excitação (nestes sistemas estão à disposição os filtros para regiões de 450, 540 e 640 nm).

A rede de difração, com dimensões de 36 x 36 mm², possui 300 sulcos/mm e forma o espectro em um campo plano de 12 mm de largura. O fotodetector multicanal constituído por uma CCD com arranjo linear utiliza, neste sistema, 970 detectores de silício. Resulta disso uma resolução espectral de 0,5 nm. O programa que o computador do sistema utiliza para a aquisição dos dados é o LightView-Med (LVM.exe).

Para cada variedade de espectro obtida por este sistema, foram obtidas médias entre um certo número determinado de medidas, descrito na metodologia de cada experimento. Estas médias são utilizadas para obtenção dos resultados apresentados tanto na forma de espectros quanto em valores específicos de intensidade de emissão para determinados comprimentos de onda de emissão (λ_{em}).

2.2.2. Uso de Animais

Foram utilizados para este experimento três ratos machos da linhagem Wistar, de aproximadamente 200 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para a obtenção do espectro de fluorescência do tecido hepático sadio com excitação em 442 nm.

Todos os animais utilizados nos experimentos desta dissertação foram acondicionados num alojamento para animais, com quatro filtros para entrada de ar e um para saída de ar, montado no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP), no Laboratório de Biofotônica. Ficaram alojados em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) de polietileno, com tampas metálicas e assoalho forrado com maravalha. Receberam água filtrada e ração comercial específica para roedores Primor[®]. A temperatura do alojamento é mantida entre 23 °C e 25 °C.

Todos os experimentos apresentados nesta dissertação foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) sob o número de protocolo para uso de animais em experimentação nº 044/2006 (vide Anexo).

Em todos os procedimentos experimentais desta dissertação envolvendo o uso de animais, estes foram submetidos a um período de 12 horas de jejum anteriores à experimentação, com livre acesso à água. Foram, em seguida, pesados e anestesiados com injeção intramuscular – solução de *cloridrato de quetamina base 50mg* (Vetanarcol - König[®]) na dose 0,08 ml/100g de massa corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *xilasina base 2g* (Coopazine - Coopers[®]) na dose de 0,04 ml/100 g de massa corporal. Foi realizada em cada animal uma incisão mediana, e o lobo utilizado foi exposto e isolado dos outros lobos hepáticos com gaze de algodão embebida em soro fisiológico.

Os animais utilizados para os trabalhos desta dissertação foram mortos por overdose de anestesia.

2.2.3. Espectros de fluorescência das substâncias endógenas

Para análise, foram utilizados os espectros de fluorescência de 15 cromóforos endógenos presentes no tecido hepático, sendo eles: bile, bilirrubina, biliverdina, biotina, sangue, colesterol, FAD, flavina mononucleotídeo, NADH, NADPH, l-prolina, fosfato piridoxal, ácido piridóxico, piridoxina, riboflavina. Estes espectros foram obtidos a partir do artigo de Ralph DaCosta *et al.* [32] (disponíveis on-line em <http://eemdb.uhnres.utoronto.ca/cgi-bin/WebObjects/WebFluor>), no qual foram obtidas matrizes excitação-emissão (EEM – *excitation-emission matrices*) de variados compostos fluorescentes relevantes para técnicas de espectroscopia tecidual. Os espectros de fluorescência destes cromóforos foram obtidos a partir dos valores de emissão para excitação em 440 nm destas matrizes (este é o comprimento de onda

de excitação – λ_{ex} – mais próximo do valor utilizado na obtenção do espectro de fígado utilizado neste experimento – 442 nm – dentre os obtidos para as matrizes).

Das EEM, foram coletadas as emissões[§] para comprimentos de onda entre 450 e 750 nm, com intervalos de 5 nm entre um valor de λ_{em} e outro – o que resultou em 61 valores de λ_{em} . Uma vez que se utilizou 15 cromóforos, têm-se uma matriz 61 x 15 (61 linhas correspondentes aos λ_{em} versus 15 colunas correspondentes aos cromóforos) à qual deu-se o nome de *Matriz Emissão para os Fluoróforos* (matriz *M* – vide Figura 2a). Todas as matrizes são normalizadas.

Esta matriz é multiplicada por uma matriz de coeficientes, os quais são responsáveis por dar pesos matemáticos à contribuição de cada cromóforo à fluorescência para um dado λ_{ex} . Assim, 15 x 1 – 15 linhas representando cada cromóforo e uma coluna representando um único coeficiente por cromóforo – constituem a matriz de coeficientes *C* – vide Figura 2a. Esta matriz-emissão resultante (a matriz denominada *Espectro de Fígado do Rato* – matriz *E*, vide Figura 2a) é uma matriz 61 x 1, com a coluna representando um único valor de intensidade para cada uma das 61 linhas, as quais representam por sua vez as emissões do tecido hepático em cada λ_{em} considerado.

[§] Os valores de intensidade para os λ_{em} obtidos nas matrizes foram normalizados pelos máximos de emissão de cada cromóforo.

$$\begin{array}{c}
\begin{array}{c}
61 \lambda's \left\{ \begin{array}{c} \text{Matriz} \\ \text{Emissão} \\ \text{para os} \\ \text{fluoróforos} \\ \text{(M)} \end{array} \right. \cdot \begin{array}{c} \text{C} \end{array} = \begin{array}{c} \text{E} \end{array} \\
\begin{array}{ccc}
15 \text{ fluoróforos} & 61 \times 15 & 15 \times 1 \quad 61 \times 1 \\
\text{Coeficientes} & & \text{Espectro Fígado Rato}
\end{array}
\end{array} \quad (a)
\end{array}$$

$$\begin{array}{c}
\begin{array}{c} \text{C} \end{array} = \begin{array}{c} \text{M}^{-1} \end{array} \cdot \begin{array}{c} \text{E} \end{array} \quad (b)
\end{array}$$

$$\begin{array}{c}
5 \times \left\{ \begin{array}{c} 15 \lambda's \left\{ \begin{array}{c} \text{M1, M2, M3,} \\ \text{M4, M5} \end{array} \right. \cdot \begin{array}{c} \text{C1,} \\ \text{C2,} \\ \text{C3,} \\ \text{C4,} \\ \text{C5} \end{array} = \begin{array}{c} \text{E1,} \\ \text{E2,} \\ \text{E3,} \\ \text{E4,} \\ \text{E5} \end{array} \\
\begin{array}{ccc}
15 \text{ fluoróforos} & 15 \times 15 & 15 \times 1 \quad 15 \times 1 \\
\text{Coeficientes} & & \text{Espectro Fígado Rato}
\end{array}
\end{array} \quad (c)
\end{array}$$

Figura 2: Representação do tratamento dos espectros de emissão de fluorescência para obtenção dos coeficientes de contribuição, de forma a se obter seus respectivos coeficientes de contribuição para o espectro do tecido hepático. (a) e (b): Demonstração da idéia original da obtenção dos coeficientes. (c) Tratamento dos dados para viabilizar o cálculo para a obtenção dos coeficientes.

Obteve-se o espectro de fluorescência do fígado sadio de três ratos Wistar através do sistema “Spectr-Cluster” descrito anteriormente, com excitação em 442 nm. A partir deste espectro, foram obtidos os valores de intensidade de fluorescência equivalentes aos λ_{em} utilizados e, em seguida, suas médias (obtidas entre os três valores de intensidade para cada λ_{em}). Os valores deste espectro foram normalizados pelo máximo de emissão (em torno de 520 nm), e na sequência o espectro foi substituído na coluna E . A partir destes dados e da matriz inversa de M (matriz M^{-1}), seria então possível obter coeficientes que representassem as contribuições da fluorescência de cada um dos cromóforos para a composição do espectro do fígado (Figura 2b).

Entretanto, para que matrizes sejam inversíveis, é necessário que elas sejam quadradas, ou seja, que possuam o mesmo número de linhas e colunas [33]. Como a

matriz M é uma matriz 61×15 , foi necessário elaborar, a partir dela, 5 matrizes, intercalando os λ_{em} utilizados de forma que se obtivesse matrizes M de dimensões 15×15 . Esta intercalação dos comprimentos de onda foi feita de tal forma que se considerassem todos os λ_{em} disponíveis a intervalos regulares. Assim, se nas EEM, os λ_{em} variavam entre 450 e 750 nm com intervalos de 5 nm, nas matrizes $M1-M5$ (vide Figura 2c) elas terão intervalos de 20 nm (para $M1$, de 450 a 730 nm; para $M2$, de 455 a 735 nm; para $M3$, de 460 a 740 nm; para $M4$, de 465 a 745 nm; para $M5$, de 460 a 750 nm), de forma que cada matriz $M1-M5$ fosse 15×15 . Desta forma, para cada matriz $M\#$, foi possível escolher valores do espectro de emissão do fígado e formar matrizes $E1$ a $E5$, respectivas às matrizes $M1-M5$. Com base nestes conjuntos de valores, inverteram-se as matrizes $M1-M5$ com o auxílio de um ambiente matemático (MATLAB[®]) e calcularam-se conjuntos de coeficientes (matrizes $C1$ a $C5$), relacionados às suas respectivas matrizes $M\#$ e $E\#$.

Por fim, a matriz M foi multiplicada pela média dos conjuntos de coeficientes $C\#$ obtidos, de forma a diminuir distorções provocadas pelo artifício utilizado (a intercalação dos λ_{em}).

2.3. Resultados e Discussão

Foram obtidos cinco diferentes conjuntos de coeficientes $C\#$ para o espectro de fígado de rato Wistar sadio, sendo em seguida obtida a média destes coeficientes. A Figura 3 mostra os espectros obtidos para cada conjunto de coeficientes, e a Figura 4 mostra o espectro obtido através da média entre os cinco conjuntos de coeficientes e o espectro obtido para o fígado de ratos Wistar.

Figura 3: Recuperação dos espectros a partir de cada conjunto de coeficientes $C\#$.

Figura 4: Espectro de autofluorescência (AF) obtido do fígado de ratos Wistar saudáveis com excitação em 442 nm e a recuperação de um espectro a partir da média dos coeficientes C#.

Embora seja possível notar a semelhança entre ambos os espectros, verificamos que existem várias discrepâncias entre os valores. Estas diferenças se devem a vários motivos. Um deles é o fato de que não são considerados todos os cromóforos existentes dentro do fígado – existe um número muito grande de substâncias neste órgão, devido às inúmeras funções que ele executa no organismo, e seria praticamente impossível levar em conta todas essas substâncias.

Além disso, os espectros de fluorescência de cada cromóforo usados aqui como referência e obtidos a partir do trabalho de DaCosta *et. al.* foram obtidos *in vitro* e isoladamente, em condições bastante específicas, de forma que cada um deles encontrava-se em pH específico, com os solventes mais apropriados e em concentrações diferentes [32]. Cada uma destas propriedades, ao ser modificada,

altera a fluorescência de um composto [21]. Uma vez dentro do fígado, elas encontram-se todas em condições ambientais aproximadas de pH e em concentrações variadas, podendo sofrer ainda alterações locais devido à dinâmica metabólica do órgão. Assim, as propriedades de fluorescência de um cromóforo específico dentro do fígado são alteradas, o que dificulta o reconhecimento de sua fluorescência isolada dentro de um meio com tantos fatores modificados. A própria interação entre todos os compostos do tecido gera distorções em maior ou menor grau nos níveis de energia das moléculas fluorescentes, o que pode modificar a intensidade de fótons emitidos em cada comprimento de onda com relação às emissões isoladas dos cromóforos [34, 35].

Além de todos estes obstáculos à identificação das emissões de cada fluoróforo no fígado, existem os efeitos ópticos de espalhamento e absorção, ambos sempre presentes em meios complexos e altamente turvos como tecidos biológicos, que afetam tanto à interação da luz de excitação com o tecido quanto à emissão de fluorescência de cada fluoróforo. O espalhamento modifica a direção em que seguem os fótons de luz, o que geralmente desvia os fótons originados da fluorescência da sonda que os coletaria, ou a luz de excitação para longe do alcance daquela. Além disso, como cada fluorescência ocorre num comprimento de onda (λ) diferente, o espalhamento que é dependente de λ tem contribuição diferente para diferentes fluoróforos. A absorção também interfere na observação tanto da excitação quanto da emissão, diminuindo a intensidade da luz de excitação espalhada difusamente no tecido (o que diminui, conseqüentemente, a fluorescência resultante) e a da emissão (pela absorção dos próprios fótons de fluorescência). Assim, estes fatores interferem enormemente na fluorescência que é coletada pela sonda em meios turvos [20, 22, 25, 26, 29, 30, 36].

2.4. Conclusões

Os resultados obtidos neste capítulo levam à conclusão de que o método de usar referências e somá-las no espectro total, dando a cada componente um peso espectral relacionado com as quantidades presentes para a contribuição da fluorescência das substâncias endógenas de forma a identificá-los não foi bem-sucedido em sua totalidade. Apesar de se conseguir uma recuperação aproximada do espectro do tecido hepático, as distorções provocadas por vários motivos – as condições ambientais originais dos fluoróforos no momento em que foram obtidos seus espectros, as interações entre os compostos do tecido, a absorção e o espalhamento sofridos pela luz no meio tecidual – são muitas e não podem ser facilmente desassociadas sem que se domine de maneira clara o efeito da turbidez do meio. Portanto, uma simples composição matemática de espectros intrínsecos de fluoróforos isolados não é suficiente para se chegar ao espectro coletado do tecido, devendo esses efeitos ser compreendidos e levados em conta. Supõe-se que fatores diversos que não a própria fluorescência dos compostos endógenos (os solventes, o pH, o espalhamento tanto de fótons da excitação quanto da fluorescência, a absorção dos fótons espalhados e de fluorescência, a concentração dos fluoróforos e os efeitos de campo entre as próprias moléculas) contribuem para a forma do espectro final. Estes fatores não podem ser desconsiderados sem prejuízo da avaliação pretendida do espectro, o que reforça a necessidade de compreender os efeitos da turbidez no meio percorrido pela luz.

3. Estudo da fluorescência de fluoróforos isolados *in vitro* e da recuperação desta em meios turvos

3.1. Objetivos

Verificada a necessidade de compreender com maior profundidade os efeitos de turbidez no meio e as interações entre os compostos deste que provocam alterações na luz coletada, a segunda fase do trabalho teve como objetivo aumentar a compreensão da forma como o espalhamento e a absorção interferem na emissão de fluorescência de um único composto através do estudo de espectros de fluorescência de compostos isolados (corantes) e das combinações de alguns destes corantes. O intuito é verificar quão recuperáveis são seus espectros originais a partir do espectro das misturas, via um processamento que utiliza artifícios matemáticos simples – uma vez que os métodos existentes, embora sejam bastante precisos, são de grande complexidade, refletindo-se em horas ou mesmo dias de processamento para se obter resultados, ainda que se disponha de poderosos computadores [37-40]. Esta dificuldade praticamente impossibilita sua aplicação para obtenção de informações em tempo real. Esperou-se com estas observações encontrar uma forma de recuperar a emissão dos compostos isolados em misturas levando em conta os efeitos de

absorção e espalhamento sobre a luz retroespalhada e a fluorescência, de uma forma menos complexa e mais imediata que a existente na literatura, embora empírica.

3.2. Metodologia

3.2.1. Sistema de espectroscopia de fluorescência

Na obtenção dos espectros de fluorescência deste capítulo foi utilizado o sistema de espectroscopia “Spectr-Cluster”, descrito na seção 2.2.1 do capítulo 2. Foram utilizados ambos os comprimentos de onda disponíveis para excitação (532 nm e 442 nm), e três espectros de cada condição foram obtidos visando o cálculo de uma média e a obtenção do desvio padrão para as medidas.

3.2.2. Uso de Animais

Foram utilizados sete ratos Wistar machos, com aproximadamente 200 g, cuja origem, acondicionamento, anestesia e métodos de uso em pesquisa seguem as normas e condições descritas na seção 2.2.2 do capítulo 2.

3.2.3. Obtenção dos espectros dos corantes *in vitro*

Na etapa *in vitro* desta fase, foram utilizados cinco corantes: três anilinas comestíveis nas cores azul, vermelho e verde (Coralim - Mix[®]), e dois corantes utilizados como meios ativos de *lasers* de corante, LDS-722 e Coumarin-480 (ambos da Exciton[®]). Elaboraram-se soluções em determinadas concentrações dos corantes (descritas abaixo) para obtenção dos espectros de fluorescência.

Para as anilinas, foram elaboradas soluções em água destilada, em misturas 50% água, 50% Eagle (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium* – Sigma[®], meio de cultura celular que foi utilizado como meio turvo, além de servir para diminuir o efeito da hemólise na aplicação da solução no fígado)[†] e em misturas 50% água, 50% sangue¹⁾ (todo o sangue utilizado foi obtido a partir dos mesmos animais utilizados para a etapa *in vivo* do trabalho). Além destas soluções com uma única anilina cada, foram preparadas misturas das soluções em água destilada de duas das três anilinas por vez (vermelha e azul; vermelha e verde), em três proporções distintas para cada mistura duas a duas: 50%/50%, 80%/20% e 20%/80% (as soluções-base de cada anilina possuíam concentração de 50mg/ml).

Para os corantes de *laser*, foram elaboradas inicialmente soluções em metanol (devido ao fato de tais corantes não poderem ser dissolvidos em água pura), à concentração de 125 µg/ml. A partir delas, foram preparadas outras soluções: misturas 25% água, 25% metanol e 50% Eagle e soluções 25% água, 25% metanol e 50% sangue. Para estes corantes também foram elaboradas misturas, em metanol, em concentração 50%/50% de cada um deles (cujas soluções-base de cada corante possuíam concentrações de 125 µg/ml cada).

Todas as soluções utilizadas para obtenção dos espectros de fluorescência permaneceram, durante a obtenção das medidas, numa cubeta de quartzo polida nas quatro faces (1mm espessura em cada face), de forma que as paredes da cubeta não interferissem na obtenção dos espectros.

[†] Todas as percentagens para as misturas são dadas em volume, com a unidade (100%) representando 1 ml.

¹⁾ Todo o sangue utilizado nos experimentos recebeu heparina para evitar sua coagulação.

3.2.3.1. Processamento matemático das misturas de corantes dois a dois

Obtiveram-se os espectros das misturas dos corantes dois a dois (anilinas vermelha com verde, azul com vermelha, e os corantes Coumarin com LDS) conforme descrito na seção 3.2.3, bem como de cada um dos corantes isoladamente. As áreas dos espectros dos fluoróforos isolados e das misturas foram obtidas através da integração, sendo $F_i(\lambda)$ a representação das funções de cada espectro com relação ao comprimento de onda, o índice i a representação de cada espectro e A_i a representação da área de cada espectro (Eq. 1).

$$\int F_i(\lambda) d\lambda = A_i \quad (1)$$

Na sequência, obteve-se a normalização com relação às áreas obtidas, com $\bar{F}_i(\lambda)$ representando as funções normalizadas pelas áreas (Eq. 2).

$$\bar{F}_i(\lambda) = \frac{F_i(\lambda)}{A_i} \quad (2)$$

Em condições ideais, o espectro de emissão da mistura deve representar uma combinação linear (i.e., uma espécie de soma ponderada, ou seja, soma de fatores independentes com a aplicação de pesos em cada um deles) dos espectros de emissão de cada fluoróforo utilizado na mistura, com $\tilde{F}$ representando o espectro da mistura e C_i os coeficientes para cada fluoróforo contribuinte (Eq. 3a). Portanto, foram calculados os coeficientes das contribuições que geram a $\tilde{F}$ mais próxima do espectro da mistura, considerando que a somatória de todos os C_i deve ser necessariamente igual a um (Eq 3b).

$$\tilde{F} = \sum C_i \cdot F_i ; \quad (3a)$$

$$\sum C_i = 1 \quad (3b)$$

Por fim, foram comparados os espectros obtidos da emissão de fluorescência das misturas e os calculados a partir dos coeficientes estimados com base nos espectros medidos, para avaliar a capacidade de recuperação da identidade do corante.

3.2.4. Avaliação da presença dos corantes em fígado de ratos Wistar sadios

Na etapa *in vivo*, foram aplicados 200 µl das soluções (do corantes LDS e de cada anilina) com Eagle na veia cava inferior, bem como do próprio Eagle puro, tendo sido utilizados um animal para cada corante num total de cinco dos sete animais utilizados. Nestes animais, os espectros de fluorescência foram obtidos ao longo de cerca de 90 minutos após a administração endovenosa da solução.

Os animais utilizados foram acondicionados conforme os detalhes da seção 3.2.2. e 2.2.2. Para o acesso à cavidade abdominal dos animais, foi realizada uma incisão mediana. As soluções de corantes misturadas com Eagle (ver seção 3.2.3) utilizadas nos animais foram aplicadas por injeção endovenosa, pela veia cava inferior. O lobo investigado foi exposto e isolado com gaze de algodão embebida em soro fisiológico e, na sequência, os espectros de fluorescência foram obtidos.

3.2.5. Avaliação da fluorescência dos corantes para laser em tecido hepático macerado

Nesta etapa, o sexto e o sétimo animais tiveram seus fígados removidos e macerados. Misturou-se 1 ml de cada porção de macerado a 1 ml das soluções de

corantes para *laser*²⁾ (25% água, 25% metanol e 50% de macerado) na cubeta de quartzo descrita na seção 3.2.3 para que se obtivessem seus espectros.

No caso da obtenção deste macerado de tecido hepático, os animais foram mortos por overdose de anestesia subsequente à remoção de seus fígados. Estes fígados removidos foram macerados utilizando almofariz e pistilo de porcelana até que se obtivesse homogeneidade. Durante a maceração, foi adicionada heparina (aproximadamente 0,5 ml para cada órgão completo removido) para evitar que o sangue no tecido coagulasse, atrapalhando a obtenção da homogeneidade do macerado e, assim, a alteração de suas propriedades ópticas (por exemplo, da absorção).

²⁾ Foram realizadas medidas em macerado de fígado apenas para os corantes para *laser*, uma vez que os resultados observados em fígado *in vivo* não foram satisfatórios para os mesmos (vide seção 3.3: *Resultados e Discussão*, a seguir).

3.3. Resultados e Discussão

Nesta seção, todos os espectros apresentados são o resultado de médias de três espectros de fluorescência obtidos para cada condição e/ou objeto de análise, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e no macerado de tecido hepático.

3.3.1. Espectros de fluorescência dos corantes *in vitro*

A seguir, são apresentados os gráficos referentes aos espectros de fluorescência obtidos *in vitro*, descrita na seção 3.2.3, começando pelas anilinas e pelo processamento das misturas duas a duas e depois passando aos corantes utilizados em *lasers* e o processamento de suas misturas.

Figura 5: Espectros de fluorescência do Eagle para as excitações em 442 nm (esquerda) e 532 nm (direita).

Figura 6: Espectros de fluorescência com excitação em 442 nm para a anilina vermelha em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.

Figura 7: Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm para a anilina vermelha em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.

Figura 8: Espectros de fluorescência com excitação em 442 nm para a anilina verde em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.

Figura 9: Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm para a anilina verde em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.

Figura 10: Espectros de fluorescência com excitação em 442 nm para a anilina azul em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.

Figura 11: Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm para a anilina azul em água, água/Eagle e água/Sangue, em concentração de 50 mg/ml.

Para a anilina vermelha com excitação em 442 nm (Figura 6), não se verifica alteração no espectro de fluorescência quando é adicionado o Eagle. Entretanto, quando a solução é adicionada ao sangue, verifica-se alteração na intensidade do espectro: a banda da anilina presente anteriormente, embora não sofra deslocamento, tem sua intensidade diminuída em mais de 50 por cento. A meia-largura da banda – a largura considerada na altura da metade do seu máximo de intensidade – mantém-se constante e não há alteração no formato da curva de emissão. Isso indica que não houve alteração nos níveis eletrônicos e vibracionais da molécula responsáveis pelos fótons emitidos em tais comprimentos de onda.

Para a excitação em 532 nm (Figura 7), verifica-se um aumento na intensidade de fluorescência da anilina vermelha quando a solução desta em água é adicionada ao Eagle. Ao ser misturada ao sangue, a anilina apresenta comportamento semelhante ao verificado com $\lambda_{\text{ex}} = 442$ nm: diminuição da intensidade de emissão (80% de perda de intensidade) ao ser excitada com $\lambda_{\text{ex}} = 532$ nm. A ausência de uma banda de emissão na região entre 500 nm e 600 nm no espectro para a mistura de anilina e Eagle com excitação em 442 nm, esperada devido à banda de emissão do Eagle nesta excitação (Figura 5), pode ser explicada pela absorção destes comprimentos de onda pela própria anilina.

Para a anilina de cor verde com $\lambda_{\text{ex}} = 442$ nm (Figura 8), verifica-se um leve aumento na intensidade de emissão de ambas as bandas presentes em seu espectro de fluorescência na água quando ocorre a adição de Eagle à solução. Entretanto, não se verifica deslocamento ou outras alterações no espectro de emissão. Ao ser misturada ao sangue, entretanto, a anilina verde tem seu espectro modificado: a banda entre 480 e 610

nm perde intensidade, enquanto a banda entre 630 e 770 nm apresenta um aumento de aproximadamente 2,5 vezes com relação à anilina em água, e um pequeno deslocamento para o azul (da ordem de 10 nm).

Com a excitação em 532 nm (Figura 9), verifica-se uma queda na intensidade de fluorescência da banda de emissão apresentada pela anilina misturada ao Eagle com relação à mesma em água. Entretanto, não há deslocamento ou variação na banda e na meia-largura de banda, respectivamente. Contudo, na mistura da solução de anilina com o sangue, a fluorescência aumenta com relação às emissões em água e em Eagle, além de apresentar deslocamento para o azul³⁾ de aproximadamente 15 nm entre os máximos de emissão das bandas em sangue e em água/Eagle.

A diminuição na intensidade de fluorescência da banda entre 480 e 610 nm para a mistura de anilina verde em água com sangue da Figura 8 pode ser justificada pela grande absorção de comprimentos de onda na região do verde pela hemoglobina presente no sangue – parte da fluorescência nessa região é suprimida pela absorção da hemoglobina na região da referida banda. Para a Figura 9, a intensificação da emissão em torno de 675 nm, em contraste com a da banda anterior (em torno de 690 nm) e o deslocamento para o azul podem ser justificados pela interação entre a anilina e outras estruturas presentes no sangue, alterando os níveis vibracionais das moléculas - para emitir em comprimentos de onda menores, por exemplo, é preciso que os fótons tenham

³⁾ Deslocamentos “para o vermelho” representam um deslocamento na direção em que λ aumenta, enquanto deslocamentos “para o azul” representam um deslocamento na direção em que λ diminui, numa referência às posições de ambas as cores dentro da região visível do espectro eletromagnético.

mais energia⁴⁾, o que só ocorre se houver um distanciamento dos níveis eletrônicos em termos de energia.

Quando se consideram os espectros de fluorescência da anilina azul para excitação em 442 nm (Figura 10), verifica-se baixa intensidade de fluorescência nas duas bandas de emissão apresentadas. Uma leve diminuição na intensidade é verificada quando é adicionado Eagle à solução da anilina, e praticamente não há fluorescência quando esta é misturada ao sangue. Além disso, o pequeno sinal de fluorescência presente denota um deslocamento do máximo de emissão da banda de 660 a 790 nm (máximo em torno do $\lambda_{em} = 708$ nm) para o azul (em torno de 680 nm). Para a anilina azul com $\lambda_{ex} = 532$ nm (Figura 11) verifica-se grande intensidade de fluorescência na anilina diluída em água. No entanto, quando o Eagle passa a fazer parte da solução, a intensidade de fluorescência diminui em mais de 40%, e quando a solução da anilina é misturada ao sangue, a fluorescência diminui de forma intensa, caindo para menos de um décimo da intensidade da anilina em solução aquosa, e a banda apresentada sofre um deslocamento de aproximadamente 15 nm para o azul.

A baixa intensidade de fluorescência emitida pela anilina azul com excitação em 442 nm é facilmente explicada, uma vez que esta excitação corresponde ao azul, semelhante àquele que os pigmentos do corante espalham na solução (visto que esta apresenta coloração azulada) e, portanto, pouco absorvido pelo mesmo. Portanto, se pouca luz de excitação é absorvida pela substância fluorescente, pouca fluorescência pode ser observada. Já a baixa intensidade de fluorescência com a adição de sangue

⁴⁾ Isto ocorre segundo a relação $\Delta E = h\nu = hc/\lambda$, onde ΔE é a diferença de energia entre o nível de energia do qual o elétron excitado sai e para o qual decai ao emitir um fóton, h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e λ o comprimento de onda.

tanto numa quanto noutra excitação deve-se ao escurecimento da solução, observado quando a anilina azul é misturada ao sangue. Tal escurecimento significa que os compostos da mistura passaram, como um todo, a absorver mais luz em variados comprimentos de onda, o que inclui tanto a luz advinda da excitação, que se espalha no tecido, quanto àquela originada de fluorescência. Este efeito explica também a queda da intensidade da emissão ao misturar a solução da anilina em água ao Eagle, quando esta também assume um aspecto mais escurecido. O deslocamento para o azul das bandas também é evidência de interação entre os compostos da mistura.

Observados os espectros de fluorescência das anilinas individualmente, passar-se-á ao processamento das misturas duas a duas, mas antes será apresentada a justificativa para haver apenas duas misturas de anilinas, e não três. Ao observarmos os espectros de fluorescência das anilinas em cada λ_{ex} , pode-se perceber que os espectros de fluorescência das anilinas azul e verde não diferem senão em intensidade, sendo tanto semelhantes quanto à forma das curvas quanto nas regiões em que surgem as bandas. Uma vez que o objetivo desta etapa do trabalho foi de buscar uma forma de processar espectros de fluorescência de misturas de forma a identificar as contribuições individuais dos fluoróforos inseridos nas mesmas, foi decidido descartar a mistura de dois fluoróforos com características de emissão tão semelhantes.

Dito isto, passa-se à apresentação dos espectros de fluorescência das misturas das anilinas e de seu processamento.

Figura 12: Espectros de fluorescência da mistura das anilinas vermelha e verde ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 1:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).

Figura 13: Espectros de fluorescência da mistura das anilinas vermelha e verde ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 4:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).

Figura 14: Espectros de fluorescência da mistura das anilinas vermelha e verde ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 1:4 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).

Figura 15: Espectro de fluorescência da mistura das anilinas azul e vermelha ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 1:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).

Figura 16: Espectro de fluorescência da mistura das anilinas azul e vermelha ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 4:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).

Figura 17: Espectro de fluorescência da mistura das anilinas azul e vermelha ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) em proporção 1:4 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).

A partir dos resultados observados para as denominadas “curvas experimentais” nas Figuras 12 a 17, foram estimados coeficientes (Tabelas 1 e 2) que determinavam a contribuição do espectro de cada anilina para o espectro das misturas e, com base neles, gerados os espectros esperados para as misturas (as “curvas teóricas” das Figuras 12 a 17).

Tabela 1: Coeficientes C_i para as misturas verde/vermelha

Verde	Vermelho	Proporção da mistura
0,29995	0,70005	(1:1) ou 50%/50%
0,56404	0,43596	(4:1) ou 80%/20%
0,13652	0,86348	(1:4) ou 20%/80%

Tabela 2: Coeficientes C_i para as misturas azul/vermelha

Azul	Vermelho	Proporção da mistura
0,34706	0,65294	(1:1) ou 50%/50%
0,56480	0,43520	(4:1) ou 80%/20%
0,13506	0,86494	(1:4) ou 20%/80%

Como se vê nas Figuras 12 a 17, em nenhum dos casos se conseguiu recuperar o espectro da mistura coletado através da aplicação dos coeficientes aos espectros normalizados das anilinas separadamente, embora os espectros assim obtidos sejam bastante semelhantes aos obtidos experimentalmente. Podem-se justificar essas alterações através dos inúmeros eventos de espalhamento e de absorção que ocorrem durante o caminho dos fótons desde a fonte de excitação até a coleta, bem como pela interação entre os próprios corantes: uma anilina pode absorver parte da emissão da outra e vice-versa. Da mesma forma, as próprias moléculas podem interagir quimicamente, provocando alteração das estruturas moleculares e, portanto, dos níveis de energia eletrônicos das moléculas, o que modifica a emissão de cada uma delas. Os variados espalhamentos sofridos tanto pelos fótons retroespalhados quanto os de fluorescência também podem interferir com a observação [23, 25, 29] uma vez que, ao

alterarem o caminho da luz, podem modificar o sinal capturado pela sonda de coleta. Todos estes fenômenos e interações acontecem freqüentemente e de maneira intensa dentro de tecidos biológicos e em meios de alta turbidez em geral, o que dificulta a análise dos dados de espectros de fluorescência para tais meios.

Considerando que a interação entre as próprias anilinas utilizadas foi a principal causa das distorções dos espectros, foi que se considerou utilizar corantes fluorescentes geralmente utilizados para *lasers*, esperando que moléculas com pouca interação entre si fossem recuperadas sem tantos fatores envolvidos no espectro de emissão. Esta interação observada e já citada como provável causa de modificação da luz coletada no capítulo anterior mostra-se um problema adicional a ser considerado na quantificação de uma substância pela fluorescência.

A seguir, apresentam-se os espectros de fluorescência do LDS e do Coumarin ($\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$) diluídos em metanol, metanol e Eagle, metanol e sangue, bem como o processamento para recuperação da mistura 50%/50% de ambos em metanol.

Figura 18: Espectros de Fluorescência do LDS ($\lambda_{ex} = 442$ nm) em soluções de metanol, metanol com Eagle e metanol com sangue.

Figura 19: Espectros de Fluorescência do Coumarin ($\lambda_{ex} = 442$ nm) em soluções de metanol, metanol com Eagle e metanol com sangue.

Para o corante LDS diluído em metanol, com excitação em 442 nm (Figura 18), verifica-se que a banda de emissão principal, aproximadamente entre 600 e 800 nm, apresenta grande aumento na intensidade ao ser realizada a mistura com Eagle. Já ao ser realizada a mistura com sangue, a banda volta a apresentar menor intensidade, além de sofrer um deslocamento para o azul de cerca de 25 nm (modificando o máximo de emissão de 720 nm para aproximadamente 695 nm). Na mistura com Eagle também se verifica uma banda de emissão entre 450 e 575 nm, provavelmente devida à emissão de fluorescência do próprio Eagle para esta excitação (ver Figura 5).

O aumento intenso da emissão de fluorescência verificado pode ser atribuído à desagregação das moléculas do fluoróforo ao ser diluído pela solução, uma vez que a agregação das moléculas inibe a fluorescência [21]. Já a diminuição desta intensidade na mistura envolvendo sangue pode ser explicada pela absorção dos variados compostos presentes no mesmo.

Observando os resultados para o Coumarin (Figura 19), verifica-se que, ao adicionar Eagle à solução, ocorre queda na intensidade na banda de emissão do corante, além de deslocamento para o vermelho dos máximos de emissão de aproximadamente 30 nm. Com a adição de sangue, entretanto, a intensidade sofreu uma amplificação tão acentuada que superou a capacidade de detecção do equipamento, não nos permitindo avaliar a posição ou a intensidade exata do máximo de emissão, mas permitindo ainda assim, estimar o deslocamento para o vermelho (com relação ao máximo da solução em metanol) como sendo de aproximadamente 15 nm (considerando que o máximo esteja em torno de 490 nm). Verifica-se ainda uma alteração na forma da curva de emissão na solução com Eagle. A região que passa a apresentar emissão quando comparada à da

solução sem Eagle coincide com a região de emissão de fluorescência deste último para a excitação com 442 nm, de forma que a contribuição do Eagle, portanto, explica a modificação do espectro.

Da mesma forma que para as anilinas, obteve-se o espectro da mistura de ambos os corantes (Figura 20, “curva experimental”) e, a partir deste, foram obtidos os coeficientes (Tabela 3) que determinam a contribuição de cada um dos corantes para a fluorescência da mistura. Com base neles, foi obtido o espectro esperado para a mistura de ambos (Figura 20, “curva teórica”).

Figura 20: Espectro de fluorescência da mistura de LDS e Coumarin ($\lambda_{ex} = 442$ nm) em proporção 1:1 (Experimental) e sua previsão através cálculo dos coeficientes (Teórica).

Tabela 3: Coeficientes C_i para a mistura LDS e Coumarin

Coumarin	LDS	Proporção da mistura
0,8246	0,1754	(1:1) ou 50%/50%

Para a mistura de Coumarin e LDS, diferentemente do observado para as anilinas, verifica-se que a previsão de curva obtida a partir do procedimento matemático baseado nos espectros normalizados dos corantes foi praticamente idêntica à curva obtida através da mistura dos dois corantes. Pode-se explicar esta diferença de resultados principalmente pela ausência de interação entre os corantes para *laser*. Uma vez que haja pouca interação química entre eles, menor é o efeito que um tem sobre os níveis eletrônicos de energia do outro e, portanto, menores as distorções da fluorescência característica de cada um na mistura.

3.3.2. *Fluorescência dos corantes in vivo*

Nesta etapa, como descrito na seção 3.2.4, foram aplicadas soluções dos corantes em água – metanol, para o LDS – misturadas a Eagle no fígado de cinco ratos Wistar saudáveis, através da veia cava inferior. Ao longo de 90 minutos pós-aplicação, foi observada a fluorescência do órgão para cada animal/corante. Na sequência, discute-se como a adição das soluções de corantes interferiu nesta fluorescência.

Para os espectros de Eagle puro no fígado, observou-se que há diminuição da fluorescência para a excitação em 442 nm (Figura 21) e aumento para a excitação em 532 nm (Figura 22). Tal observação pode ser justificada pelo metabolismo das substâncias do próprio Eagle, que ao realizar ligações com outras estruturas dentro do

tecido hepático pode ter sua fluorescência suprimida/amplificada. Por outro lado, uma vez que o Eagle é um meio de cultura celular e, por isso, contém grande quantidade de nutrientes, pode ter ocorrido um aumento do ritmo metabólico no órgão ao recebê-lo, estimulando o funcionamento de certas organelas e estruturas celulares e, com isso, aumentando ou diminuindo a fluorescência do tecido como um todo.

Figura 21: *Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$. Verifica-se uma diminuição na intensidade de fluorescência como um todo.*

Figura 22: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$. Verifica-se um aumento na intensidade de fluorescência como um todo.

Figura 23: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina vermelha e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$.

Figura 24: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina vermelha e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 532$ nm.

Figura 25: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina verde e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442$ nm.

Figura 26: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina verde e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$.

Figura 27: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina azul e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$.

Figura 28: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução da anilina azul e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$.

Figura 29: Fluorescência do fígado de rato Wistar após a aplicação de solução de LDS em metanol e Eagle em variados tempos, com $\lambda_{ex} = 442 \text{ nm}$, bem como a emissão da solução isoladamente.

Para o $\lambda_{ex} = 442$ nm (Figuras 23, 25 e 27), observa-se o mesmo tipo de comportamento para todas as anilinas, repetindo o padrão de comportamento observado para a mesma excitação quando foi aplicado apenas Eagle no animal (Figura 21): ocorre um decréscimo da intensidade de fluorescência ao longo do tempo após a aplicação, a qual se restabelece entre 60 e 90 minutos – o que sugere este ser o tempo que o Eagle leva para ser metabolizado no fígado. A diferença no tempo para o restabelecimento da fluorescência inicial pode ser atribuída a diferenças na dinâmica metabólica de cada animal.

Por outro lado, para o LDS (Figura 29), observou-se aumento da emissão de fluorescência da banda do próprio fígado. Entretanto, embora a grande intensidade da emissão de LDS com Eagle para esta excitação e a distância da banda emitida quanto à região espectral de emissão do fígado, não se observou qualquer sinal da fluorescência do LDS misturado com Eagle (apresentada novamente na Figura 29 para comparação). Deduz-se disto que o LDS não tenha chegado ao tecido hepático; existe a possibilidade de que mecanismos de transporte nas membranas das células hepáticas impossibilitem a chegada do LDS ao fígado. O fato de terem sido observados traços de fluorescência dos outros corantes utilizados (para excitação em 532 nm, como será visto a seguir) corrobora com esta interpretação⁵⁾.

Para o $\lambda_{ex} = 532$ nm (Figuras 24, 26 e 28), observa-se alguns sinais de alteração nos espectros de fluorescência do órgão após a aplicação das anilinas. Um pico começa a surgir na região de 650 nm tanto para a anilina verde quanto para a azul, resultado do deslocamento para o azul da banda que ambas puras apresentam em torno de 690 nm

⁵⁾ Devido a este resultado, não foi realizado o mesmo experimento com o outro corante para *laser*, Coumarin.

(Figura 9 e Figura 11). Para a anilina vermelha, entretanto, não se observa nenhuma alteração quanto à forma de emissão espectral, sendo apenas verificada a variação da intensidade dos espectros ao longo do tempo – efeito do Eagle da mistura, conforme os resultados apresentados nas Figuras 21 e 22.

3.3.3. *Fluorescência dos corantes para laser ex vivo (macerado de tecido hepático)*

Não tendo sido possível realizar a observação dos corantes para *laser in vivo*, uma vez que os mesmos não parecem chegar ao tecido hepático, buscou-se uma forma de sobrepujar os mecanismos que porventura retenham os corantes fora do mesmo, mas mantendo ao máximo a similaridade das propriedades ópticas do meio utilizado com relação ao tecido. Assim, foi realizada a maceração do tecido hepático de ratos Wistar sadios, aos quais misturaram-se as soluções dos corantes para *laser* com metanol e Eagle, cujos resultados serão apresentados nesta seção.

Figura 30: Fluorescência do corante LDS ($\lambda_{ex}=442$ nm) em solução de metanol e Eagle na mistura envolvendo macerado de tecido hepático.

Figura 31: Fluorescência do corante Coumarin ($\lambda_{ex}=442$ nm) em solução de metanol e Eagle na mistura envolvendo macerado de tecido hepático.

A emissão do LDS em tecido hepático macerado (Figura 30) mostra-se pouco intensa, embora ainda apresente sua banda característica entre 600 e 800 nm (ainda que o máximo tenha sido deslocado para o azul – de aproximadamente 725 nm para 690 nm). Apresenta-se ainda outra banda, na região entre 450 e 600 nm, que representa a emissão do próprio tecido hepático macerado (Figura 4).

A fluorescência do corante Coumarin no tecido hepático macerado, como pode ser visto na Figura 31, apresenta o mesmo comportamento de sua emissão enquanto pura, com aumento discreto na intensidade de fluorescência em torno de 600 nm, atribuído à emissão do próprio tecido macerado nessa excitação.

Estes resultados demonstram que a impossibilidade de se verificar a fluorescência do LDS *in vivo* realmente estava relacionada com a dinâmica metabólica e/ou com as estruturas presentes nas membranas, que mantinham o corante fora do tecido hepático[41-43]. Uma vez triturado o tecido, de forma que o metabolismo não mais interferisse na forma como a solução se mistura a ele, verificou-se a fluorescência característica dos fluoróforos, embora alterada pelas propriedades de absorção e espalhamento próprias dos compostos teciduais.

3.4. Conclusões

Nesta fase do trabalho, foi observada a fluorescência de cinco corantes – três anilinas comestíveis e dois corantes utilizados para *lasers* de corante – em variados meios *in vitro*, e parte deles em tecido hepático *in vivo* e *ex vivo* (na forma de macerado).

Foi possível observar que diferentes meios, com diferentes composições, alteram a fluorescência de um fluoróforo de várias maneiras, seja alterando a forma do espectro de emissão ou a região do espectro eletromagnético em que a fluorescência está sendo emitida (ambos representando que determinados comprimentos de onda estão sendo emitidos em maior ou menor intensidade devido a interações com outras moléculas do meio – solventes, íons etc), seja contribuindo com seus próprios espectros de emissão, seja distorcendo a luz coletada por espalhamento ou ainda absorvendo parte da emissão de fluorescência, modificando assim o espectro de emissão final observado.

Além disso, foi possível observar que a dinâmica metabólica interfere com a fluorescência de compostos inseridos em tecido hepático, sendo um fator extra a ser considerado ao se avaliar a fluorescência de tecidos *in vivo*.

Para o LDS-722 e o Coumarin-480, foi possível recuperar os espectros de fluorescência dos corantes isolados com base na mistura e nos coeficientes de contribuição. Entretanto, no caso das anilinas comestíveis, não foi possível recuperar o espectro de fluorescência dos corantes isolados a partir das misturas e dos coeficientes de contribuição de cada corante, devido às variadas interações que ocorrem entre eles. Todas as interações citadas acima precisariam ser levadas em conta para que se conseguisse obter a contribuição de fluorescência de cada corante para a mistura, de

forma que o modelo matemático proposto com base empírica não se mostrou completamente aplicável.

4. Avaliação da distribuição de fotossensibilizador em tecido hepático sadio através da espectroscopia de fluorescência

4.1. Objetivos

Para mostrar a importância do projeto que está sendo desenvolvido, será mostrado o que se pode obter com os resultados e conclusões já obtidos, mostrando com isso a necessidade da medida de fluorescência para avaliação da distribuição do FS no tecido. O objetivo desta etapa do trabalho é o de verificar a distribuição do FS Photogem[®] (Moscou, Rússia), um derivado de hematoporfirina, em fígados sadios de ratos Wistar, e suas implicações nos efeitos fotodinâmicos esperados com a aplicação da TFD. Com esta informação, pretende-se também melhorar um dos modelos existentes para a previsão da Y_{nec} (modelo elaborado em trabalhos anteriores do grupo e explicado na Metodologia deste capítulo, a seguir), no qual não se leva em conta, atualmente, a distribuição do FS no tecido para a aplicação de luz na TFD.

4.2. Metodologia

4.2.1. Sistema para espectroscopia de fluorescência

Na obtenção dos espectros de fluorescência deste capítulo foi utilizado o sistema de espectroscopia “Spectr-Cluster”, descrito na seção 2.2.1 do capítulo 2. Foi utilizado o segundo harmônico do *laser* de Nd³⁺:YAG (532 nm) como fonte de excitação, e três espectros de cada condição foram obtidos visando o cálculo de uma média e a obtenção de desvios padrão para as medidas.

4.2.2. Uso de Animais

Foram utilizados sete ratos Wistar machos, sendo que quatro deles foram utilizados para medida do espectro de fluorescência em variadas regiões do fígado e três para correlacionar a concentração do FS com a profundidade de necrose na região de investigação após a aplicação da TFD. Os animais pesavam aproximadamente 200 g cada, e sua origem, acondicionamento, anestesia e métodos de uso em pesquisa seguem as normas e condições descritas na seção 2.2.2 do capítulo 2.

4.2.3. Correlação entre fluorescência e quantidade de FS em variadas regiões do fígado

Dos quatro animais utilizados na presente etapa dos experimentos deste capítulo, para dois foi administrado o FS Photogem[®], em dose de 1,5 mg/kg da massa corpórea via injeção intravenosa através da veia cava inferior. Trinta minutos após a aplicação do FS, o fígado do respectivo animal foi removido e o mesmo morto por overdose de anestesia. Os outros dois animais passaram pelo mesmo procedimento, entretanto não receberam a aplicação do FS, de forma que se pudesse coletar apenas a autofluorescência (AF) de cada ponto investigado no órgão.

Logo após a remoção, dois dos fígados (um fotossensibilizado e outro não) tiveram o lobo esquerdo e a porção maior do lobo direito cortados em fatias de aproximadamente 3 mm de espessura, resultando em 9 fatias do lobo esquerdo e 6 do lobo direito, num total de 15 fatias. Foi então medida a fluorescência em três pontos de cada fatia, cada ponto de investigação ao longo de um eixo (três eixos paralelos separados de aproximadamente 5 mm) e perpendicularmente à face dos cortes, seguindo da extremidade do lobo esquerdo em direção ao ponto que conecta os lobos (onde a veia cava chega ao fígado), e desta para a extremidade do lobo direito (conforme esquema da Figura 32).

Figura 32: Esquema dos cortes e dos pontos para os quais foi obtida a fluorescência ao longo do fígado do animal. (a) As linhas verticais representam os cortes para a obtenção das fatias A, B, C... M, N, O; (b) representação dos eixos dos eixos seguidos ao longo do fígado para obtenção das medidas em seu interior em uma fatia; (c) representação dos pontos em que se obtiveram as medidas para a avaliação pela superfície do fígado.

Para os outros dois fígados, os lobos foram divididos nas mesmas regiões das fatias, entretanto a fluorescência foi coletada apenas ao longo do eixo central, na superfície do tecido. Assim, foram realizados dois tipos de coleta de fluorescência nesta fase: superficial e interna ao tecido.

Descontaram-se as AF (coletadas de cada ponto nos órgãos sem FS) dos espectros de fluorescência dos órgãos fotossensibilizados, através da subtração das intensidades para cada comprimento de onda dos espectros de fluorescência, para que a influência da fluorescência própria do tecido (que pode variar conforme o volume de tecido observado) fosse minimizada na observação da fluorescência do FS. Em seguida, gráficos com os máximos de intensidade da emissão de fluorescência para a banda mais proeminente do Photogem[®] (cujo máximo principal de emissão é centrado em torno de 613 nm *in vitro* e 618 nm *in vivo*, para excitação em 532 nm – ver Figura 33) foram traçados como função da posição ao longo de cada eixo nos lobos.

Figura 33: Espectros de fluorescência do Photogem® *in vitro* e *in vivo* (excitação em 532 nm). O pico do FS *in vitro* apresenta seu primeiro máximo em 613 nm, enquanto *in vivo* apresenta-o em 619 nm, e o segundo em 675 nm, ou 683 nm *in vivo*.

Uma vez que ainda não é possível obter quantificação exata da concentração de FS em meios turvos como o tecido, considerou-se que o valor máximo de intensidade de emissão coletado é proporcional à concentração aplicada (uma vez que esta seria a máxima possível no tecido – 1,5 mg/kg) e a partir daí realizou-se uma relação entre intensidade dos máximos de emissão e concentração, de forma a se obter uma curva ou função espacial da concentração do FS no tecido hepático. Esta aproximação é válida pelo fato de que a turbidez é bastante homogênea neste órgão. Obtém-se, portanto, não uma concentração absoluta, mas sim relativa do FS.

4.2.4. Correlação entre quantidade ou distribuição de FS e as profundidades de necrose

Para verificar o efeito da variação da concentração de FS e correlacioná-los com o efeito fotodinâmico, foram realizadas aplicações da TFD em fígados sadios de três ratos Wistar.

Para as aplicações da TFD, utilizou-se um *laser* de diodo (Eagle Heron, Quantum-Tech[®]) emitindo em 630 nm, com perfil gaussiano. Os seguintes parâmetros de iluminação foram adotados: *dose* ou fluência (D) de 150 J/cm² e *irradiância* (I) de 250 mW/cm² e, portanto, um tempo de iluminação de 600 s. Para os três animais, utilizou-se uma concentração (C) de 1,5 mg de FS por quilograma de massa corpórea. As regiões iluminadas foram delimitadas por máscaras de alumínio envoltas em gaze de algodão, de forma que apenas as áreas desejadas fossem iluminadas.

Figura 34: Perfil gaussiano do feixe do laser para uma intensidade com máximo de 158 mW/cm².

No animal 1, a aplicação foi realizada numa região circular, de 1 cm², no centro do lobo esquerdo do fígado, para avaliar a variação da distribuição da droga localmente (Figura 35). Antes da aplicação da TFD, a fluorescência foi coletada para pontos afastados cerca de 3 mm uns dos outros, no interior da área iluminada.

No animal 2 foi aplicada a TFD em duas regiões circulares, de área de 0,5 cm² cada, uma no centro do lobo esquerdo do animal e outra próxima à extremidade do mesmo, de forma a observar a diferença no efeito fotodinâmico com perfis semelhantes de iluminação (Figura 35b). Para este animal coletou-se também a fluorescência no centro das regiões iluminadas durante o período entre a aplicação do FS e a iluminação. Para o animal 2, o feixe do *laser* foi desfocado de forma que ambas as regiões consideradas para iluminação ficassem inseridas na região central do feixe *laser* (a região de máxima emissão do *laser*).

Figura 35: Esquema da iluminação para obtenção das necroses no fígado. (a) animal 1; (b) animal 2; (c) animal 3. As regiões em vermelho correspondem às necroses, e os detalhes abaixo das figuras correspondem a cortes nas linhas cinzas traçadas.

Para o animal 3, utilizou-se uma fibra óptica com uma lente acoplada à sua saída, de forma que se obtivesse um perfil uniforme de irradiação do tecido. Neste animal, iluminou-se duas regiões retangulares de 0,5 cm² (dimensões 2 mm x 2,5 cm), afastadas de aproximadamente 4 mm, de forma que as regiões iluminadas também se situassem uma na região central do lobo esquerdo e outra próxima de sua extremidade – tal qual para o animal 2, para que se pudesse confirmar os resultados deste eliminando a variação de iluminação existente para o *laser* com perfil gaussiano de emissão (Figura 35c).

Após a aplicação da TFD, os animais foram suturados e mantidos vivos por trinta horas, após as quais foram anestesiados, tiveram seus fígados removidos e foram mortos na sequência (segundo os protocolos e normas da seção 2.2.2 do capítulo 2). As regiões iluminadas, apresentando necrose, foram removidas dos fígados e lâminas histológicas foram preparadas a partir delas no próprio Laboratório de Biofotônica. A observação destas lâminas permitiu, com o uso de uma lupa Zeiss equipada com parafusos micrométricos, a medida do perfil de profundidade de necrose apresentado em cada região iluminada. Estes perfis foram então comparados com os perfis previstos para as necroses a partir do modelo de previsão da Y_{nec} (descrito na próxima seção), utilizando a função de concentração do FS obtidas pela relação estabelecida com a espectroscopia de fluorescência.

4.2.5. Modelo para correlação profundidade de necrose (Y_{nec}) - concentração

O modelo utilizado para a previsão da profundidade de necrose, elaborado por trabalhos anteriores realizados no grupo [44], será explicado na sequência.

A distribuição espacial da luz em um tecido pode ser descrita por uma função do tipo

$$D(y) = D_0 \cdot \exp(-\gamma \cdot y), \quad (4)$$

onde y representa a profundidade avaliada no tecido, $D(y)$ representa a intensidade de luz por cm^2 (dose/fluência) em uma dada profundidade y no tecido, D_0 representa a dose inicial atingindo a superfície do tecido (considerando a iluminação do tecido como uniforme) e γ representa o coeficiente de atenuação de intensidade efetivo da luz (Figura 36a). O coeficiente de atenuação γ pode ser considerado como sendo uma composição dos coeficientes de espalhamento μ_s e de absorção μ_a , tal que

$$\gamma = \mu_s + \mu_a(x). \quad (5)$$

No modelo original, a concentração do FS no tecido é considerada constante ($C = \text{constante}$). No presente trabalho, aplicou-se uma modificação a este modelo original com base nos resultados obtidos, modificação esta que leva em conta a variação da concentração do FS nas variadas regiões do tecido. Desta forma, neste trabalho, considerou-se o modelo tomando, porém, a concentração como variando com x , ou seja, com a posição na superfície do tecido (Figura 36b).

Figura 36: (a) Esquema demonstrando a diminuição da intensidade de luz (dose D) como função da penetração (y); (b) representação esquemática da profundidade de necrose Y_{nec} , onde D é a luz incidente e Y_{nec} a linha observada e medida nas lâminas histológicas, delimitando a fronteira entre o tecido necrosado e sadio.

Assim, o coeficiente de absorção, por sua vez, depende da concentração local do FS e, portanto, varia com x ($\mu_a = \mu_a(x)$) conforme a equação (6), onde μ_{a0} é o coeficiente de absorção do tecido e α o coeficiente que determina a contribuição do FS na absorção da luz:

$$\mu_a = \mu_{a0} + \alpha \cdot C(x) \quad (6)$$

Para que se verifique necrose do tecido, é preciso que a dose de luz seja igual ou superior a uma dose limiar de luz (D_{th}), a qual depende da concentração do FS ($C(x)$), ou seja, $D_{th} = D_{th}(C(x))$.

Dividindo ambos os lados da equação (4) por D_0 e aplicando sobre eles a função $\ln$, temos

$$\ln\left(\frac{D_{th}(C_x)}{D_0}\right) = -\gamma \cdot Y_{nec} \quad (7)$$

Segundo o modelo proposto, D_{th} é inversamente proporcional à concentração $C(x)$, e ambas são relacionadas por uma constante A :

$$D_{th}(C(x)) = \frac{A}{C(x)} \quad (8)$$

Também conforme este modelo, os coeficientes de absorção μ_{a0} e α são descritos, respectivamente, por:

$$\mu_{a0} = \frac{1}{\delta_0} \quad \text{e} \quad \alpha = \frac{\beta}{\delta_0}$$

sendo δ_0 a profundidade média de penetração da luz relacionada ao efeito de absorção, de forma que

$$\gamma(x) \cong \frac{(1 + \beta \cdot C(x))}{\delta_0} \quad (9)$$

Após as manipulações algébricas necessárias das equações (7) e (9), chegamos finalmente ao modelo para previsão da Y_{nec} da equação (10):

$$Y_{nec}(x) = \left(\frac{\delta_0}{1 + \beta \cdot C(x)} \right) \cdot \ln \left(\frac{D_0 \cdot C(x)}{A} \right). \quad (10)$$

Para as reproduções das profundidades de necrose observadas nas lâminas histológicas, utilizou-se os valores dos parâmetros A , β e δ_0 iguais aos obtidos no trabalho original, sendo $A = 30 \text{ J.kg/mg.cm}^2$, $\beta = 0,4 \text{ kg/mg}$ e $\delta_0 = 1,3 \text{ mm}$. O valor para o parâmetro D_0 é igual à dose de luz aplicada e, portanto, equivale a 150 J/cm^2 (conforme a seção 4.2.4).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Obtenção dos espectros de fluorescência no fígado

Após a remoção da autofluorescência dos espectros obtidos em cada ponto investigado (ver Figura 37), observou-se variação na intensidade de fluorescência nos variados pontos onde foram obtidos os espectros no interior do fígado. Os máximos de emissão para o pico em 619 nm são apresentados em um gráfico de curvas de nível como função da posição em que foram coletados (Figura 38). Este gráfico representa a distribuição do FS nas regiões consideradas do tecido hepático. Na sequência, observam-se os gráficos dos máximos de emissão como função da posição ao longo dos eixos em que foram obtidos (Figuras 39, 40 e 41).

Figura 37: Exemplo da subtração da AF de um espectro. Na figura, verifica-se o espectro do tecido hepático na fatia A, no eixo central com sua AF, a própria AF deste ponto e a fluorescência do ponto depois de descontada a AF.

Figura 38: Curva de nível com base nos máximos de emissão, representando a distribuição de FS no tecido hepático. Os eixos 1, 2 e 3 são, respectivamente, os eixos denominados Inferior, Central e Superior, e posições das fatias são equivalentes a 1=A, 2=B, 3=C, 4=D, 5=E, 6=F, 7=G, 8=H, 9=I, 10=J, 11=K, 12=L, 13=M, 14=N e 15=O.

Figura 39: Máximos de fluorescência medidos ao longo do eixo Superior no interior do fígado. Verifica-se que o máximo de emissão encontra-se na região onde a veia cava chega ao fígado próximo às fatias H e I, e que há dois máximos entre as regiões centrais e as extremidades de cada lobo (fatias C e N).

Figura 40: *Máximos de fluorescência medidos ao longo do eixo Central no interior do fígado.* O máximo de emissão encontra-se na região onde a veia cava chega ao fígado (próximo às fatias H e I), e segundo a curva estimada há dois máximos nas regiões centrais dos lobos (fatias C e L).

Figura 41: *Máximos de fluorescência medidos ao longo do eixo Inferior no interior do fígado.* O máximo de emissão encontra-se na região onde a veia cava chega ao fígado (próximo às fatias H e I), não apresentando os máximos próximos ao centro dos lobos como os outros eixos.

Verificou-se grande variação nas intensidades de fluorescência para os variados pontos investigados no interior do fígado, conforme as Figuras 38 a 41

demonstram. Pode-se ver melhor por meio da Figura 38 que há regiões em que o FS concentra-se mais do que em outras. Verifica-se também este resultado quando se avalia a fluorescência através da superfície do lobo (obtida seguindo o eixo central – Figura 42), conforme realizado na primeira etapa desta fase do trabalho⁶⁾.

Figura 42: Máximos de fluorescência medidos ao longo do eixo Central na superfície do fígado. O máximo de emissão encontra-se na região onde a veia cava chega ao fígado (próximo à fatia I), com máximos por volta das regiões das fatias D e L.

A diferença entre as posições dos máximos nas medidas da superfície e do interior do fígado pode estar relacionada com a distribuição dos vasos em diferentes regiões do órgão. Além disso, a estrutura dos vasos pode ser ligeiramente diferente de um animal para outro, ocasionando pequenas alterações nas posições em que os máximos foram observados.

Com base nos valores de máximo das intensidades de emissão de fluorescência, foram estabelecidas relações de tal forma que o máximo de fluorescência verificado fosse equivalente ao máximo de concentração possível no

⁶⁾ Os máximos apresentados no gráfico foram considerados após a remoção da AF.

tecido (ou seja, àquela aplicada no animal, $C = 1,5 \text{ mg/kg}$). Baseado nos valores de concentração obtidos a partir desta relação, estimou-se uma função concentração para cada eixo investigado (Figuras 43 a 45).

Figura 43: Curvas para a concentração estimada de FS ao longo do eixo superior, obtida pela relação direta com a intensidade de fluorescência observada.

Figura 44: Curvas para a concentração estimada de FS ao longo do eixo central, obtida pela relação direta com a intensidade de fluorescência observada.

Figura 45: *Curvas para a concentração estimada de FS ao longo do eixo inferior, obtida pela relação direta com a intensidade de fluorescência observada.*

4.3.2. Profundidades de necrose e sua relação com a fluorescência

A Y_{nec} obtida para o animal 1 é apresentada na Figura 46, junto do perfil de necrose medido através do exame histológico. Como se pode ver, o perfil da necrose quase coincide com o feixe gaussiano do *laser*, um indício de que a concentração do FS naquela região é praticamente uniforme.

Figura 46: Perfil de necrose obtido para as medidas de Y_{nec} no animal 1.

Observando as curvas de fluorescência e de concentração estimadas na região equivalente à iluminada (região central do lobo esquerdo, equivalente à região da fatia C), verifica-se que a intensidade de fluorescência tem pouca variação para a área circular considerada (1 cm², abrangendo pouco mais do que a “fatia” iluminada) e que, portanto, este resultado representa uma pequena variação na distribuição do FS localmente. A fluorescência medida em pontos ao longo do diâmetro da circunferência previamente à aplicação (apresentada na Figura 47 já como a estimativa relacionada à concentração) também não mostra variações significativas.

Figura 47: Máximos do primeiro pico de fluorescência para pontos afastados de 3 mm uns dos outros no interior da área iluminada do animal 1. A pouca variação na concentração dentro da mesma área está dentro do erro, do que se pode inferir a uniformidade da concentração nesta região.

Quando se observa o resultado de necrose obtido para o animal 2 (Figura 48), entretanto, verifica-se uma diferença de aproximadamente 0,2 mm entre os valores médios das Y_{nec} observadas, sendo mais profunda a necrose mais distante da região central do lobo esquerdo do fígado. As necroses obtidas no animal 3, com um perfil uniforme de iluminação (ou seja, descontando prováveis efeitos do perfil gaussiano do *laser* na iluminação), mostraram o mesmo resultado, com aproximadamente a mesma diferença entre as regiões (Figura 49).

Figura 48: Perfil de necrose obtido para as medidas de Y_{nec} no animal 2. Nos perfis, as linhas horizontais apontam os valores médios das necroses, evidenciando a variação entre as necroses em cada região.

Figura 49: Perfil de necrose obtido para as medidas de Y_{nec} no animal 3. Nos perfis, as linhas horizontais apontam os valores médios das necroses, evidenciando a variação entre as necroses em cada região.

Figura 50: Máximos do primeiro pico de fluorescência do FS no fígado para o animal 2, nos pontos medial e distal do lobo esquerdo do fígado, com as linhas horizontais apontando as respectivas médias de intensidade. É clara a diferença de intensidade de fluorescência entre ambas as regiões.

Pode-se explicar essa relação inversa entre a intensidade de fluorescência e, portanto, de concentração do FS com a necrose através da absorção da luz – o coeficiente de absorção de luz do tecido aumenta com a concentração do absorvedor. Uma vez que a concentração de FS aumenta, a absorção de luz é maior conforme esta penetra no tecido, de forma que menos luz chega a profundidades maiores. Em virtude disto, a intensidade de luz com a profundidade cai mais rapidamente para maiores concentrações de FS. Desta forma, deixa de haver intensidade suficiente para alcançar-se D_{th} – e, portanto, necrose – em profundidades menores do que quando se têm concentrações menores.

Desta forma, pode-se relacionar a fluorescência coletada nas várias regiões do lobo com os dados de necrose obtidos, corroborando o resultado de que a distribuição do FS no fígado de ratos saudáveis não é homogênea, obtido a partir das relações estabelecidas (cujos resultados se apresentam nas Figuras 43 a 45). Além

disso, esta heterogeneidade se reflete nos perfis de necrose observados nas Figuras 46, 48 e 49 através da própria irregularidade das necroses, bem como entre elas.

Uma vez que se encontram variações nos efeitos fotodinâmicos em uma mesma região de necrose e, principalmente, em regiões de necrose distintas no mesmo órgão - as quais tiveram o mesmo perfil de iluminação e a mesma concentração de FS aplicada, é possível deduzir que em outros tecidos isto também venha a ocorrer. Tal resultado e suas conseqüências mostram a importância de se conhecer a distribuição do FS no tecido a ser tratado e da espectroscopia de fluorescência como instrumento para a determinação desta distribuição, uma vez que os resultados obtidos mostram que é possível prever com melhor acurácia os perfis de necrose quando se conhece a concentração local do FS no tecido (como se verifica nos resultados apresentados na Figura 53, na próxima seção).

4.3.3. Proposição de ajuste ao modelo

Tomando-se o modelo para previsão da Y_{nec} e utilizando-se um valor constante de concentração do FS no lugar de $C(x)$ – como costuma ser assumido nas aplicações clínicas atuais – obtemos:

Figura 51: Perfil de necrose previsto através da função do modelo Y_{nec} para $C(x) = \text{constante} = 1,5$ mg/kg para uma área iluminada de 1 cm^2 .

Entretanto, quando se observam as necroses, percebe-se que o comportamento não segue exatamente este perfil (Figuras 46, 48 e 49). Uma vez verificada a não-uniformidade da distribuição do FS no tecido, é possível buscar funções que descrevam como o FS concentra-se no tecido investigado.

Como é possível perceber na Equação (10), $C(x)$ não é de simples determinação, uma vez que ao se tentar isolá-la, obtém-se uma função que depende dela mesma (como se vê na Equação (11), onde $C(x)$ – sublinhada – depende da própria $C(x)$).

$$\underline{\underline{C(x)}} = \left(\frac{\delta_0}{Y_{nec}(x) \cdot \beta} \right) \cdot \ln \left(\frac{D(x) \cdot \underline{\underline{C(x)}}}{A} \right) - 1/\beta \quad (11)$$

Entretanto, o logaritmo de um produto é igual à soma dos logaritmos, de forma que podemos isolar $\ln(C(x))$ dentro da expressão, como segue:

$$\underline{\underline{C(x)}} = \left(\frac{\delta_0}{Y_{nec}(x) \cdot \beta} \right) \cdot \left[\ln \left(\frac{D(x)}{A} \right) + \ln(\underline{\underline{C(x)}}) \right] - 1/\beta \quad (12)$$

Para isolar $C(x)$, pode-se recorrer a uma expansão em séries de MacLaurin[45], considerada até o polinômio de segunda ordem (Equação (13)):

$$\ln(x) = (x-1) - \frac{(x-1)^2}{2} + (...) \quad (13)$$

Substituindo (13) em (12) e fazendo as manipulações algébricas necessárias, tem-se:

$$C^2(x) + \left(\frac{2 \cdot \beta \cdot Y_{nec}(x)}{\delta_0} \right) \cdot C(x) - 2 \cdot \ln\left(\frac{D(x)}{A} \right) + 1 + \frac{2 \cdot Y_{nec}(x)}{\delta_0} = 0 \quad (14)$$

A equação (14) é uma equação de segundo grau dependente de $C(x)$. Uma de suas soluções resulta sempre em $C(x) < 0$, a qual será descartada, visto que a concentração não pode ser negativa. A outra solução representará nossa função $C(x)$, a seguir (Equação (15)):

$$C(x) = -\frac{\beta \cdot Y_{nec}(x)}{\delta_0} + \sqrt{\left(\frac{\beta \cdot Y_{nec}(x)}{\delta_0} \right)^2 + 2 \cdot \ln\left(\frac{D(x)}{A} \right) - \frac{2 \cdot Y_{nec}(x)}{\delta_0} - 1} \quad (15)$$

Conhecido o perfil de iluminação $D(x)$ (no caso do *laser* utilizado, um perfil gaussiano), os parâmetros β , δ_0 e A (os mesmos utilizados em trabalhos anteriores) e com as medidas de $Y_{nec}(x)$ realizadas, pode-se determinar pontos para $C(x)$ e, a partir deles, estimar-se uma função dependente apenas de x para a concentração (Figura 52).

Figura 52: Pontos para $C(x)$ a partir da Equação (15) e a função estimada para a concentração – a qual trata-se de um polinômio de grau 5.

A curva ajustada para corresponder aos valores de concentração obtidos equivale a:

$$C(x) = 0,817 + 0,865 \cdot x + 0,055 \cdot x^2 - 0,017 \cdot x^3 + 0,004 \cdot x^4 + 0,0007 \cdot x^5 \quad (16)$$

Para as curvas de concentração $C(x)$ obtidas através deste processamento, estimou-se as Y_{nec} e foram comparados os valores das profundidades de necrose medidos, os previstos segundo o modelo para uma concentração constante e aqueles previstos com a função da concentração $C(x)$ estimada na Equação (16).

Figura 53: Gráfico comparando as Y_{nec} : os pontos pretos são os valores medidos para a profundidade de necrose de uma lâmina observada, os pontos azuis representam a aplicação do modelo para uma concentração constante $C=1,5$ mg/kg de massa corpórea, e os pontos vermelhos representam a previsão da necrose para a função $C(x)$ obtida com base na informação de que $C(x)$ não é constante.

Observando a Figura 53, percebe-se que o ajuste aos pontos de Y_{nec} ao considerar a não-uniformidade da distribuição do FS no tecido é melhor do que quando esta não é considerada. Flutuações que fazem com que certos pontos de necrose sejam menores que os esperados/previstos (como acontece na região de x entre -2 e -1) devem-se à arquitetura do tecido. Verificou-se que a presença de um vaso na região necrosada (neste caso, exatamente na região em que se observa uma menor necrose, na região entre $-2 < x < -1$) pode diminuir o efeito fotodinâmico à sua volta. O modelo não prevê este fenômeno e sua razão precisa ser investigada, mas há indícios de que isso ocorra devido à grande absorção da luz pelo vaso sanguíneo, na região do vermelho do espectro eletromagnético (Figura 54).

Figura 54: *Absorção da luz pelo vaso sanguíneo.* A região branca no centro é um feixe circular de luz vermelha (630 nm), focado sobre um vaso sanguíneo presente numa peça de tecido humano. Os gráficos acima e à direita representam, em escalas arbitrárias, a intensidade de luz captada pela câmera nas linhas que interceptam o vaso na figura.

É razoável, a partir dos dados obtidos, considerar que a distribuição de vasos no tecido afeta a distribuição do FS nas variadas regiões do órgão. Da mesma forma, o calibre dos vasos varia muito em uma mesma região conforme estes se ramificam para levar sangue às diversas partes do órgão e, portanto, o fluxo de sangue varia conforme a região – o que pode ocasionar a distribuição irregular de FS em diferentes regiões do mesmo órgão.

Nota-se ainda que as variações observadas pela fluorescência a nível local, quando foram feitas as medidas na superfície de uma pequena região (para o animal 1 em que foi aplicada a TFD visando necrose), tiveram pouca diferença de intensidade, o que a princípio poderia ser atribuído a imprecisões da medida em si, mas verifica-se através do resultado obtido para a previsão da necrose que realmente

há diferença na distribuição do FS entre os pontos observados, uma vez que a área considerada para as necroses é a mesma em que foi observada a fluorescência. Assim, ainda que não se domine a técnica de espectroscopia de fluorescência a ponto de ser possível obter os valores precisos de concentração com base na intensidade de fluorescência coletada, verifica-se que é possível observar variações de intensidade (e, com base nelas, de concentração) bastante sensíveis.

4.4. Conclusões

Através desta fase do trabalho, foi possível avaliar a distribuição do FS Photogem[®] no tecido hepático. Verificou-se que a distribuição do FS não é homogênea, variando conforme a região investigada do tecido, com maior concentração nas regiões centrais dos lobos investigados e na região onde a veia cava chega ao órgão. A espectroscopia de fluorescência mostrou-se uma ferramenta útil pra tal avaliação, e embora não tenha sido possível a quantificação da concentração do FS Photogem no fígado através dela, foi possível estimar sua distribuição através do melhor ajuste para a curva de concentração obtida pela correlação entre a fluorescência do FS no tecido e o modelo para previsão da profundidade de necrose utilizado. Com o conhecimento sobre a não-uniformidade da distribuição do FS, foi possível melhorar este mesmo modelo ao se considerar as variações de concentração locais, obtendo-se um ajuste melhor para as curvas previstas para as linhas de necrose.

Os resultados obtidos mostram-se de grande relevância para a dosimetria da TFD, pois a concentração do FS é um dos parâmetros que precisam ser conhecidos e controlados para que seja possível determinar com precisão o efeito fotodinâmico no tecido. A espectroscopia de fluorescência apresentou-se como uma boa técnica para este tipo de avaliação, por fornecer uma relação entre a intensidade e a concentração do FS. Entretanto, as dificuldades de coleta devidas à turbidez do meio não permitiram a obtenção de medidas quantitativas, o que faz com que, até o presente momento, ainda não se possa afirmar que a técnica é o melhor recurso para tanto. Contudo, os resultados sugerem que, com o domínio dos fenômenos que interferem

na coleta de fluorescência e com a técnica necessária para contornar os problemas de geometria dessa coleta, pode-se chegar num futuro próximo a uma coleta com precisão satisfatória da intensidade de fluorescência. Por isso, o estudo da interação entre luz e meio turvo precisa ter continuidade, para que se verifique a possibilidade do uso da técnica para a quantificação de concentração de FS em tecido. Através desses novos estudos, portanto, é que se pretende alcançar o objetivo principal deste trabalho: a quantificação do FS presente num tecido fotossensibilizado, de forma a melhorar os protocolos clínicos da TFD.

5. Conclusões Gerais

Considerando todos os procedimentos experimentais realizados ao longo deste trabalho, foi possível chegar a um conjunto de conclusões, relacionadas aos objetivos propostos. O primeiro objetivo enunciado no Capítulo 1 não foi atingido - não foi possível obter informação quantitativa com relação a fluoróforos presentes, devido a uma infinidade de interações que a luz sofre ao percorrer meios turvos, o que ficou evidente nos resultados dos Capítulos 2 e 3. O grande número de fatores de interação presentes contribui com a fluorescência final observada e não pode ser desconsiderado sem prejuízo da avaliação realizada. Por causa destas interferências, não foi possível determinar as contribuições dos compostos endógenos para o espectro do fígado no Capítulo 2, nem recuperar completamente as misturas das anilinas comestíveis no Capítulo 3. Nos experimentos *in vivo* deste Capítulo também foi possível observar como a dinâmica metabólica influencia na observação da fluorescência.

O segundo e o terceiro objetivos propostos foram plenamente alcançados. Foi possível demonstrar que a concentração do fotossensibilizador Photogem[®] no lobo esquerdo e em porção do lobo direito do fígado sadio de um rato Wistar muda conforme a posição em que a fluorescência é investigada, concentrando-se em porções centrais dos lobos e na região onde a veia cava inferior chega ao órgão. A

importância de se levar em conta esta não-homogeneidade ao aplicar a TFD foi mostrada pelos resultados das necroses e das previsões para as Y_{nec} melhor ajustadas às necroses medidas quando se levou em conta esta variação. Apesar de não ser possível quantificar a concentração local com base na intensidade, foi possível estabelecer uma relação entre as intensidades obtidas e as concentrações locais. Embora esta ainda não seja a quantificação pretendida, ela já permite melhorar a estimativa da quantidade de FS presente numa dada região do tecido, o que poderá contribuir com o aumento na precisão da estimativa da quantidade de luz necessária (dose limiar) para que a região em que se espera necrose realmente a desenvolva, destruindo o tecido alterado que se deseja combater com a TFD.

O objetivo de melhorar o modelo pré-estabelecido em trabalhos pregressos para a previsão da profundidade de necrose também foi atingido. Neste modelo considerava-se tanto a distribuição da luz quanto do fotossensibilizador como sendo constantes e, com base nas informações e dados obtidos a partir de Y_{nec} advindas da leitura das lâminas histológicas de necrose, trabalhou-se matematicamente o modelo de forma a alcançar uma função que descreve a concentração de fotossensibilizador com relação à posição investigada. O modelo para previsão da Y_{nec} , ao ter a concentração constante substituída pelo polinômio obtido, mostrou-se melhor ao descrever a curva obtida para a necrose lida nas lâminas histológicas.

Como discutido ao longo de todo o trabalho, para se resolver as dificuldades ainda enfrentadas pela TFD como técnica de combate a diversas lesões, é preciso quantificar a concentração do FS no tecido a ser tratado, de forma a se controlar melhor o efeito fotodinâmico e ter respostas mais favoráveis clinicamente. A fluorescência parece ser o melhor meio de fazê-lo, devido às facilidades citadas no começo do trabalho (em especial, por ser uma técnica não-invasiva, que não

necessita de análises e com resultado em tempo real), mas enfrenta-se com ela a dificuldade de compreender a forma como as interações que a luz sofre com um meio turvo interferem com a fluorescência observada, de maneira tal que seja possível obter precisão na identificação e quantificação dos espectros coletados. Em virtude disso, ainda não é possível saber se a fluorescência será a melhor técnica para se obter a quantificação de FS num tecido, sendo exigidos mais estudos acerca do tema para se conseguir um resultado conclusivo. Assim, os resultados obtidos nesse trabalho certamente estimulam a continuidade dos estudos sobre a interação da luz em meios turvos. Eles sugerem que, uma vez que se obtenha o domínio da técnica e da fenomenologia necessários para lidar com as interferências na coleta de fluorescência bem como com os problemas com a geometria dessa coleta, será possível chegar num futuro não tão distante a uma coleta com precisão satisfatória da intensidade de fluorescência. Isto permitiria alcançar, então, o objetivo principal a que este trabalho se propôs, sendo sua grande motivação: a quantificação de FS presente num tecido fotossensibilizado, de forma a otimizar os protocolos clínicos de TFD, tornando-a uma técnica mais efetiva contra lesões diversas, em especial o câncer.

ANEXO

Parecer de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 044/2006, sobre o projeto intitulado, “*Efeitos da ação fotodinâmica através da fluorescência óptica e avaliação de tempo de óbito em animais*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Vanderlei Salvador Bagnato**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **29 de maio de 2006**.

(We certify that the protocol nº 044/2006, about “*Effects of photodynamic action through of Optical fluorescence and evaluation of death time in animals*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **05/29/2006** meeting).

Ribeirão Preto, 05 de junho de 2006.

Profa. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI
Vice-Presidente da Comissão
de Ética em Experimentação Animal

Bibliografia

1. LOSCHENOV, V.B., KONOV, V. I., PROKHOROV, A. M., Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics. *Laser Phys.* v.10, n.6, p. 1188-207, 2000.
2. YU, G. et al., Real-time In Situ Monitoring of Human Prostate Photodynamic Therapy with Diffuse Light. *Photochem Photobiol.* v.8, p. 1279-84, 2006.
3. WOLFSEN, H.C., Present status of photodynamic therapy for high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *J Clin Gastroenterol.* v. 39, n.3, p. 189-202, 2005.
4. VITTAR, N.B.R. et al., Promotion of Photodynamic Therapy-induced Death - Laboratory Experimental Methodology. *Biochemistry and Molecular Biology Education.* v.30, n.5, p. 303-305, 2002.
5. NIEDRE, M.J. et al., In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy. *Cancer Res*, v.63, n.22, p. 7986-94, 2003.
6. DOUGHERTY, T.J., Photosensitizers - Therapy and Detection of Malignant-Tumors. *Photochem Photobiol*, v.45, n.6, p. 879-89, 1987.
7. KURACHI, C., CESTARI, G., BAGNATO, V.S., Photodynamic therapy in the treatment of oral lesions. *J Dent Res*, v.82, p. 217, 2003.
8. MULLER, P.J., WILSON, B.C., Photodynamic therapy of brain tumors - A work in progress. *Laser Surg Med*, v.38, n.5, p. 384-9, 2006.
9. ZHU, T.C., FINLAY, J.C., HAHN, S.M., Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in-vivo in human prostate during motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy. *J Photoch Photobio B*, v.79, n.3, p. 231-41, 2005.
10. GROSSWEINER, L.I., PDT light dosimetry revisited. *J Photoch Photobio B*, v.38, n.2-3, p.258-68, 1997.
11. DOUGHERTY, T.J. et al., Photodynamic therapy. *J Natl Cancer I*, v.90, n.12, p. 889-905, 1998.
12. PATTERSON, M.S., WILSON, B.C., GRAFF, R., Invivo Tests of the Concept of Photodynamic Threshold Dose in Normal Rat-Liver Photosensitized by Aluminum Chlorosulfonated Phthalocyanine. *Photochem Photobiol*, v.51, n.3, p.343-9, 1990.
13. OSAKI, T. et al., Intracellular localization and concentration as well as photodynamic effects of benzoporphyrin derivative monoacid ring A in four types of rodent tumor cells. *Cancer Lett*, v.243, n.2, p.281-92, 2006.
14. WYLD, L., REED, M.W., BROWN, N.J., Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer*, v.84, n.10, p.1384-6, 2001.
15. ZULUAGA, A.F. et al., Fluorescence excitation emission matrices of human tissue: A system for in vivo measurement and method of data analysis. *Appl Spectrosc*, v.53, n.3, p. 302-11, 1999.
16. GEORGAKOUDI, I. et al., NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. *Cancer Res*, v.62, n.3, p.682-7, 2002.

17. BADIZADEGAN, K. et al., Spectroscopic diagnosis and imaging of invisible pre-cancers. *Faraday Discuss*, n.126, p. 265-79, 2004.
18. SOKOLOV, K., FOLLEN, M., RICHARDS-KORTUM, R., Optical spectroscopy for detection of neoplasia. *Curr Opin Chem Biol*, v.6,n.5, p.651-8, 2002.
19. WAGNIERES, G.A., STAR, W.M., WILSON, B.C., In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol*, v. 68, n.5, p.603-32, 1998.
20. RAMANUJAM, N., Fluorescence Spectroscopy in vivo. In: R.A. MEYERS, Ed., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2000. p. 20-56.
21. LAKOWICZ, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 1.ed. New York: Plenum Press, 1983. V.1, p. 496.
22. GEORGAKOUDI, I., FELD, M. S., MÜLLER, M.G., Intrinsic fluorescence spectroscopy of biological tissue. In: MYCEK, M., POGUE, B.W., ed. *Handbook of Biomedical Fluorescence*, New York, Marcel Dekker, 2003. p.109-42.
23. WU, J., FELD, M.S., RAVA, R.P., Analytical Model for Extracting Intrinsic Fluorescence in Turbid Media. *Appl Optics*, v.32, n.19, p.3585-95, 1993.
24. GEORGAKOUDI, I., The color of cancer. *J Lumin*, v.119, p. 75-83, 2006.
25. ISHIMARU, A., Diffusion of Light in Turbid Material. *Appl Optics*, v. 40, n.25, p.2210-5, 1989.
26. MULLER, M.G. et al., Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. *Appl Optics*, v.40, n.25, p.4633-46, 2001.
27. BISWAL, N.C. et al., Recovery of turbidity free fluorescence from measured fluorescence: an experimental approach. *Opt Express*, v. 11, n.24, p. 3320-31, 2003.
28. ZHANG, Q.G. et al., Turbidity-free fluorescence spectroscopy of biological tissue. *Opt Lett*, v.25, n.19, p. 1451-3, 2000.
29. WELCH, A.J. et al., Propagation of fluorescent light. *Laser Surg Med*, v. 21, n.2, p.166-78, 1997.
30. ZHANG, Q. et al., Turbidity-free fluorescence spectroscopy of biological tissues. *Opt Lett*, v.25, n.19, p. 1451-3, 2000.
31. WAGNIERES, G. et al., An optical phantom with tissue-like properties in the visible for use in PDT and fluorescence spectroscopy. *Phys Med Biol*, v.42, n. 7, p. 1415-26, 1997.
32. DACOSTA, R.S., ANDERSSON, H., WILSON, B.C., Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. *Photochem Photobiol*, v.78, n.4, p.384-92, 2003.
33. HOFFMAN, K., KUNZE, R., *Linear Algebra*. 2.ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, 1971.
34. ATKINS, P.W., DEPAULA, JULIO, *Physical chemistry*. 7.ed. New York: W.H. Freeman, 2002. p. xxi, 1139.
35. WEISSBLUTH, M., *Atoms and molecules*. Student ed. New York: Academic Press, 1978. p. xvi, 713.
36. MANG, T.S. et al., Fluorescence Detection of Tumors - Early Diagnosis of Microscopic Lesions in Preclinical Studies. *Cancer*, v.71, n.1, p. 269-76, 1993.

37. MOSTAAR, A., ALLAHVERDI, M., SHAHRIARI, M., Application of MNCP4C Monte Carlo in radiation dosimetry in heterogeneous phantom. *Radiother Oncol*, v. 73, p. S374-5, 2004.
38. OLIVEIRA, C. et al., Monte Carlo studies for irradiation process planning at the Portuguese gamma irradiation facility. *Appl Radiat Isotopes*, v.53, n. 4-5, p.867-75, 2000.
39. OLIVEIRA, C. et al., Monte Carlo simulation for dose distribution calculations in a CT-based phantom at the Portuguese gamma irradiation facility. *Nucl Instrum Meth B*, v. 213, p. 662-5, 2004.
40. DEWAR, D. et al., Efficient heterogeneous execution of Monte Carlo shielding calculations on a Beowulf cluster. *Radiat Prot Dosim*, v. 116, n. 1-4, p. 81-4, 2005.
41. MURPHYERDOSH, C. et al., The Cadherin-Binding Specificities of B-Cadherin and Lcam. *J Cell Biol*, v.129, n.5, p.1379-90, 1995.
42. JOPPEN, C., PETZINGER, E., FRIMMER, M., Properties of Iodipamide Uptake by Isolated Rat Hepatocytes. *N-S Arch Pharmacol*, v.331, n.4, p. 393-7, 1985.
43. LEHNINGER, A.L., D.L. NELSON, and M.M. COX, *Lehninger principles of biochemistry*. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1 v.
44. FERREIRA, J., *Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós Terapia Fotodinâmica - estudo in vivo*. Ribeirão Preto, 2003. 108 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
45. SWOKOWSKI, E.W., *Cálculo com Geometria Analítica*. 2 ed. São Paulo: Makron Books,1994. 2 v.