UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LILIAN TAN MORIYAMA

**Métodos simplificados para obtenção de distribuição da luz em tecidos
biológicos: aplicação para terapia fotodinâmica**

São Carlos - SP

2011

LILIAN TAN MORIYAMA

**Métodos simplificados para obtenção de distribuição da luz em tecidos
biológicos: aplicação para terapia fotodinâmica**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Física do Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador
Bagnato

Versão Original

São Carlos-SP

2011

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Moriyama, Lilian Tan

Métodos simplificados para obtenção de distribuição da luz em tecidos biológicos: aplicação para terapia fotodinâmica. / Lilian Tan Moriyama; orientador Vanderlei Salvador Bagnato -- São Carlos, 2011.

78 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Distribuição de luz. 2. Meios túrbidos. 3. Dosimetria. 4. Terapia fotodinâmica I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lilian Tan Moriyama

Tese apresentada ao Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada.

Aprovado(a) em: 17.06.2011

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Vanderlei Salvador Bagnato

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Andréa Simone Stucchi de Camargo Alvarez Bernardez

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Luciano Bachmann

Instituição: FFCLRP/USP

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Lilia Coronato Courrol

Instituição: UNIFESP

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Cleber Renato Mendonça

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Aos meu pais, com muito amor e gratidão, por terem me ensinado o valor da formação escolar, que sempre se empenharam e até se sacrificaram para que eu recebesse educação da melhor qualidade, por vibrarem comigo a cada conquista e por sempre me apoiaram. Se mais uma etapa de minha vida e carreira está se concluindo, devo isso a vocês.

Agradecimentos

Ao prof. Vanderlei Salvador Bagnato, que me orientou nesta tese e que sempre foi, para mim, um exemplo de profissional da ciência que sabe não só contribuir com o avanço da ciência em nosso país, mas também se preocupa em gerar pesquisas que beneficiem a sociedade.

À profa. Cristina Kurachi, pela amizade, pelo carinho, pelo apoio e pelas discussões sobre minha pesquisa.

Ao Clóvis, um grande amigo e colega de trabalho, peça fundamental do laboratório, sempre muito correto em suas atitudes, sempre sábio com suas palavras, sempre disposto a ajudar.

Ao Emery, por me ajudar com o MATLAB, pelas discussões sobre ciência e coisas da vida, pelos momentos agradáveis que você sempre proporcionou àqueles que o cercam.

Ao Daniel Bonini, meu amigo, meu médico, por todos os momentos que estive ao meu lado, pelas longas conversas sobre a vida e sempre solucionando minhas dúvidas sobre os processos biológicos a que devo me atentar em minhas pesquisas.

À Isabel, Benê e Cristiane, secretárias do Grupo de Óptica, pela atenção e ajuda que sempre dedicam a todos.

Às minhas amigas do lab: Hilde, Layla, Naty, Michelle, Paulinha. Competentes em suas pesquisas, meninas que tornaram o laboratório um ambiente mais feminino e que me proporcionam tantos bons momentos.

E aos demais alunos, pesquisadores e colaboradores do Laboratório de Biofotônica.

A FAPESP, pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

Aos funcionários e colaboradores do IFSC-USP.

RESUMO

MORIYAMA, L. T. **Métodos simplificados para obtenção de distribuição da luz em tecidos biológicos**: aplicação para terapia fotodinâmica. 2011. 78p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

A determinação da distribuição da luz em tecidos biológicos é importante para aplicações tais como a terapia fotodinâmica e o fotodiagnóstico. grande parte das aplicações se baseiam na luz que atinge a superfície do tecido e se propaga ao longo da profundidade. A combinação da absorção e do espalhamento leva aos perfis de intensidade que determinam a ação terapêutica. Os métodos existentes para a prever a distribuição da luz nos tecidos biológicos necessitam da determinação dos coeficientes ópticos do tecido, e demandam longo tempo computacional de modo que a aplicação em tempo real conjugada às fototerapias torna-se impossível. Considerando a terapia fotodinâmica, o contorno da necrose é determinado pela dose limiar. Portanto é importante assegurar uma intensidade de luz acima deste limiar na região onde deseja-se induzir necrose. Esta determinação envolve o conhecimento da distribuição da luz. Nesta tese são apresentados experimentos realizados em meios que simulem o comportamento óptico dos tecidos biológicos para estabelecer uma metodologia empírica para determinar a distribuição da luz. Este método baseia-se em medidas da intensidade de luz como função da posição espacial no interior do meio. Os dados são então armazenados em forma de uma matriz tridimensional. Usando esta matriz, operações matemáticas como soma, translação e rotação são utilizadas para compor diferentes campos de luz, ou seja, diferentes geometrias de iluminação. As medidas experimentais e as previsões teóricas foram comparadas demonstrando que o método proposto pode ser utilizado para recuperar a distribuição da luz em meios túrbidos para diversas geometrias de iluminação. Experimentos *in vivo* mostraram que este método pode ser bastante útil na determinação da dosimetria para terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: Distribuição de luz. Meios túrbidos. Dosimetria. Terapia fotodinâmica

ABSTRACT

MORIYAMA, L. T. **Simplified methods for obtaining the light distribution in biological tissues**: application in photodynamic therapy. 2011. 78p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

The determination of light distribution within biological tissues is important for applications such as photodynamic therapy and photodiagnostics. Most applications use light that reaches the tissue surface and propagates along the depth. The combination of absorption and scattering leads to light intensity profiles which determines the therapeutic action. Considering photodynamic therapy, necrosis contour is determined by the threshold intensity. Therefore it is quite important to assure intensity above the threshold at the region where necrosis is desired. This determination involves the knowledge of light distribution. In this study, we have developed an empirical method to determine light distribution in optical phantom. This method is based on experimental measurements of light intensity as a function of position inside the medium. The data were collected for a collimated narrow laser beam and arranged in a tridimensional matrix. Using this matrix, simple mathematical operations were used to simulate different conditions of irradiation geometry. Comparison between experimental measurements and mathematical simulations show that our method can be used to recover light distribution in biological tissue for any condition of illumination, since we have previously performed simple measurements in a sample using a narrow beam. In vivo experiments showed that this method can be very useful to the determination of photodynamic therapy dosimetry.

Key-words: Light distribution. Dosimetry. Turbid medium. Photodynamic therapy

Lista de Figuras

Figura 1–	Esquema de um feixe de luz incidindo sobre um tecido com ângulo θ_i com relação à normal de uma interface ar-tecido. Uma parte do feixe é refletido especularmente com ângulo θ_r e o restante é transmitido com ângulo θ_t 20	20
Figura 2 –	Reflexão especular de um raio de luz usando a equação de Fresnel para luz não polarizada incidindo através do ar em meios de índice de refração 1,5 e 1,33..... 21	21
Figura 3 –	Janela terapêutica óptica dos tecidos biológicos. As curvas mostram a absorbância dos principais componentes dos tecidos: água, Hb: hemoglobina, HbO2: oxihemoglobina e melanina. ⁹ 25	25
Figura 4 –	Sistema para aquisição dos dados..... 33	33
Figura 5 –	Recipiente plástico com água para procedimento de alinhamento fibra – feixe laser (à esquerda); Montagem experimental para medidas em solução de leite (à direita)..... 34	34
Figura 6 –	Gráficos de Intensidade de luz como função da profundidade (à esquerda) e Intensidade de luz como função da distância na superfície (à direita), cada curva representa uma concentração de leite..... 36	36
Figura 7–	Curvas de isointensidade para as diferentes concentrações de leite em pó..... 37	37

Figura 8 –	Curvas de isointensidade experimentais (pontos+linha cheia) superpostas com as curvas teóricas (linha cheia contínua), para 3 diferentes concentrações de leite utilizadas.....	39
Figura 9 –	Intensidade em função do raio para diferentes quantidades de corante azul. Os pontos se referem aos dados experimentais e as linhas aos ajustes feitos através da equação 12.....	40
Figura 10 –	Curvas de iso-intensidade para leite sem corante azul (à esquerda) e para leite com adição de 0,5 g de corante azul (à direita).....	40
Figura 11 –	Curvas de iso-intensidade para leite com adição de 1,5 g de corante azul (à esquerda) e para leite com adição de 3 g de corante azul (à direita).....	41
Figura 12 –	Curvas teóricas para leite sem corante azul e para leite com adição de 0,5 g de corante azul.....	41
Figura 13 –	Curvas teóricas para leite com adição de 1,5 g de corante azul e para leite com adição de 3 g de corante azul.....	42
Figura 14 –	Gráfico da razão $I(90^\circ)/I(\theta)$ como função de r , para diferentes valores de ângulo (θ).....	42
Figura 15 –	Esquema mostrando os diferentes posicionamentos dos obstáculos inseridos na solução de leite. À esquerda uma menor densidade de obstáculos e à direita uma maior densidade de obstáculos.....	44

Figura 16 – Gráfico de intensidade de luz vs distância na superfície para diferentes densidades de obstáculos: sem obstáculos (n), maior densidade de obstáculos (i) e menor densidade de obstáculos (☆).....	44
Figura 17 – Luz incidindo em um tecido biológico nas vizinhanças de um vaso sanguíneo.....	45
Figura 18 – Esquema do feixe incidente sobre o meio turbido.....	48
Figura 19 – Ilustração da definição do elemento de área ΔA	49
Figura 20 – Esquema das geometrias de iluminação utilizadas no experimento: 1 feixe colimado, 2 feixes colimados distantes cerca de 3 mm, feixe uniforme expandido de aproximadamente 8 mm de diâmetro e feixe inclinado.....	51
Figura 21 – Intensidade da luz relativa como função da profundidade para diferentes diâmetros de feixe incidente.....	52
Figura 22 – Curvas de isointensidade obtidas experimentalmente para as 3 geometrias de iluminação consideradas: A- 1 feixe, B- 2 feixes, C-feixe expandido.....	53
Figura 23 – Comparação entre as curvas teórica e experimental para a distribuição da luz na superfície do meio quando há dois feixes incidentes.....	54

Figura 24 –	Curvas de isointensidade obtidas da simulação para 2 feixes colimados distantes 3 mm um do outro.....	55
Figura 25 –	Curvas de isointensidade obtidas da simulação para feixe expandido.....	56
Figura 26 –	Distribuição da luz para feixe estreito e colimado incidindo perpendicularmente à superfície do phantom.....	57
Figura 27 –	Distribuição da luz para feixe incidindo a 53° com relação à normal.....	58
Figura 28 –	Distribuição da luz obtida através da rotação da distribuição do feixe com incidência normal. A distribuição foi rotacionada de 36° calculado a partir da Lei de Snell.....	59
Figura 29 –	Espectro de absorção do Photogem®.....	61
Figura 30 –	Esquema para iluminação do tecido-alvo (fígado) com laser de HeNe.....	62
Figura 31 –	Perfil de necrose induzido pela TFD com feixe incidindo normalmente à superfície do tecido.....	63
Figura 32 –	Perfil de necrose induzido pela TFD com feixe incidindo sobre a superfície do tecido à um ângulo de 24°.....	63

Figura 33 – Necroses induzidas em fígado de rato através de 64
Terapia Fotodinâmica para dois feixes estreitos e
feixe uniforme
expandido.....
.....

Sumário

1 Introdução	21
1.1 Interação da luz com tecidos biológicos: Definições gerais da óptica dos tecidos	21
1.1.1 Refração e Reflexão.....	22
1.1.2 Espalhamento	24
1.1.3 Absorção	25
1.2 Métodos existentes para a determinação da distribuição da luz em tecidos biológicos	27
1.3 Phantoms	28
1.4 Terapia Fotodinâmica.....	29
1.5 Objetivos	30
2 Delineamento experimental.....	33
2.1 Fonte de luz.....	33
2.2 Sistema de aquisição de dados	34
2.3 Distribuição da luz na superfície meio túrbido para posterior reconstrução da distribuição das intensidades de luz no interior do meio.....	35
2.3.1 Materiais e métodos	36
2.3.2 Resultados e Discussões:	37
2.3.3 Conclusões.....	47
2.4 Distribuição da luz em meios túrbidos: reconstrução a partir de uma matriz Mestre	48
2.4.1 Embasamento teórico e motivação:	49
2.4.2 Materiais e Métodos para uso do leite como <i>phantom</i>	52
2.4.3 Resultados e Discussão	54
2.4.4 Conclusões.....	61

2.5 Terapia Fotodinâmica in vivo	62
2.5.1 Resultados e discussão	64
2.5.2 Conclusões	67
3 Conclusões Gerais	69
4 Perspectivas futuras	71
Referências	73
Anexo	77

1 Introdução

O uso da luz e principalmente dos lasers nas áreas da saúde é alvo constante de pesquisas científicas.

O desenvolvimento tecnológico fez com que outras fontes de luz passassem a ser aplicadas na medicina. Atualmente, os diodos emissores de luz (LED) também são bastante empregados para bioestimulação, terapia fotodinâmica e diagnóstico por fluorescência¹⁻⁵.

Com essa crescente utilização da luz nas áreas da saúde, é importante que existam métodos para a determinação de parâmetros adequados para seu uso em cada situação. A forma como a luz vai interagir com um determinado tecido biológico vai depender das características e parâmetros da fonte de luz (como o comprimento de onda, a taxa de fluência e o tempo de irradiação) e das propriedades ópticas do tecido, que variam de tecido para tecido e de amostra para amostra. No entanto, todas as aplicações da luz, seja para fototerapias ou para o fotodiagnóstico, se baseiam na distribuição da luz para determinar os parâmetros a serem utilizados.

Em geral, a dosimetria para fototerapias são baseadas em resultados empíricos descritos na literatura e não leva em consideração as características individuais do tecido alvo.

Para entender a distribuição da luz em um meio, é preciso primeiramente entender os processos ópticos que estão envolvidos na propagação da luz.

1.1 Interação da luz com tecidos biológicos: Definições gerais da óptica dos tecidos

A propagação da luz em tecidos biológicos é influenciada por basicamente três processos fotofísicos: a refração, o espalhamento e a absorção.

1.1.1 Refração e Reflexão

Quando a luz se propaga em um material de determinado índice de refração encontra uma fronteira de outro material de índice de refração diferente, a trajetória da luz é redirecionada. Se a largura do feixe for pequena comparada à fronteira ou sua curvatura, ocorrem reflexão e transmissão refrativa.^{6, 7}

A fração de luz que é diretamente refletida na superfície depende do ângulo de incidência do feixe, dos índices de refração dos dois materiais e da polarização da onda incidente.

Se um feixe de luz é entregue ao tecido através do ar, uma parte do feixe é refletida na superfície devido à diferença no índice de refração do ar e do tecido, de acordo com as leis de Fresnel.

Figura 1 - Esquema de um feixe de luz incidindo sobre um tecido com ângulo θ com relação à normal de uma interface ar-tecido. Uma parte do feixe é refletido especularmente com ângulo θ e o restante é transmitido com ângulo θ' .

Utilizando as relações de Fresnell para reflexão especular para luz não polarizada e a lei de Snell, pode-se chegar à relação da reflectância com o ângulo de incidência, como observado na Figura 2.

Figura 2 - Reflexão especular de um raio de luz usando a equação de Fresnel para luz não polarizada incidindo através do ar em meios de índice de refração 1,5 e 1,33.

Segundo a relação de Fresnel para reflexão especular r é:

$$r = \frac{1}{2} \left[\frac{\tan^2(\theta - \theta')}{\tan^2(\theta + \theta')} + \frac{\sin^2(\theta - \theta')}{\sin^2(\theta + \theta')} \right] \quad (1)$$

em que θ e θ' são respectivamente os ângulos de incidência e transmissão medidos com relação à normal à superfície, como mostra a Figura 1. Para uma superfície lisa e plana, o feixe refletido tem o mesmo ângulo do feixe incidente. Mesmo com incidência normal, quando $\theta = 0$, uma pequena fração da luz é refletida. Isso pode ser observado no gráfico e é uma derivação da Lei de Snell

$$n \sin \theta = n' \sin \theta' \quad (2)$$

em que n e n' são os índices de refração do meio de incidência e de transmissão, respectivamente.

Deste modo, tomando-se os limites de θ e θ' tendendo a zero, obtém-se

$$r = \frac{(n - n')^2}{(n + n')^2} \quad (3)$$

Pela equação 3, pode-se concluir que cerca de 2% de um feixe incidindo perpendicularmente em uma interface ar-água ($n_{\text{ar}}=n=1$ e $n_{\text{água}}=n'=1,33$) será refletido especularmente.

Medidas experimentais da luz refletida em um tecido biológico podem apresentar resultados um pouco superiores do que a prevista pela equação 1, que

assumo uma superfície sem rugosidade. Este resultado advém do fato de que os tecidos biológicos, apresentam rugosidades na superfície e também é leve divergência que pode haver no feixe incidente. Além disso, quando um feixe de luz viaja através de um tecido, o espalhamento e a absorção atenuam o feixe colimado fazendo com que ele fique "descolimado" conforme os fótons são espalhados para longe do feixe. Parte da luz espalhada sofre múltiplas reflexões e se propaga na direção "para trás" (i.e., de volta para a superfície), o que se chama de luz retroespalhada ou reflectância difusa. Essa porção retroespalhada pode atingir a superfície sendo parte internamente refletida e parte transmitida de acordo com a equação 1. Assim, uma medida da reflexão (R_T) que ocorre em um tecido biológico engloba tanto a reflexão especular (r) quanto a parte da luz que foi transmitida por retroespalhamento (luz difusa reemitida, R_d), ou seja, $R_T=r+R_d$ ⁸.

1.1.2 Espalhamento

O espalhamento da luz nos tecidos biológicos ocorre devido à incompatibilidade de índices de refração entre as organelas subcelulares e o citoplasma que as circundam. Assim, quando a luz incidente encontra uma dessas estruturas, ela é redirecionada em diversos ângulos relativos à estrutura espalhadora.

O espalhamento é uma propriedade que desempenha um papel importante tanto no diagnóstico quando nas terapias. No caso do diagnóstico, mudanças no espalhamento do tecido indicam mudanças em sua morfologia, na estrutura dos componentes teciduais, como membranas lipídicas, núcleo e fibras de colágeno. Essas variações podem ser usadas como meio para o diagnóstico de doenças que causam tais alterações, por exemplo, o câncer.

O espalhamento pode ser descrito considerando que a luz incidente como sendo uma onda plana (onda de amplitude uniforme em qualquer plano perpendicular à direção da propagação). A luz espalhada pode ser quantificada pela seção de choque de espalhamento (σ_s). No caso de uma onda plana monocromática de determinada intensidade I_0 (potência por unidade de área, W/cm^2) que encontra

uma partícula espalhadora, parte da potência é espalhada (P_s). A seção de choque de espalhamento é dada por

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

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

Um meio que possui uma distribuição uniforme de espalhadores idênticos é caracterizado pelo coeficiente de espalhamento

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

sendo ρ a densidade de espalhadores. Pode-se também definir o caminho livre médio de espalhamento

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

que representa a distância média que um fóton percorre entre eventos consecutivos de espalhamento.

Em tecidos biológicos, geralmente o espalhamento é o mecanismo dominante que interfere na propagação da luz.

1.1.3 Absorção

A absorção ocorre quando uma molécula extrai a energia da luz. Os processos de absorção também possuem aplicações importantes tanto para o diagnóstico quanto para as terapias.

As transições entre níveis de energia de uma molécula são bem definidos em um determinado comprimento de onda. Quando uma molécula absorve luz em um comprimento de onda e passa para um outro nível de energia, esta transição pode ser usada para identificar esta molécula, de modo que o registro espectral pode ser usado com finalidade diagnóstica. No caso das terapias, a absorção da energia é o mecanismo principal que permite que a luz de um laser produza efeitos físicos no tecido.

Analogamente à determinação dos parâmetros que caracterizam o processo de espalhamento, pode-se definir a seção de choque de absorção (σ_a). Para um absorvedor localizado,

$$\sigma_a = \frac{P_a}{I_0} \quad (7)$$

em que P_a é a fração da potência absorvida de uma onda plana uniforme incidente de intensidade I_0 .

Um meio contendo uma distribuição uniforme de partículas absorvedoras idênticas é caracterizado por seu coeficiente de absorção

$$\mu_a = \rho \sigma_a \quad (8)$$

sendo ρ a densidade de absorvedores. Define-se, então, o caminho livre médio de absorção

$$l_a = \frac{1}{\mu_a} \quad (9)$$

que corresponde à distância média que um fóton percorre antes de ser absorvido.

Para um determinado meio homogêneo com coeficiente de absorção μ_a , a lei de Beer-Lambert pode ser usada para descrever o decaimento da intensidade da luz com a distância percorrida z ,

$$I = I_0 e^{-\mu_a z} \quad (10)$$

A energia absorvida por uma molécula pode ser dissipada opticamente pela emissão de fótons ou não-radiativamente, como por exemplo o calor. Mas comumente ocorre uma combinação desses dois processos.

A penetração da luz em um tecido depende do quão absorvedor ele é. A chamada "Janela Terapêutica Óptica" (Figura 3) baseia-se nesta característica. No range espectral que se estende de 600 a 1300 nm, os tecidos são fracos absorvedores, de modo que a luz apresenta uma significativa penetração⁷.

Figura 3 - Janela terapêutica óptica dos tecidos biológicos. As curvas mostram a absorvância dos principais componentes dos tecidos: água, Hb: hemoglobina, HbO2: oxihemoglobina e melanina.⁹

As principais propriedades ópticas dos tecidos dependem do comprimento de onda da radiação incidente e variam de tecido para tecido, por estarem relacionadas à constituição e estrutura destes.

A soma de μ_a e μ_s resulta no chamado coeficiente de atenuação total

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s. \quad (11)$$

1.2 Métodos existentes para a determinação da distribuição da luz em tecidos biológicos

Existem vários métodos para tentar determinar a distribuição da luz em meios túrbidos ou tecidos biológicos. Para meios dominados por absorção, formas modificadas da lei de Beer-Lambert têm sido usadas.

No entanto, a maioria dos tecidos biológicos são considerados meios túrbidos, ou seja, opacos. Eles possuem estrutura heterogênea e por isso possuem variações espaciais em suas propriedades ópticas. E são essas variações que fazem com que os tecidos sejam altamente espalhadores.

O transporte radiativo é a base de vários modelos teóricos. Os modelos de transporte radiativo requer o conhecimento das propriedades ópticas dos tecidos: μ_a

, μ_s e função de fase de espalhamento $p(\hat{s}, \hat{s}')$ (probabilidade da luz propagando na direção $\hat{s}'$ ser espalhada em um dado ângulo sólido em torno de $\hat{s}$). Além disso, a equação de transporte radiativo (ETR) é dificilmente resolvida sem que seja necessária a introdução de aproximações, como a aproximação de difusão. A ETR é capaz de modelar matematicamente a transferência de energia conforme os fótons se propagam dentro de um meio turbido. A aproximação de difusão é capaz de chegar a uma excelente estimativa da profundidade de penetração da luz. Porém a estimativa para o padrão de difusão da taxa de fluência nas proximidades da fonte na superfície do tecido não é adequada ^{10, 11}. Em muitas aplicações, a distribuição da luz imediatamente abaixo do ponto de irradiação é crítica. E é nessa região, que as suposições feitas nos modelos aproximados são piores. Na aproximação de Kubelka-Munk, por exemplo, considera-se que logo abaixo da superfície, a distribuição da luz é isotrópica. Como a luz sofre vários eventos de espalhamento antes que seu perfil de propagação torne-se isotrópico, esta aproximação é bastante falha próximo da superfície.

Simulações numéricas como método de Monte Carlo são capazes de estima com bastante acurácia os perfis de distribuição da luz para qualquer combinação de absorção e espalhamento. Monte Carlo é um método estatístico no qual são traçadas as trajetórias individuais dos fótons. No entanto, para que o resultado seja preciso, as simulações demandam um longo tempo para a realização dos cálculos computacionais que podem chegar a dias, de modo que o planejamento da dosimetria não pode ser realizado de forma interativa com o procedimento terapêutico ^{12, 13}.

1.3 Phantoms

Os *phantoms* são meios que simulam as propriedades dos tecidos biológicos. Eles são importantes para auxiliar no estudo e entendimento das interações da luz com os tecidos, ajudando no desenvolvimento das tecnologias voltadas para as fototerapias e fotodiagnóstico. Os *phantoms* podem auxiliar na calibração e testes de performance de instrumentos, além de simulações matemáticas.¹⁴

Há diversos tipos de *phantoms*. Eles basicamente consistem de uma matriz (água, hidrogel, polímeros), espalhadores e absorvedores. Os espalhadores mais usados são as emulsões lipídicas (Intralipid e leite), pós inorgânicos (alumina, ouro, dióxido de titânio) e microesferas de polímeros (poliestireno). Os absorvedores podem variar de sangue e células até corantes moleculares e tintas.¹⁴

Não existe um *phantom* ideal que seja capaz de simular todas as propriedades e características de um tecido biológico. É considerado um *phantom* ideal aquele que possui propriedades ópticas similares às do tecido biológico em um determinado comprimento de onda, suas propriedades ópticas podem ser ajustáveis para imitar diferentes tecidos, permitem incorporar moléculas para que suas propriedades ópticas sejam variadas, as propriedades térmicas, químicas e a superfície do *phantom* deve ser similares às do tecido e estáveis com o tempo e condições ambientes. Um *phantom* com todas essas características poderia ser usado para qualquer aplicação, porém não há um *phantom* que possua todas essas propriedades. Nas aplicações reais, apenas algumas aplicações são importantes e as outras são desprezadas.¹⁴

1.4 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica relativamente recente que tem mostrado excelentes resultados no tratamento de lesões neoplásicas, principalmente o câncer de pele.

A TFD conjuga a ação de três componentes básicos: luz, fotossensibilizador e oxigênio molecular.

O fotossensibilizador (FS) é administrado ao paciente localmente ou sistemicamente e após um tempo de espera (de minutos a dias dependendo do FS) para que ocorra a distribuição ótima do fotossensibilizador, o tecido alvo é irradiado com luz em comprimento de onda adequado. A absorção da luz pelo fotossensibilizador desencadeia uma série de reações fotoquímicas que geram produtos citotóxicos que resultam no efeito terapêutico desejado¹⁵.

Atualmente a terapia fotodinâmica possui variadas aplicações, dentre elas pode-se destacar¹⁵:

- tumores sólidos (por exemplo: pele, esôfago, pulmão, cérebro, bexiga e próstata);
- displasias;
- papilomas;
- artrite reumatóide;
- degeneração macular;
- ceratose actínica;
- cosmética;
- psoríase;
- infecções bacterianas ou fúngicas localizadas;
- etc.

O problema da dosimetria na TFD consiste em saber quais as propriedades físicas devem ser medidas ou calculadas para prever o efeito biológico resultante. A dosimetria para TFD é bastante complexa, pois seus mecanismos básicos envolvem uma série de variáveis.

Clinicamente a dosimetria envolve basicamente a medida do FS administrado ao paciente (mg/kg) e da exposição da luz incidente (J/cm^2 , que resulta do produto da intensidade da luz incidente com o tempo de tratamento). No entanto, esta é uma prática bastante simplificada e inadequada. A concentração local de FS varia de região para região do corpo, de indivíduo para indivíduo, e também como função do tempo. A penetração da luz no tecido alvo depende das propriedades deste, e a oxigenação do tecido também é um parâmetro importante, pois se o tecido for hipóxico ou se tornar hipóxico durante o tratamento, a produção de oxigênio singlete (principal espécie reativa formada na reação fotodinâmica e responsável pela morte celular), será menor do que a esperada. Além disso, a concentração de FS, a penetração da luz e a oxigenação do tecido podem variar com o decorrer da terapia e um parâmetro pode influenciar no outro. Como pode-se perceber, uma estratégia para a dosimetria da TFD deve levar em conta todos esses fatores, daí a dificuldade em se desenvolver um método adequado e aplicável para otimizar esta modalidade terapêutica¹⁵.

1.5 Objetivos

O estudo realizado nesta tese consiste na avaliação apenas da distribuição da luz, visando a utilização do método desenvolvido para aplicação em TFD de

modo a melhorar o entendimento de como a luz se distribui no tecido e determinar se é possível melhorar a forma de iluminação realizada para que um melhor efeito terapêutico seja obtido.

Simulações teóricas e medidas precisas da distribuição espacial da luz em tecidos biológicos são de considerável importância na dosimetria para fototerapias. No tratamento por TFD, uma dosimetria de luz acurada é importante para obter a resposta desejada, pois a aplicação de luz em quantidade inferior àquela necessária, pode resultar na morte inadequada das células tumorais. De outro modo, a aplicação de quantidade de luz excessiva pode causar a morte indesejada de tecido sadio adjacente.

A proposta do estudo realizado e apresentado nesta tese é aumentar o conhecimento a cerca da distribuição da luz para o aprimoramento da dosimetria nas fototerapias, principalmente a Terapia Fotodinâmica.

As medidas apresentadas e discutidas nesta tese corresponderão à luz no comprimento de onda em 632,8 nm. No entanto o método proposto pode ser útil para aplicações em outros comprimentos de onda.

2 Delineamento experimental

Os experimentos realizados nesta pesquisa consistem em medidas da distribuição da luz em meios túrbidos. As medidas realizadas constituíram uma parte bastante morosa, pois o mapeamento da distribuição da luz em um meio túrbido exige que a coleta seja feita em diversos pontos do meio para que se obtenha um resultado confiável. Tais medidas visam a recuperação da distribuição da luz a partir de uma medida simplificada, que seja capaz de minimizar o tempo para reconstrução das distribuições de taxa de fluência para posterior utilização na dosimetria de luz em fototerapias.

Os experimentos podem ser divididos em duas partes:

- Recuperação da distribuição da luz a partir de medidas na superfície do meio; e
- Recuperação da distribuição da luz a partir de uma "matriz mestre".

Os materiais utilizados e os métodos aplicados em cada parte dos experimentos é descrita a seguir. Os resultados de cada parte serão apresentados após a descrição de cada método para facilitar a leitura e compreensão do texto.

2.1 Fonte de luz

A fonte de luz escolhida para a realização dos experimentos foi uma laser de HeNe (modelo 1125P, Uniphase, Manteca, CA, EUA) emitindo em comprimento de onda de 632,8 nm. A potência de saída do feixe foi medida com medidor de potência (Fielmaster, Coherent®, Auburn, CA, EUA) obtendo-se um valor de 7 mW. O diâmetro do feixe foi medido pelo método da faca, sendo de 0,86 mm.

Esta fonte de luz foi utilizada por emitir em comprimento de onda comumente utilizado em terapia fotodinâmica. Tanto os derivados de hematoporfirina quanto a protoporfirina IX, fotossensibilizadores mais usados em TFD, apresentam uma banda de absorção na região do 630 nm. Apesar de a eficiência fotodinâmica ser maior em comprimentos de ondas menores, a luz vermelha é mais adequada por apresentar uma maior penetração no tecido.

O interesse por aprimorar os métodos para melhor determinação da dosimetria a ser empregada em terapia fotodinâmica é alvo de muitos trabalhos encontrados na literatura. É importante que novos, métodos que permitam determinar mais rapidamente a forma como a luz deve ser entregue ao tecido biológico alvo sejam desenvolvidos.

Apesar desta tese ter utilizado um único comprimento de onda para execução dos experimentos e análise dos resultados, o método proposto pode ser empregado para qualquer outro comprimento de onda da luz incidente, pois baseia-se em medidas diretas da propagação da luz em um determinado meio túrbido.

2.2 Sistema de aquisição de dados

Para aquisição dos dados foi utilizado um sistema desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos) consistindo de uma maleta contendo um espectrofotômetro (USB2000, OceanOptics, Orlando, FL, EUA) acoplado a um computador portátil. A utilização do espectrofotômetro permitiu avaliar a intensidade da luz (em unidades arbitrárias) no comprimento de onda de emissão do laser de HeNe. O software para aquisição dos dados permite que o tempo de exposição da medida seja controlado, evitando saturação das medidas, já que o equipamento possui uma sensibilidade muito alta para coleta de luz por meio de fibra óptica.

Uma fibra óptica acoplada ao espectrofotômetro permite fazer a tomada da intensidade de luz de forma pontual, ou seja, na posição onde a extremidade de coleta da fibra está localizada. A luz coletada pela fibra chega ao espectrofotômetro e a intensidade da luz pode ser visualizada na tela do computador (Figura 4).

Figura 4 – Sistema para aquisição dos dados

A fibra óptica utilizada para coletar a luz no interior do leite foi uma sonda isotrópica (IP85, Medlight S.A., Suíça). Esta sonda é um dispositivo baseado em uma fibra óptica de vidro contendo uma pequena esfera espalhadora (0,85 mm de diâmetro) em sua extremidade que faz a coleta da luz de forma isotrópica. Sua aplicação é especialmente voltada para medidas de intensidade de luz difusa em phantoms e órgãos humanos.

2.3 Distribuição da luz na superfície meio túrbido para posterior reconstrução da distribuição das intensidades de luz no interior do meio.

Nesta etapa, a proposta foi desenvolver um método empírico através do qual fosse possível avaliar a distribuição de luz dentro de uma amostra de meio túrbido através de medidas realizadas na superfície do meio, onde a luz incide.

O material escolhido como meio túrbido no início deste estudo foi o leite em pó, por ser um material de fácil aquisição e manuseio, além de já ter relatos na literatura do uso deste material para pesquisas nesta área.

Por ser um meio líquido, a fibra isotrópica pode ser movimentada facilmente de modo que todo o volume de leite possa ter sua distribuição de luz mapeada espacialmente.

2.3.1 Materiais e métodos

A Figura 5 mostra a montagem experimental utilizada, contendo um recipiente de plástico com capacidade para acomodar 6 litros de solução de leite foi utilizado. Uma das laterais do recipiente foi perfurada na região central de modo que permitisse a colocação de um tubo de vidro de 0,5 cm de diâmetro e 3 cm de comprimento, contendo uma janela feita em lamínula de vidro em sua extremidade. A incidência do feixe foi feita através desta janela para minimizar o espalhamento que aconteceria se a incidência ocorresse diretamente na parede do recipiente plástico, visto que este é ligeiramente opaco. Primeiramente, 6 litros de água filtrada foram colocados no recipiente e o procedimento de alinhamento do feixe com a fibra óptica foi realizado. Aos poucos o leite em pó desnatado, comprado em mercado local, foi adicionado à água e um bastão de vidro foi utilizado para auxiliar na dissolução do leite até completa homogeneização.

A concentração de leite em pó foi variada para que fossem avaliadas as alterações na distribuição da luz para diferentes graus de espalhamento da solução. Quatro diferentes concentrações de leite foram usadas: 15 g/l, 12,5 g/l, 10 g/l e 7,5 g/l.

Figura 5 – Recipiente plástico com água para procedimento de alinhamento fibra – feixe laser (à esquerda); Montagem experimental para medidas em solução de leite (à direita).

Para avaliar a contribuição do fenômeno da absorção na propagação da luz em meio turbido, uma concentração de leite (12,5 g/l) foi fixada e quantidades de corante azul (corante comestível azul anis Coralim - Mix) em pó foram incorporadas à solução de leite, de modo a avaliar não só a contribuição da absorção, mas também determinar como o grau de absorção influencia na distribuição da luz. Três quantidades diferentes foram usadas: 0,5 g, 1,5 g e 3 g.

2.3.2 Resultados e Discussões:

As medidas realizadas no *phantom* de leite permitiram analisar a propagação da luz como função da profundidade e da distância radial para cada uma das concentrações leite utilizadas. Os resultados são mostrados na Figura 6 abaixo:

Figura 6 – Gráficos de Intensidade de luz como função da profundidade (à esquerda) e Intensidade de luz como função da distância na superfície (à direita), cada curva representa uma concentração de leite.

Pode-se observar que a concentração de partículas espalhadoras no meio interfere na propagação da luz, quanto maior a concentração de espalhadores, menor é a distância percorrida pela luz em ambas as direções.

Foi possível, então, construir as curvas de isointensidade para visualizar a distribuição da luz nas soluções. Deve-se considerar que a distribuição da luz para incidência normal é simétrica em relação ao eixo de incidência da luz, portanto, na Figura 7, assim como nas demais figuras que serão apresentadas mais adiante, os gráficos representam apenas metade das curvas de distribuição da luz de forma planificada, sendo que o ponto (0,0) representa o ponto de incidência do feixe laser.

Figura 7 – Curvas de isointensidade para as diferentes concentrações de leite em pó.

Os resultados mostram que a distribuição da luz no leite, se dá preferencialmente na direção de incidência do feixe, isto é, a luz propaga-se mais em profundidade do que lateralmente (na direção que chamamos de largura).

Com os dados obtidos, um modelo matemático foi desenvolvido na tentativa de reconstruir a distribuição de luz interna através da distribuição superficial. Para

isso, consideramos que na superfície, a intensidade da luz I_{surf} pode ser descrita pela seguinte expressão:

$$I_{surf} = Ae^{-\mu_1 r} + Be^{\mu_2 r} + I_0 \quad (12)$$

onde, μ_1 e μ_2 são os coeficientes de absorção e espalhamento, r é a posição e I_0 é a intensidade da luz que incide na superfície.

Deseja-se utilizar esta I_{surf} para inferir a distribuição da luz no meio. De maneira simplificada, sugerimos a seguinte função $f(\theta)$ para descrever a dependência angular:

$$f(\theta) = \frac{1}{(1 - \delta \cos \theta)} \quad (13)$$

onde δ é um parâmetro que depende das propriedades ópticas do meio (~ 0.9) e é maior quanto maior é a absorção.

Deste modo temos:

$$I(r, \theta) = f(\theta) I_{surf} \quad (14)$$

Utilizando este modelamento teórico, foi possível chegar às seguintes curvas de distribuição de luz. A Figura 8 abaixo mostra as curvas experimentais e teóricas sobrepostas para as concentrações de 10 g/l, 12,5 g/l e 15 g/l.

Figura 8 – Curvas de isointensidade experimentais (pontos+linha cheia) superpostas com as curvas teóricas (linha cheia contínua), para 3 diferentes concentrações de leite utilizadas.

Fixando uma concentração de leite em 12,5 g/l e incorporando-se diferentes quantidades de corante azul em pó à solução de leite (corante comestível azul anis *Coralim* - Mix), foi possível avaliar como a absorção altera a distribuição da luz. Três diferentes quantidades de corante foram usadas: 0,5 g, 1,5 g e 3 g .

A Figura 9 mostra o gráfico dos dados experimentais para a intensidade da luz em função do raio e as curvas de iso-intensidade para as diferentes quantidades de corante artificial azul diluídas no leite.

Figura 9 - Intensidade em função do raio para diferentes quantidades de corante azul. Os pontos se referem aos dados experimentais e as linhas aos ajustes feitos através da equação 12.

Foi possível, então, graficar as curvas de isointensidade para cada uma das soluções de leite com corante (Figura 10Figura 11).

Figura 10 - Curvas de iso-intensidade para leite sem corante azul (à esquerda) e para leite com adição de 0,5 g de corante azul (à direita).

Figura 11 - Curvas de iso-intensidade para leite com adição de 1,5 g de corante azul (à esquerda) e para leite com adição de 3 g de corante azul (à direita).

Pode-se observar que mesmo incorporando corantes na solução de leite, a luz continua se propagando preferencialmente na direção de incidência do feixe (direção *forward*), este resultado está de acordo com a literatura ¹⁶ que relata que isto também acontece com a propagação da luz em tecidos biológicos.

As curvas de isointensidade obtidas através do modelamento teórico descrito anteriormente estão apresentadas nas Figura 12 e Figura 13 a seguir:

Figura 12 - Curvas teóricas para leite sem corante azul e para leite com adição de 0,5 g de corante azul.

Figura 13 - Curvas teóricas para leite com adição de 1,5 g de corante azul e para leite com adição de 3 g de corante azul.

Comparando os resultados experimentais com os resultados teóricos vemos que apesar da simplicidade do modelo proposto, foi possível utilizar o perfil de distribuição da luz na superfície para inferir a distribuição de luz no interior.

Análises mais complexas necessitam ser realizadas a fim de que se construa um modelo mais adequado e que se aplique às mais diversas situações. Recordando, deseja-se determinar $I(r, \theta)$ usando $I(r, 90^\circ)$. Para averiguar a viabilidade deste método, retornamos aos dados coletados para a solução homogênea de leite em pó e procedeu-se com o cálculo da razão $I(90^\circ)/I(\theta)$ como função de r (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico da razão $I(90^\circ)/I(\theta)$ como função de r , para diferentes valores de ângulo (θ).

Segundo o modelo que propusemos inicialmente, a quantidade $I(90^\circ)/I(\theta) = f(\theta)$ deveria ser independente de r . No entanto, os resultados mostram que esta quantidade não é independente da distância r . Aparentemente, para valores de r bastante distante da fonte, $f(\theta) \rightarrow 1$, demonstra pouca dependência com θ neste limite. Entretanto, na região de interesse, há dependências com r , indicando a necessidade de modificar a relação $I(r, \theta)$ no sentido de melhorar o modelo proposto.

Propomos, então que:

$$I(r, \theta) = \frac{Ae^{-\mu_1 r} + Be^{-\mu_2 r}}{1 - F(r) \cos \theta} \quad (15)$$

Neste caso,

$$I_{90^\circ} / I_0 = 1 - F(r) \cos \theta = G(r, \theta) \quad (16)$$

Apesar de termos uma função bem comportada para $G(r, \theta)$, não é trivial a sua determinação analítica. No momento estamos trabalhando para uma proposta da função $G(r, \theta)$. Uma vez determinada, de forma empírica, a função $G(r, \theta)$ será possível a total reconstrução de $I(r, \theta)$ a partir da determinação da distribuição de luz na superfície, com concordância melhor do que a existente até o momento.

Outra facilidade encontrada em trabalhar com o *phantom* líquido, foi a possibilidade de se colocar obstáculos para proceder com o estudo de distribuição da luz em meios não-homogêneos.

Para a simulação de meios não-homogêneos foram colocados obstáculos cilíndricos de madeira no interior da solução de leite e as medidas de intensidade de luz foram realizadas. Diferentes configurações dos obstáculos foram utilizadas para verificar de estes eram capazes de modificar significativamente a distribuição da luz em diferentes regiões da solução (Figura 15).

Figura 15 – Esquema mostrando os diferentes posicionamentos dos obstáculos inseridos na solução de leite. À esquerda uma menor densidade de obstáculos e à direita uma maior densidade de obstáculos.

Figura 16 – Gráfico de intensidade de luz vs distância na superfície para diferentes densidades de obstáculos: sem obstáculos (■), maior densidade de obstáculos (○) e menor densidade de obstáculos (☆).

Como observa-se no gráfico da Figura 16, a distribuição da luz na superfície não foi significativamente alterada pela presença de obstáculos, mesmo quando colocados de forma mais densa. Deste modo, não foi possível utilizar o modelo matemático proposto para casos em que o meio turbido é não-homogêneo.

É evidente que a presença de inomogeneidades na estrutura de um tecido biológico altera a distribuição de luz. A presença de um vaso sanguíneo por exemplo, faz com que grande parte da luz seja absorvida nas vizinhanças deste vaso. A Figura 17 mostra a incidência de um feixe de luz nas proximidades de um vaso sanguíneo, onde é possível observar claramente a deformação da distribuição da luz próximo ao vaso. A luz é altamente absorvida pela presença do tecido mais escurecido do vaso.

Aspectos como este devem ser considerados em uma dosimetria, de modo que técnicas mais complexas precisam ser desenvolvidas, capazes de prever a alteração no formato da distribuição de luz que uma determinada estrutura existente em um tecido biológico é capaz de causar.

Figura 17 - Luz incidindo em um tecido biológico nas vizinhanças de um vaso sanguíneo.

2.3.3 Conclusões

A realização dos experimentos descritos até o momento, mostraram que é inviável tentar inferir a distribuição da luz no interior de um meio turbido ou mesmo de um tecido biológico, simplesmente a partir de medidas realizadas na superfície onde a luz incide. Alterações na trajetória da luz ao atravessar um meio turbido podem ou não gerar modificações na luz difusa retroespalhada. É possível observar que diferentes combinações de propriedades ópticas podem gerar o mesmo perfil de distribuição da luz na superfície. A vantagem deste método consistiria na possibilidade de realizar dosimetria de luz de forma não-invasiva, pois as medidas seriam feitas apenas na superfície do tecido.

Para um tecido homogêneo o método poderia ser aplicado sem grandes complicações, porém ainda assim seria necessário estimar os valores das propriedades ópticas do tecido, o que tornaria este método bastante semelhante aos métodos já existentes baseado em teoria de difusão da luz.

Com estas conclusões, um novo direcionamento foi dado ao trabalho. Um método que utilizasse medidas semelhantes a do método anterior, porém necessitando a inserção de fibras ópticas no meio turbido é proposto e descrito na seção 2.4 a seguir.

2.4 Distribuição da luz em meios túrbidos: reconstrução a partir de uma matriz Mestre

Nos experimentos realizados em laboratório, o uso de um feixe de laser estreito e colimado é bastante comum e é uma das geometrias de iluminação mais simples. Porém, nas fototerapias diferentes geometrias de iluminação são utilizadas para que o efeito terapêutico seja alcançado. Há casos em que deseja-se iluminar uma região extensa, e sabe-se que a geometria de iluminação interfere bastante na distribuição da luz.

A profundidade de penetração da luz em um meio turbido depende não só das suas características ópticas no comprimento de onda da luz de tratamento, mas também depende das características do feixe incidente. O tamanho do feixe é também um parâmetro que deve ser levado em consideração para prever o resultado de uma fototerapia, principalmente quando o campo de iluminação é pequeno. Já foi descrito que para feixes inferiores a 20 mm de diâmetro, a profundidade de penetração aumenta com o aumento do diâmetro do feixe incidente, devendo a dose de luz ser ajustada de acordo com o tamanho do feixe e com a área e profundidade de tratamento desejados ^{17, 18}. Isso ocorre porque em um meio altamente espalhador, a difusão da luz nas bordas do feixe causam um alargamento do feixe conforme ele penetra no tecido. Como consequência, um feixe incidente de maior área resulta em uma maior densidade de energia cumulativa a uma dada profundidade, ou seja, a concentração de luz ao longo do caminho de um feixe

relativamente grande, resultará em uma profundidade de penetração maior no tecido

19

A proposta dos experimentos realizados nesta parte da tese é medir a distribuição luz para esta condição mais simples, de feixe estreito e colimado, para posterior reconstrução de geometrias de iluminação mais complexas. A este método foi dada a denominação de método das matrizes pelo fato de que as medidas foram organizadas na forma de matrizes para a realização das operações matemáticas necessárias para a construção das demais geometrias de iluminação.

2.4.1 Embasamento teórico e motivação:

O principal problema enfrentado nas aplicações envolvendo a interação da luz com tecidos biológicos deve-se ao comportamento dos feixes de luz ao propagarem em um meio turbido como os tecidos biológicos. Uma combinação de efeitos como absorção e espalhamento cria um padrão de distribuição de intensidade dentro do tecido. Em geral, dependendo do modo como a luz é acoplada ao sistema, ou seja, dependendo da geometria de iluminação, um padrão diferente pode ser obtido. Iluminação direta, intersticial ou outro método, sempre resulta em um padrão de intensidade particular.

Convencionalmente em qualquer estudo da interação da radiação com tecidos biológicos, a quantidade física mais importante é a taxa de fluência da luz espacial e temporal, expressa por $I(\vec{r}, t)$. Fundamentalmente, esta é a quantidade total de energia que atinge uma determinada área localizada em uma certa posição $\vec{r}$. A determinação de $I(\vec{r}, t)$ dependerá das condições iniciais da radiação bem como a estrutura e organização do tecido biológico. O espalhamento da luz, como explicado anteriormente, se deve às heterogeneidades espaciais do índice de refração. De outro modo, o índice de refração depende da concentração e tipo de constituintes do tecido. Estruturas que possuem dimensões comparáveis ao comprimento de onda da luz incidente são as principais responsáveis pelo espalhamento da luz. Como há muitas estruturas na morfologia celular que contribui para o espalhamento da luz, um teoria que engloba os aspectos microscópicos da célula é uma tarefa bastante complicada. Para superar tal complexidade, definem-se

quantidades macroscópicas que permitem construir uma visão geral de $I(\vec{r}, t)$. Uma das aproximações mais usadas é a aproximação de difusão. Os parâmetros ópticos mais usados na investigação da óptica do tecido são μ_a (coeficiente de absorção da luz), μ_s (coeficiente de espalhamento) e g (fator de anisotropia). Tais coeficientes são difíceis de se obter, principalmente porque ao realizar uma medida, ocorre a perturbação do sistema. Além disso, os coeficientes podem ser dependentes do espaço e do tempo.

Há uma série de aplicações em óptica biomédica em que a determinação dos coeficientes ópticos do tecido são praticamente impossíveis de se obter ou são medidas bastante demoradas. Uma vez que estes coeficientes são conhecidos, uma simulação numérica pode fornecer uma noção do comportamento de $I(\vec{r})$.

No método descrito aqui, é apresentado um método diferente para obter $I(\vec{r})$. Faz-se a determinação direta e experimental da matriz de distribuição da luz. Para determinar esta matriz considera-se uma fonte de luz que incide sobre um meio túrbido semi-infinito como representado na Figura 18 abaixo:

Figura 18 - Esquema do feixe incidente sobre o meio túrbido.

O feixe de luz atinge a superfície do meio em $y = 0$ com certa distribuição de taxa de fluência $I(x_0, y_0)$. Considera-se que o feixe é estreito e paralelo com potência total P_0 na posição $(x_0, y_0) = r_0 = 0$. Este feixe produz um padrão de distribuição de luz que pode ser caracterizado por uma matriz tridimensional M , que representa a coleção de pontos correspondentes à taxa de fluência em uma malha de pontos. A malha de pontos é previamente estabelecida como as posições

$$\vec{r} = n_1 \delta \hat{x} + n_2 \delta \hat{y} + n_3 \delta \hat{z} \quad (1)$$

O parâmetro δ da malha deve ser escolhido de acordo com o número de pontos desejados para formar a matriz. Para um determinado volume V , o número de pontos contidos na matriz é V/δ^3 .

Os valores de $\frac{1}{P_0} M = \left\{ \frac{m_{n_1, n_2, n_3}}{P_0} \right\}$ correspondem à potência total em cada ponto da malha para cada unidade de potência incidente em $\vec{r}_0 = 0$. De fato, se o feixe incidir em $\vec{r}_0 \neq 0$,

$$M(\vec{r}, \vec{r}_0) = M(\vec{r} - \vec{r}_0) \quad (2)$$

que corresponde a matriz original tendo seus pontos intercambiados devido o deslocamento da fonte.

Uma vez que a matriz mestre M pode representar a fonte localizada em qualquer ponto da superfície, e considerando que a existência de múltiplas fontes pode ser adicionada em cada ponto da malha, conhecendo $M(\vec{r})$ devido à iluminação com $I(x, y)$, para obtê-lo deve-se dividir a área iluminada em elementos de área ΔA . Para cada posição (x_0, y_0) na superfície (vide Figura 19)

Figura 19 - Ilustração da definição do elemento de área ΔA .

A potência total incidente é $I(x_0, y_0)\Delta A = P(x_0, y_0)$. Esta porção da superfície iluminada contribuirá para a potência de luz em cada ponto da malha de pontos dada por

$$M_i(\vec{r}) = \frac{I(x_0, y_0)\Delta A}{P_0} M(\vec{r} - \vec{r}_0) \quad (3)$$

A contribuição total para toda a área iluminada é dada por

$$\begin{aligned}
M_{total} &= \sum_i M_i(r) \\
&= \sum_{x_0, y_0} \frac{I(x_0, y_0) \Delta A}{P_0} M(r - (x_0, y_0, 0))
\end{aligned} \tag{4}$$

que representa a distribuição de luz conforme medida para cada um dos pontos do meio devido à fonte de iluminação extensa. Esta aproximação considera um material homogêneo. Toda as propriedades de absorção e espalhamento do meio estão contidas nos elementos da matriz 3D. Nesta descrição, foi considerada uma fonte de luz monocromática, no caso de uma fonte com múltiplos comprimentos de onda, uma fonte $F(\lambda)$ pode ser considerada e uma matriz mestra precisa ser gerada para cada comprimento de onda $M(r, \lambda)$. O $F(\lambda)$ deve ser discretizado e cada contribuição adicionada da mesma maneira como na equação 4.

2.4.2 Materiais e Métodos para uso do leite como *phantom*

O *phantoms* utilizados foram solução de leite em pó e solução de emulsão lipídica.

Um recipiente contendo água foi usado e aos poucos o leite em pó desnatado, comprado em um mercado local, foi adicionado e dissolvido com o auxílio de um bastão de vidro até completa homogeneização. Seguindo o método estabelecido nos experimentos executados anteriormente, a concentração de leite em pó desnatado utilizada foi de 12,5 g/l.

Visto que as fototerapias utilizam diferentes geometrias de iluminação para que o efeito biológico desejado seja atingido. Nos experimentos realizados até o momento, a fonte de luz utilizada sempre consistiu de um feixe laser colimado, ou seja, a superfície do material foi iluminada de forma quase que pontual. No entanto, nem sempre esta é a geometria de iluminação preferencial. Em muitos casos, como na Terapia Fotodinâmica, deseja-se irradiar uma área extensa. A geometria de iluminação interfere na distribuição da luz e por isso propomos um método que consiste em utilizar os dados já coletados para feixe colimado e simular matematicamente a distribuição da luz para diferentes geometrias de iluminação.

Para avaliar a viabilidade desta proposta, procedeu-se com a medida da distribuição da luz no leite para quatro diferentes feixes incidentes (Figura 20):

- 1 feixe colimado;
- 2 feixes colimados distantes um do outro cerca de 3 mm;
- feixe expandido uniforme (mesma intensidade em toda a área) com diâmetro de cerca de 8 mm; e
- feixe inclinado a 53°.

Figura 20 - Esquema das geometrias de iluminação utilizadas no experimento: 1 feixe colimado, 2 feixes colimados distantes cerca de 3 mm, feixe uniforme expandido de aproximadamente 8 mm de diâmetro e feixe inclinado.

Para avaliar a dependência da profundidade de penetração da luz no Lipofundin® com o diâmetro do feixe incidente uma medida simples de intensidade da luz com função da profundidade foi realizada para diferentes diâmetros de feixe, obteve-se o seguinte gráfico da Figura 21. Os dados para cada diâmetro de feixe foram normalizados pela intensidade medida na superfície para melhor observar o decaimento da intensidade de luz com a profundidade. Onde o resultado obtido corrobora com a literatura, demonstrando que quanto maior o diâmetro do feixe, mais a luz consegue se propagar no meio turbido, em termos de profundidade.

Figura 21 - Intensidade da luz relativa como função da profundidade para diferentes diâmetros de feixe incidente.

2.4.3 Resultados e Discussão

As medidas de intensidade de luz em cada posição no interior do meio túrbido foi graficado de modo a obter os perfis de distribuição de luz através de curvas de isointensidade. Os resultados das medidas experimentais são mostrados na Figura 22 abaixo:

Figura 22 - Curvas de isointensidade obtidas experimentalmente para as 3 geometrias de iluminao consideradas: A- 1 feixe, B- 2 feixes, C- feixe expandido.

Figura 23 - Comparação entre as curvas teórica e experimental para a distribuição da luz na superfície do meio quando há dois feixes incidentes.

Utilizando o resultado das medidas para feixe colimado simulou-se a condição para dois feixes colimados. Para tal simulação, utilizou-se a condição para um único feixe incidindo em determinada posição e outro feixe igual deslocado de 3 mm. A Figura 23 mostra a comparação da curva medida na superfície e a curva obtida através da soma da curva centrada em zero com ela mesma deslocada.

A distribuição de luz é melhor visualizada através das curvas de isointensidade e pela simples soma da matriz de distribuição de luz quando o feixe incide na posição zero na superfície com ela mesma só que deslocada para uma distância de 3 mm, obtendo-se assim o gráfico da Figura 24.

Figura 24 - Curvas de isointensidade obtidas da simulação para 2 feixes colimados distantes 3 mm um do outro.

É possível observar grande semelhança no perfil de distribuição de luz medido experimentalmente com o perfil obtido pela soma das distribuições. Com este resultado em mãos procedeu-se com a simulação para um feixe uniforme de maior diâmetro.

Para simular a condição de feixe expandido, foi feita a soma de várias matrizes, cada uma representando a condição de feixe único de modo a obter uma linha de feixes. O resultado é mostrado na Figura 25 abaixo.

Figura 25 - Curvas de isointensidade obtidas da simulação para feixe expandido.

Note que a simulação para 2 feixes é bastante semelhante ao resultado experimental. No entanto, o resultado da condição para feixe expandido ainda necessita de aprimoramentos, pois não foi levando em consideração as três dimensões do feixe. Estas análises estão em andamento para que a soma matricial seja transformada em uma integral cobrindo toda a área do feixe, o que provavelmente levará a uma simulação que seja mais fiel à condição real.

Os resultados sugerem que este método possa ser empregado para recuperação da distribuição de luz para qualquer geometria de iluminação desde que a condição para feixe colimado (feixe pontual) seja conhecida. Mais experimentos estão sendo realizados para comprovar a viabilidade deste método.

O ângulo de incidência também foi avaliado como parâmetro que modifica a propagação da luz. A Figura 26 abaixo mostra o formato da distribuição da luz quando um feixe estreito e colimado incide normalmente à superfície do *phantom* de Lipofundin®.

Figura 26 - Distribuição da luz para feixe estreito e colimado incidindo perpendicularmente à superfície do *phantom*.

Quando o feixe é inclinado, de modo que a incidência sobre o meio seja a 53° em relação à normal, a distribuição de luz resultante é a mostrada na Figura 27.

Figura 27 - Distribuição da luz para feixe incidindo a 53° com relação à normal.

Considerando que o índice de refração da solução de Lipofundin® é 1,36, simular ao valor descrito na literatura para o Intralipid²⁰, de modo que usando a lei de Snell (equação 2), o ângulo de refração foi calculado como sendo 36° . Imprimindo esta rotação nos dados da Figura 26, obteve-se a distribuição mostrada na Figura 28.

Figura 28 - Distribuição da luz obtida através da rotação da distribuição do feixe com incidência normal. A distribuição foi rotacionada de 36° calculado a partir da Lei de Snell.

Pelos resultados da simulação a partir da medida de um feixe estreito e colimado, é possível notar que pode-se usar o método proposto para prever o formato da distribuição da luz para diversas geometrias de feixe incidente.

Alguns ajustes ainda precisam ser feitos, mas este resultado mostra que é possível prever a variação angular da propagação da luz a partir da informação do índice de refração.

2.4.4 Conclusões

A comparação dos dados experimentais com as simulações que utilizam a medida para uma condição de iluminação bastante simples mostram que o método proposto pode ser usado para inferir a distribuição da luz em meios túrbidos e/ou tecidos biológicos auxiliando na determinação da melhor dosimetria de luz em fototerapias.

Este método pode contribuir para aprimorar as estratégias de iluminação tumoral, adequando a geometria de incidência da luz de modo que todo o tecido-alvo receba a dose de luz adequada.

Uma lesão tumoral pode apresentar uma geometria bastante complexa, e estratégias de iluminação tornam-se relevantes para que toda a lesão seja iluminada adequadamente.

As medidas feitas em *phantom* homogêneo permitem um melhor entendimento da propagação da luz em um meio altamente espalhador. Apesar de os tecidos biológicos apresentarem, em geral, uma estrutura não-homogênea, o tipo de medida apresentado nesta tese, é local e leva em consideração o aspecto global da distribuição da luz. A presença de uma estrutura que comprometa o procedimento clínico, certamente seria detectado através de alterações na distribuição da luz a ser medida.

A quantidade de pontos de medida necessários para determinar com maior precisão o formato das isointensidades dependerá do quão absorvedor é o tecido-alvo e do volume de tecido que precisa ser tratado.

2.5 Terapia Fotodinâmica in vivo

Para verificar a aplicabilidade do método baseado em matriz mestre para a TFD, um experimento *in vivo* foi realizado. Foram utilizados 10 ratos machos da linhagem Wistar, entre 400 e 500 g de massa corpórea, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Os animais utilizados foram acondicionados em um alojamento, com filtros para entrada e saída de ar, alocado no Laboratório de Biofotônica no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP). Os ratos ficaram alojados em gaiolas com acomodação máxima de 5 animais por gaiola e receberam água filtrada e ração comercial específica para roedores (Primor®) à vontade. A temperatura do alojamento é controlada e mantida dentre 23 °C e 25 °C. O experimento apresentado foi aprovado pela Comitê de Ética da FMRP-USP .

Para a realização dos procedimentos, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intramuscular de solução de cloridrato de ketamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A) associado a um

relaxante muscular, analgésico e sedativo (Coopazine®, Coopers Brasil Ltda) na proporção de 1:1 e dose de 100 mg/kg de massa corporal.

Para a realização da terapia fotodinâmica, foi administrado um derivado de hematoporfirina como fotossensibilizador, o Photogem® (Russia), em dose de 1,5 mg/kg de massa corporal via injeção intravenosa através da veia cava inferior. Para este procedimento, o Photogem® foi diluído em soro fisiológico obtendo-se uma solução estoque de 5 mg/ml. Foi feita, em cada animal, uma incisão mediana com lâmina de bisturi para exposição da veia cava. Após a administração do Photogem®, aguardou-se um período de 30 minutos para acúmulo do FS no tecido hepático, seguindo protocolo descrito na literatura ^{21, 22}.

Figura 29 - Espectro de absorção do Photogem®.

Como o Photogem® possui uma banda de absorção na região de 630 nm (vide Figura 29) a iluminação do tecido alvo foi realizada utilizando o laser de HeNe.

O próprio feixe de saída (5 mW) do laser foi utilizado para este procedimento (Figura 30) e o tempo de iluminação foi de 15 minutos. Para a realização da iluminação com feixe inclinado, o espelho foi girado até obter o ângulo desejado.

Figura 30 - Esquema para iluminação do tecido-alvo (fígado) com laser de HeNe.

Após a TFD, os animais foram suturados e mantidos vivos por 30 horas, após as quais foram anestesiados e tiveram seus fígados removidos²³. Os animais foram mortos imediatamente após este procedimento por overdose de anestésico. Inicialmente, o órgão era removido e imediatamente fatiado na região central da necrose induzida para observação do formato da necrose. Posteriormente, o fígado passou a ser imerso em solução de formol por 24 horas para fixação do tecido e então foi fatiado para observação do perfil da necrose induzida. Este procedimento facilitou bastante na observação da necrose, pois esta é bastante definida no que se refere às suas bordas. O processo de fixação também ocasiona a eliminação do excesso de sangramento observado quando o órgão é avaliado imediatamente após a sua remoção do organismo do animal.

2.5.1 Resultados e discussão

O resultado da TFD realizada em fígados normais de ratos permitiu avaliar as diferenças nos formatos das necroses induzidas quando feixes incidentes de diferentes geometrias são utilizados. As figuras abaixo mostram que o formato da necros é determinado pela geometria da luz incidente.

Figura 31 - Perfil de necrose induzido pela TFD com feixe incidindo normalmente à superfície do tecido

Figura 32 - Perfil de necrose induzido pela TFD com feixe incidindo sobre a superfície do tecido à um ângulo de 24°.

Figura 33 - Necroses induzidas em fígado de rato através de Terapia Fotodinâmica para dois feixes estreitos e feixe uniforme expandido.

O uso de um feixe estreito e colimado em terapia fotodinâmica não é uma prática comum nas aplicações clínicas. Quando um feixe pequeno é utilizado, a intensidade da luz fica bastante alta em comparação com os valores de intensidade comumente empregados na TFD, que variam de 100 a 200 mW/cm². Apesar da alta intensidade da ordem de alguns 1000 mW/cm², nenhum dano térmico foi observado nas lâminas histológicas. Este tipo de iluminação é empregado nas aplicações de laser terapia de baixa potência, onde lasers emitindo na região do vermelho e infravermelho próximo são usados. Estes lasers possuem feixes pequenos, similares ao feixe do laser de HeNe aqui utilizado e sua potência varia de 5 mW a 100 mW, resultando em intensidades maiores do que a usada neste experimento.

No caso do feixe uniforme expandido, de 1 cm² de área, a intensidade de luz utilizada foi de 150 mW/cm².

Os formatos de necrose obtidos mostram o quanto a geometria do feixe incidente influencia no resultado obtido.

2.5.2 Conclusões

A terapia fotodinâmica realizada neste experimentos demonstrou que o formato da necrose induzida é modificada pela geometria do feixe de luz incidente. O formato da necrose pode ser previsto para diferentes condições de iluminação conhecendo-se o formato da necrose para um feixe estreito e colimado. Uma angulação do feixe pode resultar em uma necrose bastante característica que está diretamente relacionada ao índice de refração do tecido. Manipular a geometria de incidência do feixe mostra-se uma prática interessante para conseqüentemente manipular o formato da necrose que deseja-se induzir através da terapia fotodinâmica.

Um melhor planejamento a cerca da dosimetria de luz representa uma melhor resposta do tecido à terapia fotodinâmica. Uma dosimetria baseada apenas na quantidade de luz que atinge a superfície do tecido, como é feito na maioria dos procedimentos, pode levar a um dano indesejado no tecido sadio adjacente à lesão ou pode resultar numa dose de luz insuficiente para causar a morte de todo o tecido tumoral. Em havendo células cancerosas remanescentes na base da lesão, pode haver recidiva da doença ou até mesmo o seu agravamento.

A possibilidade de usar um método no qual o campo de luz pode ser determinado de acordo com a geometria da lesão, representa uma possibilidade de otimizar esta modalidade terapêutica.

3 Conclusões Gerais

A tentativa de se estabelecer um método não-invasivo através de medidas da luz que se propaga na superfície de um meio túrbido, bem como de um tecido biológico não foi bem sucedida. A complexidade inerentes aos tecidos não podem ser previstas através deste tipo de medida e do desenvolvimento de um modelo matemático simples. Este tipo de medida chamada de reflectância difusa, apresenta bons resultados em simulações de Monte Carlo, no entanto, estas simulações necessitam do conhecimento prévio de diversos parâmetros ópticos dos tecidos investigados.²⁴

A distribuição de fluência dentro de um tecido e a eficácia de uma fototerapia depende de diversos aspectos, dentre eles a geometria de iluminação. A geometria da luz incidente mostra-se um parâmetro que pode ser controlado para melhorar a dosimetria realizada na terapia fotodinâmica. O experimento realizado com fibra em contato demonstrou resultados melhores em termos de profundidade de necrose em tecido hepático, indicando que o contato da fibra com o tecido pode minimizar os efeitos da diferença de índices de refração quando a iluminação do tecido é realizada havendo uma interface ar-tecido.

A distribuição da luz medida através de um método simplificado pode auxiliar no entendimento da propagação da luz em tecidos biológicos em condições mais complexas.

Mais do que a utilização deste método para a obtenção da distribuição da luz em um meio túrbido, foi possível observar que a combinação de feixes estreitos pode ser utilizada para a construção de campos de luz que sejam capazes de induzir a necrose tecidual através da Terapia Fotodinâmica, em regiões de geometria um pouco mais complexas.

Apesar de haver outros parâmetros que devem ser levados em conta para determinar os melhores parâmetros dosimétricos na terapia fotodinâmica, a luz representa o parâmetro mais facilmente controlado. A potência de emissão de uma fonte de luz, o tamanho do feixe de incidência, a uniformidade ou não do feixe de incidência e o tempo de exposição do tecido à luz são fatores que podem determinar uma melhor resposta a uma determinada fototerapia.

A realização de estudos sobre a propagação da luz em tecidos biológicos é de extrema importância e necessidade para tornar as fototerapias procedimentos confiáveis.

A técnica proposta nesta tese ainda precisa de aprimoramentos para que seja usada em aplicações clínicas. Apesar de representar uma técnica relativamente invasiva, por necessitar a inserção de uma fibra óptica para realizar a medida da distribuição da luz no tecido-alvo, este tipo de técnica vem sendo bastante estudada, principalmente quando a aplicação é intersticial, ou seja, a iluminação da lesão é realizada a partir de seu interior. Este tipo de aplicação é bastante comum em lesões massivas e volumosas, como nos casos de tumores de próstata²⁵⁻²⁷. Medidas realizadas diretamente nos tecidos-alvo representam a melhor opção para o desenvolvimento de protocolos clínicos para fototerapias que sejam mais padronizados e individualizados.

4 Perspectivas futuras

O trabalho apresentado nesta tese trouxe uma série de questionamentos que ainda precisam ser melhor avaliados no que se refere à distribuição de luz em tecidos biológicos, e como este parâmetro deve ser tratado para otimizar a dosimetria nas fototerapias. De modo que este tema continuará sendo estudado visando:

- verificar se o método proposto nesta tese pode também ser aplicado para aplicações intersticiais (inserção de fibras nos *phantoms* e tecidos);
- utilizar o método para prever o volume de tecido necrosado pela TFD em tumores;
- elaborar uma rotina computacional que possa ser utilizada para "desenhar" os campos de luz que devem ser utilizados para que se atinja determinado formato de necrose na TFD;
- aperfeiçoar o método e conjugá-lo aos métodos que estão sendo desenvolvidos²⁸ por nosso grupo de pesquisa (Grupo de Óptica do IFSC-USP) que avaliam a fotodegradação do fotossensibilizador, para elaborar uma dosimetria para TFD que possa ser utilizada em tempo real.

Referências

- 1 OHTSUKI, A.;HASEGAWA, T.;HIRASAWA, Y.;TSUCHIHASHI, H.;IKEDA, S. Photodynamic therapy using light-emitting diodes for the treatment of viral warts. *The Journal of Dermatology*, v. 36, n, 10, p. 525-8, 2009.

- 2 WHELAN, H.T.;SMITS, R.L., JR.;BUCHMAN, E.V.;WHELAN, N.T.;TURNER, S.G.;MARGOLIS, D.A.;CEVENINI, V.;STINSON, H.;IGNATIUS, R.;MARTIN, T.;CWIKLINSKI, J.;PHILIPPI, A.F.;GRAF, W.R.;HODGSON, B.;GOULD, L.;KANE, M.;CHEN, G.;CAVINESS, J. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *Journal of Clinical Laser in Medicine and Surgery*, v. 19, n, 6, p. 305-14, 2001.

- 3 YANG, M.;REYNOSO, J.;JIANG, P.;LI, L.;MOOSSA, A.R.;HOFFMAN, R.M. Transgenic nude mouse with ubiquitous green fluorescent protein expression as a host for human tumors. *Cancer Research*, v. 64, n, 23, p. 8651-6, 2004.

- 4 ZHANG, L.;XIONG, Z.;LI, Z.;YAO, B.;ZHANG, D. Effects of red light emitting diode on apoptosis of HeLa cells and suppression of implanted HeLa cells growth in mice. *Journal of Radiation Research (Tokyo)*, v. 50, n, 2, p. 109-17, 2009.

- 5 KYRIAZI, M.;ALEXANDRATOU, E.;YOVA, D.;RALLIS, M.;TREBST, T. Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, v. 24, n, 2, p. 87-94, 2008.

- 6 TUCHIN, V.V. *Handbook of photonics for biomedical science*. Boca Raton, FL: CRC Press. 2003

- 7 VO-DINH, T. *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. 2003

- 8 WELCH, A.J.;GEMERT, M.J.C.V. *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*. New York: Plenum Press. 1995

- 9 HUANG, Y.Y.;AARON, C.H.C.;HAMBLIN, M. *Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm*, in *SPIE Newsroom*, July. 2009.

10 PROFIO, A.E.;DOIRON, D.R. Transport of light in tissue in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 46, n, 5, p. 591-9, 1987.

11 CHEONG, W.F.;PRAHL, S.A.;WELCH, A.J. A review of the optical-properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, v. 26, n, 12, p. 2166-2185, 1990.

12 FLOCK, S.T.;PATTERSON, M.S.;WILSON, B.C.;WYMAN, D.R. Monte-Carlo modeling of light-propagation in highly scattering tissues .1. Model predictions and comparison with diffusion-theory. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 36, n, 12, p. 1162-1168, 1989.

13 WILSON, B.C.;ADAM, G. A Monte Carlo model for the absorption and flux distributions of light in tissue. *Medical Physics*, v. 10, n, 6, p. 824-30, 1983.

14 POGUE, B.W.;PATTERSON, M.S. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *Journal of Biomedical Optics*, v. 11, n, 4, p. 041102, 2006.

15 WILSON, B.C.;PATTERSON, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, v. 53, n, 9, p. R61-109, 2008.

16 KIM, A.D.;MOSCOSO, M. Beam propagation in sharply peaked forward scattering media. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, v. 21, n, 5, p. 797-803, 2004.

17 CHEN, Q.;WILSON, B.C.;DERESKI, M.O.;PATTERSON, M.S.;CHOPP, M.;HETZEL, F.W. Effects of light-beam size on fluence distribution and depth of necrosis in superficially applied photodynamic therapy of normal rat-brain. *Photochemistry and Photobiology*, v. 56, n, 3, p. 379-384, 1992.

18 KESSEL, D. *Photodynamic therapy of neoplastic disease*. Boca Raton, Fla.CRC Press. 1990

19 KLAVUHN, K.G. *Illumination geometry: the importance of laser beam spatial characteristics*, in *Coherent LightSheer TM Supplementary Data Sheet*. 2000. Disponível em:<www.aesthetic.lumenis.com/pdf/5343.pdf>. Acesso em: 15/01/2011.

20 DING, H.F.;LU, J.Q.;JACOBS, K.M.;HU, X.H. Determination of refractive indices of porcine skin tissues and Intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, v. 22, n, 6, p. 1151-1157, 2005.

21 MELO, C.A.;KURACHI, C.;GRECCO, C.;SIBATA, C.H.;CASTRO-E-SILVA, O.;BAGNATO, V.S. Pharmacokinetics of Photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 73, n, 3, p. 183-8, 2004.

22 FERREIRA, J.;MORIYAMA, L.T.;KURACHI, C.;SIBATA, C.;SILVA, O.C.E.;ZUCOLOTO, S.;BAGNATO, V.S. Experimental determination of threshold dose in photodynamic therapy in normal rat liver. *Laser Physics Letters*, v. 4, n, 6, p. 469-475, 2007.

23 FERREIRA, J. *Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós terapia fotodinâmica* - estudo in vivo. 2003. 108 p. Dissertação (Mestrado em Patologia)- Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

24 WEERSINK, R.;WHITE, R.;LILGE, L. *Light dosimetry for Low-Level Laser therapy*: Accounting for differences in tissue and depth. *Proceedings. of SPIE*, v. 6428, 642803, 2007.

25 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. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 79, n, 3, p. 231-41, 2005.

26 JOHANSSON, T.;THOMPSON, M.S.;STENBERG, M.;AF, K.C.;ANDERSSON-ENGELS, S.;SVANBERG, S.;SVANBERG, K. Feasibility study of a system for combined light dosimetry and interstitial photodynamic treatment of massive tumors. *Applied Optics*, v. 41, n, 7, p. 1462-8, 2002.

27 THOMPSON, M.S.;JOHANSSON, A.;JOHANSSON, T.;ANDERSSON-ENGELS, S.;SVANBERG, S.;BENDSOE, N.;SVANBERG, K. Clinical system for interstitial photodynamic therapy with combined on-line dosimetry measurements. *Applied Optics*, v. 44, n, 19, p. 4023-31, 2005.

28 VOLLET-FILHO, J.;MENEZES, P.;MORIYAMA, L.;GRECCO, C.;SIBATA, C.;ALLISON, R.;E SILVA, C.;BAGNATO, V. Possibility for a full optical determination of photodynamic therapy outcome. *Journal of Applied Physics*, v. 105, n, 10, p. 102038-102038-7, 2009.

Anexo

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 151/2007, sobre o projeto intitulado “Avaliação da resposta fotodinâmica utilizando fonte de luz pulsada”, 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 **03 de dezembro de 2007**.

(We certify that the protocol nº 151/2007, about “Evaluation of the photodynamic response using pulsed light source”, 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 12/03/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 05 de dezembro de 2007.

Profa. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI
Presidente, em exercício, da Comissão de Ética
em Experimentação Animal

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 126/2010, sobre o projeto intitulado "*Perfil de necrose intersticial por TFD em fígado sadio de ratos*", 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** em reunião de 27 de setembro de 2010.

(We certify that the protocol nº 126/2010, about "*Profile of necrosis induced by interstitial photodynamic therapy in health liver of rats*", 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 09/27/2010.

Ribeirão Preto, 27 de setembro de 2010.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal