Universidade Estadual de Maringá Centro de Ciências Exatas Departamento de Física Programa de Pós-graduação em Física

Vinicius Granatto Camargo Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Herculano da Silva

A utilização de técnicas fototérmicas na caracterização de fotossensibilizadores aplicados na terapia fotodinâmica

Vinicius Granatto Camargo Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Herculano da Silva

A utilização de técnicas fototérmicas na caracterização de fotossensibilizadores aplicados na terapia fotodinâmica

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Universidade Estadual de Maringá Centro de Ciências Exatas Departamento de Física Programa de Pós-graduação em Física

Maringá 2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) (Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

r	
C172u	Camargo, Vinicius Granatto A utilização de técnicas fototérmicas na caracterização de fotossenbilizadores aplicados na terapia fotodinâmica / Vinicius Granatto Camargo Maringá, PR, 2019. 86 f.: il. color., figs., tabs.
	Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne. Coorientador: Prof. Dr. Leandro Herculano da Silva. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2019.
	 Terapia fotodinâmica. 2. Fotossensibilizadores. 3. Lente térmica. 4. Fotodegradação. Técnicas fototérmicas. I. Malacarne, Luis Carlos, orient. II. Silva, Leandro Herculano da, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.
	CDD 23.ed. 530.412

Rosana de Souza Costa de Oliveira - 9/1366

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família. Em especial aos meus pais e a minha esposa, porque sem eles seria impossível chegar ao fim desta jornada. Também gostaria de agradecer ao meu orientador, prof. Dr. Luis Carlos Malacarne, por toda colaboração, paciência e por todos os ensinamentos. Agradeço de forma especial aos meus colegas do CIILM, por toda ajuda, participação na minha vida acadêmica e auxílio. Por fim, gostaria de agradecer às agências de fomento, em particular a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pois o presente trabalho foi realizado com seu apoio.

O lance não é quanto tempo você tem, é como você usa.

Resumo

A terapia fotodinâmica (TFD) é um conjunto de técnicas e procedimentos empregados no tratamento de doencas epidérmicas, diversos tipos de câncer e outras tipos de doencas e pode ser aplicada tanto em humanos quanto em animais. A TFD consiste na ativação de um composto fotosensibilizador (FS) por meio da luz e que como resultado gera espécies reativas de oxigênio que atacam um alvo específico. Portanto, para uma melhor aplicabilidade e resultado da técnica é necessário que conhecamos as propriedades físico-químicas dos FS, além dos seus mecanismos de fotodegradação, os quais são dependentes de vários fatores tais como: concentração, temperatura, pH e tipo de solvente. Para uma completa caracterização dos FS é necessário o uso de diversas técnicas. Neste trabalhos abordamos a técnica de lente térmica (LT) como uma ferramenta complementar na caracterização de tais compostos devido ao seu caráter remoto, sensível e quase não destrutivo. Além disso, a LT tem a possibilidade de atingir limites muito baixos de detecção, podendo ser aplicada em intervalos de baixa concentração, nos quais normalmente as técnicas comerciais não podem ser empregadas. Na primeira parte do trabalho aplicamos a técnica de LT, associada a uma análise dos espectros de absorção, para estudar o processo de fotoconversão da protohipericina em hipericina, um corante que é empregado na TFD. Na segunda parte, a técnica de LT foi utilizada em conjunto com outras técnicas (espectros de absorção, emissão e transmitância resolvida no tempo), para estudar os mecanismos de fotodegradação da eritrosina na presença de diferentes supressores. Por fim, a técnica de LT com excitação pulsada foi utilizada para investigar diferentes efeitos que constituem o transiente na escala de nanosegundos e microsegundos. Efeitos de ondas acústicas geradas pelo pulso laser foram observados e descritos para transientes na escala de nanosegundos. Para os caso de FS foi verificado que na escala de microsegundos a absorção de estado excitado contribui para o transiente de LT e foi mostrado que esse efeito está diretamente relacionado ao tempo de vida do estado tripleto. Estes resultados nos permitem ampliar a utilização da técnica de LT na análise de diferentes propriedades físico-químicas em amostras líquidas.

Palavras-chave: fotosensibilizadores, fotodegradação, lente térmica.

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a set of techniques and procedures used to treat epidermal diseases, cancers and other types of diseases and can be applied to both humans and animals. PDT is the activation of a photosensitizing compound (FS) through light, which as a result generates reactive oxygen species that attack a specific target. Therefore, for a better applicability and result of the technique it is necessary to know the physicochemical properties of FS, as well as their photodegradation mechanisms, which are dependent on various factors such as: concentration, temperature, pH and type of solvent. For a complete characterization of FS it is necessary to use several techniques. In this work we approach the thermal lens technique (TL) as a complementary tool in the characterization of such compounds due to its remote, sensitive and almost non destructive character. In addition, TL has the potential to achieve very low detection limits and can be applied at low concentration intervals where commercial techniques cannot normally be employed. In the first part of the work we applied the TL technique, associated with an analysis of the absorption spectrum, to study the photoconversion process of protohypericin into hypericin, a dye that is employed in PDT. In the second part, the TL technique was used in conjunction with other techniques (absorption spectrum, emission and transmittance variation) to study the mechanisms of erythrosine photodegradation in the presence of different suppressors. Finally, the pulsed excitation TL technique was used to investigate different effects that constitute the transient on the nanosecond and microsecond scale. Acoustic wave effects generated by the laser pulse were observed and described for nanosecond scale transients. For FS cases it was found that on the microsecond scale excited state absorption contributes to the TL transient and it was shown that this effect is directly related to the triplet state lifetime. These results allow us to expand the use of the TL technique in the analysis of different physicochemical properties in liquid samples.

Keywords: photosensitizers, photodegradation, thermal lens.

Lista de ilustrações

a e hipericina. Laser on
om dois feixes e excitação ectivamente
om dois feixes e excitação ctivamente
na em concentrações de to de onda da excitação
nua representa o ajuste
eguintes concentrações: ntínuas representam os
ração de protohipericina ermica. A linha contínua
phipericina (círculos) em a contínua representa o 35
c) Forma fotocrômica da
de LED ($\lambda = 532nm$). A to que a linha tracejada
leto obtido por meio da função da concentração
em função do tempo de
e absorção. a) $5\mu M$ de de eritrosina e 30min de osorção normalizada em

Figura 17 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de emissão. a) $1\mu M$ de	
eritrosina; b) $1\mu M$ de eritrosina e $100\mu M$ de MEA; c) $1\mu M$ de eritrosina e 30min de	
injeção de gás N na solução; d) intensidade normalizada em $\lambda=544nm$ em função	
do tempo.	47
Figura 18 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de absorção. a) $5\mu M$ de	
eritrosina; b) $5\mu M$ de eritrosina e $50\mu M$ de MEA; c) $5\mu M$ de eritrosina e $250\mu M$ de	
MEA; d) $5\mu M$ de eritrosina e $500\mu M$ de MEA; e) $5\mu M$ de eritrosina e $10mM$ de MEA;	
f) Intensidade normalizada no máximo de absorção.	48
Figura 19 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de emissão. a) $1\mu M$ de	
eritrosina; b) $1\mu M$ de eritrosina e $50\mu M$ de MEA; c) $1\mu M$ de eritrosina e $250\mu M$ de	
MEA; d) Intensidade normalizada no máximo de emissão	49
Figura 20 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de absorção. a) $5\mu M$ de eri-	
trosina e $10mM$ de MEA; b) $5\mu M$ de eosina e $10mM$ de MEA; c) $5\mu M$ de fluoresceína	
e $10mM$ de MEA; d) Intensidade normalizada no máximo de absorção	50
Figura 21 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de emissão. a) $1\mu M$ de	
eritrosina e $2mM$ de MEA; b) $1\mu M$ de eosina e $2mM$ de MEA; c) $1\mu M$ de fluoresceína	
e $2mM$ de MEA; d) Intensidade normalizada no máximo de emissão	51
Figura 22 - Transiente de lente térmica para a eritrosina, com e sem MEA, e na ausência de	
oxigênio	52
Figura 23 – Transiente de lente térmica para a eritrosina em diferentes concentrações	53
Figura 24 – Transiente da absorção da banda em $632nm$ do estado tripleto obtido por meio da	
transmitância resolvida no tempo para a eritrosina ($25 \mu M$) em função da concentração	
de NaN_3	54
Figura 25 – Espectros de emissão para a Ery na presença da NaN_3 , na presença e ausência de	
oxigênio	55
Figura 26 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de absorção. a) $5\mu M$ de	
eritrosina; b) $5\mu M$ de eritrosina e $2300mM$ de NaN_3 ; c) $5\mu M$ de eritrosina e $2300mM$	
de $NaN_3 + N$; d) Intensidade normalizada no máximo de absorção	56
Figura 27 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de emissão. a) $1\mu M$ de	
eritrosina; b) $1\mu M$ de eritrosina e $2300mM$ de NaN_3 ; c) $1\mu M$ de eritrosina e $2300mM$	
de $NaN_3 + N$; d) Intensidade normalizada no máximo de absorção	57
Figura 28 – Transientes de lente térmica para a Ery na presença da NaN_3	58
Figura 29 – Transiente de lente térmica com excitação pulsada para a eritrosina ($25\mu M$)	64
Figura 30 - Transiente de lente térmica com excitação pulsada para a água na escala temporal	
de nanosegundos	65
Figura 31 – Comparação entre os dados experimentais e as simulações feitas por meio do COM-	
SOL multiphysics.	67
Figura 32 – Contribuições térmica e de pressão para o transiente de lente térmica.	68
Figura 33 – Contribuições dos parâmetros β , dn/dp e c_s para o transiente de lente térmica	69
Figura 34 – Transiente de lente térmica com excitação pulsada e transiente da absorção da banda	
em $632nm$ do estado tripleto obtido por meio da variação de transmitância para a	
eritrosina ($25\mu M$).	70
Figura 35 – Transiente de lente térmica com excitação pulsada e transiente da absorção da banda	
em $632nm$ do estado tripleto obtido por meio da variação de transmitância para a	
eritrosina ($25\mu M$) e 30 min. de purga de oxigênio. $\dots \dots \dots$	71

Figura 36 – Transiente de lente térmica com excitação pulsada e transiente da absorção da banda	
em $632nm$ do estado tripleto obtido por meio da variação de transmitância para a	
eritrosina ($25\mu M$) e 30 min. de injeção de oxigênio.	72
Figura 37 - Transiente de lente térmica com excitação contínua e transiente da absorção da	
banda em $632nm$ do estado tripleto obtido por meio de um monitoramento simultâneo	
para a eritrosina ($400nM$)	74

Lista de tabelas

[4]	18
[1]	
Tabela 2 - Resultados obtidos para os tempos de vida do estado tripleto na ausência e r	a
presença dos supressores.	43
Tabela 3 $-$ Resultados obtidos para os tempos de vida do estado tripleto na presença da NaN	V_3
e na presença e ausência de oxigênio na solução	55
Tabela 4 – Parâmetros utilizados na simulação computacional para o transiente de lente térmic	a
pulsada para a água [2, 3, 4]	66
Tabela 5 - Resultados obtidos para os tempos de vida do estado tripleto por meio da técnica o	le
lente térmica com excitação pulsada e por meio do transiente da absorção da banc	la
em $632nm$ do estado tripleto obtido por meio da variação de transmitância. \ldots .	73

Sumário

	Lista de ilustrações	8
	Lista de tabelas	11
	Sumário	12
1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Estudos e aplicações modernas da TFD	16
1.1.1	Terapia fotodinâmica para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana	16
1.1.2	Terapia fotodinâmica para o tratamento de fungos e dermatofitoses	17
1.1.3	Formulação de hipericina em P123 para a utilização como fotosensibilizador	17
1.1.4	Formulação de safranina em F127 e P123 para a utilização na prevenção da mastite	
	bovina	17
1.1.5	Efeitos da terapia fotodinâmica em biofilmes bacterianos	18
1.2	Fotosensibilizadores	18
1.2.1	5-ácido aminolevulínico	19
1.3	Objetivos	19
1.4	Desenvolvimento do trabalho	19
2	DESCRIÇÃO TEÓRICA DA TÉCNICA DE LENTE TÉRMICA	21
2.1	Introdução	21
2.2	Descrição teórica	21
2.3	Aparato experimental	24
3	ANÁLISE DA FOTOCONVERSÃO DA PROTOHIPERICINA EM HIPERICINA	27
3.1	Introdução	27
3.2	Metodologia	28
3.3	Discussão dos resultados	28
3.4	Conclusão	38
4	CINÉTICA DE FOTODEGRADAÇÃO DA ERITROSINA	39
4.1	Introdução	39
4.2	Metodologia	40
4.2.1	Reagentes	40
4.2.2	Transmitância resolvida no tempo	40
4.2.3	Espectroscopia de absorção e emissão	40
4.2.4	Lente Térmica	41
4.3	Discussão dos resultados	41
4.3.1	Azida de sódio	54
4.4	Conclusão	59

5	O EFEITO DA VARIAÇÃO DE ABSORÇÃO DO ESTADO TRIPLETO DA ERITRO- SINA E OS EFEITOS DE ONDAS DE PRESSÃO NO TRANSIENTE DE LENTE			
	TÉRMICA	61		
5.1	Introdução	61		
5.2	Metodologia	62		
5.2.1	Reagentes	62		
5.2.2	Variação de transmitância	62		
5.2.3	Lente térmica com excitação contínua	62		
5.2.4	Lente térmica com excitação pulsada	63		
5.3	Discussão dos resultados	63		
5.3.1	Ondas de pressão	65		
5.3.2	Efeito da variação da absorção do estado tripleto da eritrosina	70		
5.4	Conclusão	75		
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77		
	REFERÊNCIAS	79		

1 Introdução

A irradiação da luz é um tipo de terapia que já é empregada por civilizações antigas, como os egípcios, no tratamento de doenças epidérmicas, como o vitiligo. Entretanto, o início da terapia moderna por meio da luz é datada no fim do século dezenove, desenvolvida pelo ganhador do prêmio Nobel Niels Finsen, premiado por desenvolver a fototerapia e por suas descobertas em relação a utilização da luz no tratamento de doenças [5].

Diante disso, foram realizados experimentos para verificar a combinação entre a luz e diversos reagentes, os quais possibilitaram o desenvolvimento da terapia fotodinâmica (TFD) e originaram pesquisas recentes que demonstraram que a combinação da luz com certos compostos químicos podem induzir à morte celular. A partir disso que surgiu a técnica conhecida como TFD. A interação da luz com o fotosensibilizador (FS) leva este para o estado excitado e pode resultar em uma interação direta entre o estado tripleto do FS e a molécula do substrato e como produto tem-se espécies reativas do oxigênio, este é conhecido como mecanismo do tipo I desses processos fotodinâmicos. Por outro lado, a interação entre o estado tripleto do FS pode ocorrer com o oxigênio molecular, resultando no oxigênio singlete, uma espécie altamente reativa. Este último processo é conhecido como mecanismo do tipo II [6, 7, 8]. Castano *et al* em seus trabalhos detalharam os mecanismos do oxigênio singlete na TFD [9, 10, 11].

O efeito fotoinduzido pode ser representado pelo diagrama de energia de Jablonski, um simples modelo de três estados, representado na figura 1. A molécula, em seu estado fundamental S_0 , absorve a energia do fóton indo para o estado singleto excitado mais baixo S_1 ($h\nu_{ex}$). O estado S_1 pode fazer uma transição radioativa de volta para S_0 por meio de emissão fluorescente ($h\nu_F$). Ele também pode fazer um cruzamento não radioativo intersistemas para o estado tripleto de menor energia T_1 (*ISC*). Do estado T_1 existem dois caminhos possíveis: ele pode retornar ao estado S_0 diretamente por emissão fosforescente ($h\nu_P$) ou ele libera energia, que é transferida para o oxigênio ou para outros supressores do estado tripleto (TSQ). Assim, a absorção de luz leva o FS ao estado excitado que reage com as moléculas de oxigênio das células ou com as moléculas do substrato, resultando na produção de espécies reativas do oxigênio, especialmente o oxigênio singlete.



Figura 1 – Representação do diagrama de Jablonski.

O oxigênio singlete é altamente reativo causando desordem nas paredes celulares e danificando as organelas celulares destruindo o tecido doente. Estas reações ocorrem nas imediações onde a luz é absorvida pelo FS, ou seja, a resposta biológica ao FS se dá apenas em áreas particulares do tecido que foram expostas a luz. Sabe-se ainda que a destruição celular é mediada por três mecanismos diferentes [5]. O primeiro está relacionado com o ataque direto das espécies reativas do oxigênio às células. Outro mecanismo envolvido na morte celular, é a resposta imunológica ativada contra as células cancerígenas durante a TFD. Por último a TFD pode danificar a vascularização celular, levando a um infarte tumoral.

O conhecimento das propriedades fotofísicas dos FS pode nos ajudar a ter uma melhor aplicação terapêutica, por exemplo, altas absorções ópticas podem reduzir a quantidade de FS administrada para que se obtenha uma resposta desejada. A máxima absorção óptica em comprimentos de onda relativamente longos na região do visível ajudam a aumentar a penetração da luz nos tecidos alvos. E ainda, quanto maior o tempo de vida do estado tripleto do FS, maior será a produção de oxigênio singlete [6, 8, 12]. Outra propriedade importante de um FS é a sua localização a um alvo específico e que está diretamente relacionado com a eficiência da TFD. A localização da droga é determinada pela permeabilidade vascular e pela difusão intersticial, que depende de diversas propriedades físicas, químicas e biológicas [5]. Também é sabido que diferentes intervalos entre a administração do FS e da luz promovem a destruição celular por meio de diferentes mecanismos e tem diferentes consequências, ou seja, o intervalo entre a administração do FS e a exposição à luz é outro fator importante na determinação da eficiência da TFD.

1.1 Estudos e aplicações modernas da TFD

Com o intuito de elucidar a importância e a aplicabilidade da terapia fotodinâmica, vamos discutir brevemente alguns trabalhos recentes que foram selecionados em meio a diversas aplicações da TFD, mas que exemplificam e sustentam a necessidade atual de se compreender ainda mais tópicos como os discutidos neste trabalho.

Vale ressaltar que estes exemplos são uma quantia ínfima em meio a tantos trabalhos que estão sendo propostos atualmente e que a TFD é uma ampla área multidisciplinar.

1.1.1 Terapia fotodinâmica para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana

Em seu trabalho intitulado "Photodynamic therapy for american cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with leishmania (leishmania) amazonenses", Peloi et al (2011) investigaram a utilização da terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Segundo os autores, a leishmaniose é uma das parasitoses mais comuns no mundo, tendo mais de 12 milhões de pessoas infectadas e cerca de 350 milhões de pessoas com risco de infecção, de acordo com a organização de saúde mundial. A leishmaniose tegumentar é caracterizada por lesões na pele ou no tecido mucoso e seu tratamento é baseado na injeção de derivados antimoniais pentavalentes, e também de anfotericina B, paromomicina e isetionato de pentamidina. Entretanto, ainda segundo os autores, a aplicação da TFD se mostra promissora, pois o tratamento convencional possui alta incidência de efeitos colaterais, rejeição por parte dos pacientes devido ao desconforto do tratamento, o que leva a complicações no quadro clínico e à resistência aos medicamentos [13].

No trabalho de Peloi *et al* (2011), hamsters foram infectados com a leishmania amazonenses e após o surgimento das lesões, os animais foram tratados utilizando azul de metileno como FS e um LED com máximo de emissão em 663nm. Os animais foram tratados três vezes por semana durante três meses,

de tal forma que eles eram expostos ao LED por uma hora após dez minutos depois que o FS era aplicado. De acordo com os autores, a TFD com azul de metileno e exposição a luz do LED promoveu uma redução significativa das lesões, da carga parasitária e curou as lesões nos hamsters infectados experimentalmente [13].

1.1.2 Terapia fotodinâmica para o tratamento de fungos e dermatofitoses

Pinton et al (2005), em seu trabalho intitulado "*A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin*", apresentaram um panorama a respeito dos efeitos da TFD em fungos e dermatofitoses.

Segundo os autores, micoses na pele, causadas por espécies Candida ou dermatófitos, são uma das mais frequentes doenças humanas e animais. O tratamento dessas doenças é caro e prolongado e casos de resistência aos medicamentos são comuns em pacientes de grupos de risco, como HIV positivos e pacientes submetidos a quimioterapia.

De acordo com os autores, a terapia fotodinâmica se mostrou efetiva e seletiva, uma vez que os fungos podem ser mortos em uma dosimetria muito menor do que os queratinócitos. Outra vantagem citada pelos autores é a ausência de genotoxicidade e de efeitos mutagênicos.

1.1.3 Formulação de hipericina em P123 para a utilização como fotosensibilizador

O objetivo de estudo de Montanha *et al* (2017), em seu trabalho "*Response surface method optimi*zation of a novel Hypericin formulation in P123 micelles for colorectal cancer and antimicrobial photodynamic therapy", foi estudar o efeito fotodinâmico da hipericina encapsulada no polímero P123 contra o carcinoma do colo e bactérias epidérmicas, afim de propor um novo fotosensibilizador que pudesse ser aplicado a TFD. Segundo os autores, a hipericina é um grande candidato para a TFD devido as suas propriedades fotocitotóxicas contra células cancerígenas e microorganismos e por sua alta afinidade por tecidos necrosados. Entretanto, a hipericina tende a se auto-agregar em soluções aquosas e soluções orgânicas-polares, que resulta em uma redução na sua habilidade de produção de oxigênio singlete [14].

Os resultados apresentados demonstraram que a utilização do P123 melhorou a dispersão da hipericina em água enquanto manteve sua atividade fotodinâmica, e ainda, preveniu a auto-agregação. O sistema micelar nanoestruturado preservou os efeitos antibactericidas e a utilização do P123 como nanocarregador desempenhou um papel na permeação da hipericina através da membrana celular, resultando em uma morte celular significativa [14].

1.1.4 Formulação de safranina em F127 e P123 para a utilização na prevenção da mastite bovina

Outro exemplo de aplicação da TFD pode ser encontrado no trabalho de Combuca *et al* (2019), "Development and applications of safranine-loaded pluronic F127 and P123 photoactive nanocarriers for prevention of bovine mastitis: in vitro and in vivo studies", no qual foi explorado a performance da safranina-O incorporada em F127 e P123 na inativação fotodinâmica de microorganismos [15].

Segundo os autores, a infecção das glândulas mamárias é responsável por perdas econômicas causadas por um decréscimo na produção e na qualidade do leite. Ainda segundo os autores, a mastite é um tipo de patologia caracterizada pela inflamação da glândula mamária por ação microbiológica ou de origem traumática [15].

Os resultados demonstraram que embora a eficiência quântica de produção de oxigênio singlete em meio aquoso fosse baixa, houve uma inibição da *Staphylococcus aureus* e uma moderada inibição de outros patógenos [15].

1.1.5 Efeitos da terapia fotodinâmica em biofilmes bacterianos

Mais uma aplicação que pode ser exemplificada é o trabalho de Garcez *et al* (2013), "*Effects of photodynamic therapy on gram-positive and gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis*". Conforme relatam os autores, a TFD é uma técnica eficaz em matar diferentes classes de microorganismos, tais como bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo assim, uma técnica promissora na erradicação de bactérias orais. Ainda segundo os autores, a cavidade oral possui uma microflora complexa, com mais de mil diferentes espécies encontradas na boca e a maioria delas pode ser encontrada atadas a superfícies formando biofilmes. Como as bactérias podem apresentar resistência aos tratamentos convencionais, a busca por uma alternativa se faz necessário e a TFD se apresenta promissora para superar este problema relacionado à resistência das bactérias aos antibióticos [16].

O objetivo de estudo do trabalho de Garcez *et al* (2013) foi testar a TFD como uma abordagem antibiótica na ruptura de biofilmes formados no esmalte do dente. No trabalho foram estudadas duas bactérias, *Gram + cocci E. faecalis* e *Gram- bacilli P. aeruginosa*. O tratamento da TFD foi feito a partir do uso do azul de metileno como fotosensibilizador e um laser de baixa potência em 660nm. Os resultados demonstraram que ambas as espécies de bactérias podem ser reduzidas por meio da TFD [16].

1.2 Fotosensibilizadores

Como citado anteriormente, para que a terapia fotodinâmica seja aplicada, são necessários três componentes: um fotosensibilizador, luz e oxigênio. Neste sentido, temos que o FS desempenha um papel crucial na aplicação da TFD e muito esforço é empregado para que os FS sejam melhores caracterizados quanto a sua eficiência e seletividade. Entretanto, devido as suas propriedades fotoquímicas, apenas alguns FS são aprovados globalmente e estão em uso clínico. Na tabela 1 são apresentados alguns exemplos de fotosensibilizadores que são aprovados ou estão em testes clínicos para o tratamento de câncer [1].

Fotosensibilizador	Família	λ (nm)	Cancer
Derivado da hematoporfirina (Photofrin)	Porfirina	630	Pulmão, esôfago e etc.
5-ALA: 5-ácido aminolevulínico (Levulan)	Precursor porfirina	630	Pele, bexiga e etc.
MAL: aminolevulinato de metila (Metvix)	Precursor porfirina	630	Pele.
h-ALA:L aminolevulinato de hexilo (Hexvix)	Precursor porfirina	Luz branca	Célula basal.
BDP: derivado da benzoporfirina (Visudyne)	Porfirina	690	Pâncreas, seios.
Palladium bactereopheophorbide, padeliporfin, WST-11 (Tookad)	Porfirina	762	Esôfago, próstata.
Temoporfin, mTHPC: meso-tetrahydroxyphenylchlorine (Foscan)	Clorina	652	Cabeça, pescoço e etc.
Talaporfin, mono-L-aspartyl chlorin e6, NPe6, LS11 (Laserphyrin)	Clorina	660	Fígado, cólon e etc.
HPPH: 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor)	Clorina	665	Cabeça, pescoço e etc.
Rostaporfin, SnEt2: tin ethyl etiopurpurin I (Purlytin)	Clorina	660	Pele, seios.
Fimaporfin, disulfonated tetraphenyl chlorin, TPCS2a (amphinex)	Clorina	633	Câncers superficiais.
Motexafin lutetium (Lutex)	Texaphyrin	732	Seios.

Tabela 1 – Fotosensibilizadores aprovados ou em fase de testes clínicos no tratamento de câncers [1]

Os derivados da hematoporfirina (Photofrin) foram os primeiros fotosensibilizadores a serem aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) como fotosensibilizador empregado na TFD em 1995 [17]. Atualmente há três gerações de fotosensibilizadores, sendo o photofrin parte da primeira geração. A segunda geração incluem as porfirinas, clorinas, feofórbidos e etc. Em especial, na segunda geração temos classificado o FS 5-ALA que atua como um precursor de FS que é metabolizado na protoporfirina IX (PpIX) [17]. Os FS de terceira geração são aprimorados para melhor seletividade e estão divididos em outras categorias como: TFD e nanotecnologia, TFD mediada por engenharia genética e TFD com carreadores.

1.2.1 5-ácido aminolevulínico

Dos FS citados anteriormente, vamos comentar brevemente sobre o FS 5-ácido aminolevulínico (5-ALA). O 5-ALA é um metabólico intermediário natural produzido no caminho metabólico da hemoglobina [17]. Após administração oral, 5-ALA se infiltra nas células cancerígenas e dentro da mitocondria o 5-ALA é convertido em PpIX. Uma vez formado, o PpIX possui uma fluorescência em 635nm após excitado em 410nm e possui 4 bandas de absorção entre 480nm e 650nm. Vale ressaltar que o 5-ALA é aprovado pela FDA para tratamentos com a TFD para queratose actínica [17].

1.3 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é tratar a caracterização de FS aplicados à TFD como também a utilização da técnica de lente térmica como técnica auxiliar, em complemento com outras técnicas, nesta caracterização. Em particular, a técnica de lente térmica tem um intervalo de aplicação para baixas concentrações, nas quais as técnicas comerciais não apresentam sensibilidade suficiente.

1.4 Desenvolvimento do trabalho

Conforme exemplificado anteriormente, o conhecimento das propriedades fisico-quimicas dos FS é de extrema importância para a aplicação da técnica e os resultados que serão apresentados neste trabalho corroboram para o entendimento e melhores aplicações clínicas.

No próximo capítulo será apresentado o desenvolvimento teórico da técnica de lente térmica, em particular, para o modelo em que há fotodegradação das moléculas excitadas. Este desenvolvimento teórico se faz necessário tendo em vista a importância da técnica no desenvolvimento deste trabalho, em especial, na temática proposta no capítulo 3, no qual será trabalhado a fotoconversão da protohipericina em hipericina buscando compreender os processos intermediários que ocorrem entre o reagente e o produto. Posteriormente, será trabalhado outro estudo que busca compreender os mecanismos de fotodegradação da eritrosina, tentando verificar a influência do estado tripleto do corante e do oxigênio singlete neste processo. Por fim, no capítulo 4 deste trabalho será apresentado a análise feita no sinal de lente térmica pulsada para a eritrosina e para a água em diferentes escalas temporais, tendo em vista que efeitos diferentes ocorrem em intervalos temporais específicos.

Neste trabalho, os capítulos serão abordados de forma independente, uma vez que cada capítulo está relacionado como uma temática diferente.

2 Descrição teórica da técnica de Lente Térmica

2.1 Introdução

Os efeitos fototérmicos estão relacionados com diversas técnicas de caracterização termo-óptica de materiais sólidos, líquidos e gasosos. Esta interação está relacionada com a incidência de uma onda eletromagnética em um material, que resulta em efeitos como variação de temperatura, deformação estrutural, absorção e emissão, difusão de massa, efeitos fotoquímicos e etc. A transformação parcial da energia transportada por uma onda eletromagnética em energia térmica é o fundamento da técnica de lente térmica (LT). A formação da LT se dá por meio da absorção da energia proveniente de um laser de excitação que consequentemente, é convertida em energia térmica resultando em uma variação de temperatura local. A variação do índice de refração faz com que o material atue como uma lente divergente ou convergente, dependendo das propriedades do material. A lente gerada afeta o caminho óptico de um laser utilizado para provar o efeito, resultando em uma variação na intensidade da parte central do feixe de prova, monitorada no campo distante.

A primeira observação experimental do efeito de LT foi feita por Porto *et al* (1965) [18], que posteriormente foi aprimorada no modelo aberrante de Sheldon *et al* (1982) [19]. O modelo de LT de dois feixes descasados surgiu em 1992 com o trabalho de Shen *et al* (1995) [20]. Embora a aplicabilidade do modelo de Shen seja limitada devido às aproximações empregadas e diversos trabalhos posteriores, como os que foram propostos por Malacarne *et al* [21, 22, 23] (2010-2014), terem desenvolvido o modelo de forma mais ampla, o aparato experimental ainda é estruturado de acordo com a proposta de Shen.

No modo descasado dois feixes gaussianos CW (do inglês, *continuos wave*) TEM₀₀ (modo transversal da radiação eletromagnética medido no plano transversal a direção de propagação) são utilizados para gerar (laser de excitação) e provar (laser de prova) o efeito de LT. Vale ressaltar que o laser de excitação utilizado pode ser contínuo ou pulsado, o que resulta em processos diferentes sendo induzidos em cada caso.

Neste trabalho, no qual abordaremos a caracterização de fotosensibilizadores, devemos considerar que durante a excitação por meio do laser ocorrerá fotoreação, o que afeta a produção de calor já que ocorre uma variação na absorção óptica da amostra. O processo de fotoreação pode ser caracterizado, uma vez que a variação na quantidade de calor produzido, e portanto a variação no caminho óptico, reduzem a amplitude do sinal de lente térmica. Também deve-se considerar que uma mudança na fluorescência também afeta a quantidade de calor gerado, induzindo assim uma mudança na amplitude. Entretanto, como estes efeitos ocorrem em escalas temporais diferentes, ambos os efeitos são facilmente detectáveis [23, 24, 25].

2.2 Descrição teórica

Como dito anteriormente, a variação de temperatura gerada pela absorção de energia do laser de excitação, acarreta em uma variação no índice de refração do material que se traduz em uma variação no caminho óptico do laser de prova. Considerando uma simetria axial para o feixe de prova se propagando na direção *z*, o caminho óptico é definido como [22]:

$$S(r,t) = \int_{caminho} n(r,z,t)dz,$$
(2.1)

na qual n(r, z, t) é o índice de refração do material. A variação no caminho óptico resulta em uma diferença de fase na frente de onda do feixe de prova:

$$\Phi(r,t) = \frac{2\pi}{\lambda_p} [S(r,t) - S(0,t)],$$
(2.2)

com λ_p sendo o comprimento de onda do laser de prova.

O sinal de lente térmica é modulado por meio da variação de intensidade no plano do detector. Esta variação é dada por [21, 22, 23]:

$$I(t) = I_0 |U(Z_1 + Z_2, t)|^2,$$
(2.3)

em que $U(Z_1 + Z_2, t)$ é a amplitude complexa do campo elétrico do laser de prova ao atravessar a amostra e pode ser descrita por:

$$U(Z_1 + Z_2, t) = C \int_0^\infty e^{-(1+iV)g - i\Phi(g,t)} dg,$$
(2.4)

com Z_1 e Z_2 sendo a distância entre a cintura do feixe de prova e a amostra, e a distância da amostra até o fotodetector, respectivamente. Na equação anterior, V e g são dados por:

$$V = \frac{Z_1}{z_c} + \frac{z_c}{Z_2} [1 + (\frac{Z_1}{Z_2})^2],$$
(2.5)

na qual z_c é a distância confocal do feixe de prova.

$$g = \left(\frac{r}{\omega_{1p}}\right)^2,\tag{2.6}$$

e ainda, C é dado por:

$$C = \sqrt{\frac{2P_P}{\pi}} \frac{i\pi\omega_{1p}^2}{\lambda_p Z_2} e^{-2i\pi(Z_1 + Z_2)/\lambda_p},$$
(2.7)

e com P_p e ω_{1p} sendo a potência e o raio do feixe de prova na amostra.

Considerando agora o caso de líquidos e que ocorra fotoreação nos mesmos durante a excitação laser, deve ser levado em conta que o coeficiente de absorção óptico dependente do tempo é descrito por [23, 24, 25, 26] :

$$\beta(r,t) = C_R(r,t)\epsilon_R + C_p(r,t)\epsilon_p + \beta_{sol},$$
(2.8)

no qual $C(r,t) \in \epsilon$ são a concentração e o coeficiente de absorção molar, respectivamente, para os reagentes e para os produtos. β_{sol} é o coeficiente de absorção óptico do solvente. Quando há uma conservação dos compostos ($C_R + C_P = C_0$) e $C_P(r, 0) = 0$, o coeficiente de absorção óptico pode ser escrito como:

$$\beta(r,t) = \beta_0[(1-\epsilon)C_R(r,t)/C_0 + \epsilon] + \beta_{sol}, \qquad (2.9)$$

em que β_0 é o valor inicial do coeficiente de absorção óptico dos reagentes e $\epsilon = \epsilon_P/\epsilon_R$ é a razão entre os coeficientes de absorção molar do produto e do reagente.

Como os gradientes térmico e de concentração afetam o caminho óptico do laser de prova, a diferença de fase induzida deve ser reescrita da seguinte forma:

$$\Phi(r,t) = \frac{2\pi}{\lambda_p} \int_0^L \left[\frac{dn}{dT} T(r,t) + \frac{dn}{dC_R} C_R(r,t) \right] dz,$$
(2.10)

na qual T(r,t) e $C_R(r,t)$ são os gradientes térmico e de concentração induzidos.

Considerando que quando o transiente é descrito apenas por um processo de relaxação térmica, ou seja, quando o efeito de lente de concentração pode ser desprezado, a parte do transiente relacionada a quando o laser não está mais incidindo na amostra (laser off) não excede o valor inicial [23]. A figura 2 exemplifica com os transientes para soluções de protohipericina e hipericina, o caso em que há a presença de fotoreação (protohipericina), no qual tem-se o transiente térmico característico seguido por uma variação na amplitude do transiente após o tempo térmico usual, e o caso em que apenas o comportamento térmico é observado (hipericina). Pode-se observar ainda que em ambos os casos o transiente off apresenta apenas uma relaxação térmica, indicando que os efeitos de lente de concentração podem ser negligenciáveis.



Figura 2 – Transiente de lente térmica para soluções de protohipericina e hipericina. Laser on (de 0 a 2.5s) e laser off (de 2.5s a 4.5s).

Vale ressaltar que a evolução temporal do transiente de LT é caracterizada pela variação de temperatura e concentração das moléculas excitadas. Ao considerar fluídos de baixa absorção óptica, a atenuação da luz na direção azimutal pode ser desconsiderada, e o gradiente térmico é descrito pela equação de difusão de calor [23]:

$$\frac{\partial}{\partial t}T(r,t) - D_{th}\nabla_r^2 T(r,t) = \theta_{th}P_e[\beta(r,t)/\beta_0]e^{-2r^2/\omega_{0e}^2}f(t),$$
(2.11)

no qual θ_{th} é dado por:

$$\theta_{th} = \frac{2\beta_0\phi}{\rho c_p \pi \omega_{0e}^2},\tag{2.12}$$

com D_{th} , $\rho \in c_p$ sendo o coeficiente de difusividade térmica, a densidade e o calor específico da amostra, respectivamente. ϕ é a fração de energia absorvida que é convertida em energia térmica. $P_e \in \omega_{0e}$ são a potência e o raio na cintura do feixe do laser de excitação. Tem-se ainda que a função f(t) é descrita por:

$$f(t) = [1 - H(t - \xi)], \tag{2.13}$$

na qual $H(t-\xi)$ é a função Heaviside Theta e está relacionada com a parte on/off do laser de excitação.

Considerando uma reação de primeira ordem, o gradiente de concentração é descrito pela equação de difusão de massa [23]:

$$\frac{\partial}{\partial t}C_R(r,t) - D_m \nabla_r^2 C_R(r,t) = -K_R P_e e^{-2r^2/\omega_{0e}^2} C_R(r,t) f(t),$$
(2.14)

no qual K_R é a taxa de reação e D_m é o coeficiente de difusividade de massa. O termo de difusão na eq. 2.14 está relacionado com a reposição molecular por movimento browniano do volume irradiado para o volume não-irradiado.

A obtenção de uma expressão analítica como solução das equações 2.11 e 2.14 só é possível assumindo uma média espacial de cada termo na equação de concentração, $C_R(t) = \langle C_R(r,t) \rangle_r$, que resulta na equação de taxa efetiva:

$$\frac{d}{dt}C_R(t) = -K_T C_R(t).$$
(2.15)

A taxa de reação total K_T representa as taxas médias de fotoreação e movimento molecular por difusão.

Neste trabalho, será adotado uma abordagem numérica para analisar o processo de fotoconversão da protohipericina em hipericina, por meio da resolução numérica das equações 2.11 e 2.14 assim como feito por Malacarne *et al* (2014) [23].

2.3 Aparato experimental

No aparato experimental da técnica de lente térmica, utilizamos um laser de excitação (neste trabalho em 532nm) para gerar o efeito. O laser de excitação pode ser contínuo ou pulsado, como mencionado anteriormente e neste trabalho abordaremos as duas montagens experimentais. Também utilizamos um laser de prova (neste trabalho em 632.8nm). O laser de excitação foi focado na amostra por meio de uma lente e o feixe do laser de prova passava pela amostra praticamente colinear ao feixe de excitação e atravessava uma outra lente. O ângulo entre os feixes de prova e excitação era < 1.5° afim de que se pudesse empregar o modelo colinear. No caso de uma excitação contínua, a irradiação do feixe de excitação na amostra foi controlada por meio de um obturador mecânico. A intensidade da parte central do feixe de prova foi medida por meio de um conjunto pinhole-filtro-fotodiodo, posicionado no campo distante. A medida da intensidade do feixe de prova foi acionada por meio de um outro fotodiodo. Os sinais dos fotodiodos foram obtidos por meio de um osciloscópio digital. As amostras foram depositadas

em uma cubeta de quartzo. Uma representação do aparato experimental, no caso de uma excitação contínua e pulsada, pode ser observada nas figuras 3 e 4. Ressaltamos que os parâmetros geométricos serão explicitados em cada capítulo, uma vez que as montagens foram específicas em cada caso.



Figura 3 – Aparato experimental de lente térmica no modo descasado com dois feixes e excitação contínua. *L_i*, *M_i*, *P_i* são lentes, espelhos e fotodiodos, respectivamente.



Figura 4 – Aparato experimental de lente térmica no modo descasado com dois feixes e excitação pulsada. *L_i*, *M_i*, *P_i* são lentes, espelhos e fotodiodos, respectivamente.

3 Análise da fotoconversão da protohipericina em hipericina

3.1 Introdução

O conhecimento das propriedades fotofísicas dos fotosensibilizadores pode nos ajudar a ter uma melhor aplicação terapêutica, por exemplo, altas absorções ópticas podem reduzir a quantidade de fotosensibilizador administrada para que se obtenha uma resposta desejada. A máxima absorção óptica em comprimentos de onda relativamente longos ajudam a aumentar a penetração da luz nos tecidos alvos. E ainda, quanto maior o tempo de vida do estado tripleto do fotosensibilizador, maior será a produção de oxigênio singlete [6, 8, 12].

O desenvolvimento da TFD está diretamente relacionado com a investigação dos fotosensibilizadores e a ampla pesquisa destes tem sido realizada em diversas condições, com o objetivo de minimizar efeitos colaterais. Dentre os muitos FS estudados atualmente, um FS natural, a hipericina (Hyp), se mostra promissor devido a suas ótimas propriedades. A Hyp além de possuir alta absorção óptica e baixa toxicidade, ainda possui propriedades antivirais, antitumorais e seletividade a tecidos [27, 28, 29, 30, 31]. A erva de São João, nome popular da espécie H. perforatum L, do gênero Hypericum, é utilizada em grande maioria para a extração da Hyp, entretanto, existe atualmente estudos que buscam uma rota sintética para a produção de Hyp devido à baixa eficiência na extração natural [29, 32, 33].

Dentre as diversas buscas na produção de Hyp, ressalta-se os seguintes trabalhos a título de exemplificação: Hirose *et al* [34], que em seu trabalho desenvolveram uma rota sintética em um procedimento de doze etapas. Kraus et al [35], que apresentaram um procedimento em seis etapas. Kim *et al* [36], que propuseram um procedimento em oito etapas. Por fim, Huang *et al* [33], que aplicaram uma rota semi-sintética para a produção de protohipericina (pHyp), que era convertida em Hyp por um processo de fotociclização.

Atualmente sabemos que a utilização de um LED (do inglês, light emission diode) (lambda 532nm) aperfeiçoa o processo de fotociclização de pHyp em Hyp, uma vez que as lâmpadas de vapor de mercúrio induzem efeitos colaterais negativos, como a fotodegradação de Hyp [37].

A caracterização completa da Hyp é necessária, uma vez que os mecanismos fisico-quimicos de sua produção ainda não são completamente conhecidos, tendo em vista que a concentração de pHyp, solvente, comprimento de onda incidente e uma série de outras variáveis estão relacionadas de forma prioritária no processo de fotoconversão. Para que esta caracterização completa seja realizada é necessário a utilização de diversas técnicas para que todos estes fatores sejam contemplados.

A técnica de LT tem sido utilizada neste âmbito em conjunto com outras técnicas de espectroscopia para a caracterização de materiais, englobando aspectos como a determinação do coeficiente de absorção óptico [38, 39], investigação de processos de fotodegradação, caracterização da difusividade térmica e difusividade de massa de biocombustíveis [40, 41, 42], corantes e soluções micelares [26, 43, 44, 45]. O método ainda pode ser utilizado para estudar as propriedades ópticas de polímeros e vidros [46, 47, 48, 49, 50]. Existem diversos outros trabalhos sobre as aplicações da técnica de lente térmica na literatura.

Neste trabalho, nós utilizamos a alta sensibilidade e aspecto remoto da técnica de LT para inves-

tigar a fotoconversão da protohipericina em hipericina. As medidas foram realizadas em diferentes concentrações de protohipericina e diferentes potências do laser de excitação. As dependências da taxa de fotoreação com a concentração de protohipericina resulta em informações sobre espécies intermediárias formadas em reações em cadeia no processo de fotoconversão.

3.2 Metodologia

Quanto ao aparato experimental utilizado neste estudo, o laser de excitação foi um laser semicondutor (Coherent, modelo Verdi 2G) e o laser de prova foi um laser He-Ne (Uniphase, modelo 11335p). A distância focal da lente empregada para focar o laser de excitação na amostra foi de $f_1 = 30cm$. A distância focal da lente que o laser de prova atravessava era de $f_2 = 15cm$. O obturador mecânico utilizado foi um SRS, modelo SR470. O conjunto pinhole-filtro-fotodiodo empregado foi da Thorlabs, modelo DET100A/M, posicionado em $Z_2 = 500cm$ e o outro fotodiodo utilizado para acionar a medida foi da Thorlabs, modelo PDA10A. Os sinais dos fotodiodos eram obtidos por meio de um osciloscópio digital (Tektronix, modelo TDS1001B). As amostras eram depositadas em uma cubeta de quartzo de espessura igual a 2mm. A cubeta era mantida a 25° C por meio de um forno resistivo. Uma representação do aparato experimental pode ser observada na figura 3. Os parâmetros geométricos para esta configuração foram: $\omega_{0e} = 63.5\mu m$, $\omega_{1p} = 337.5\mu m$ e V = 7.09.

As amostras de protohipericina foram preparadas em quatro concentrações (100nM, 200nM, 300nM e 400nM) em etanol e armazenadas em frascos âmbar. As medidas de LT foram realizadas em cada amostra utilizando quatro potências diferentes para o laser de excitação e a temperatura foi mantida em 25° C. Por conseguinte, o espectro de absorção óptica foi medido utilizando um espectrofotômetro (PerkinElmer, modelo Lambda 1050). As amostras eram postas em cubetas de quartzo de espessura igual a L = 1cm, e os espectros foram obtidos no intervalo de 400nm a 700nm.

3.3 Discussão dos resultados

O espectro de absorção da pHyp e da Hyp (diluídas em etanol) são apresentados na figura 5. Nota-se a ampla absorção da pHyp na região do visível do espectro, podendo-se ainda ressaltar os picos característicos em 543nm e 580nm. Já a Hyp exibe um intenso pico em 591nm e outro pico em 543nm. Para fornecer a energia necessária para induzir a reação fotoquímica de fotociclização da pHyp em Hyp, é necessário que o comprimento de onda do laser de excitação seja relativamente próximo ao pico de absorção da pHyp, neste trabalho, como o laser de excitação utilizado possuía o comprimento de onda de 532nm, ele pode ser empregado. Em contrapartida, é esperado que o laser de prova não seja absorvido pela amostra, neste caso, como o comprimento de onda selecionado foi 632.8nm e tanto a pHyp quanto a Hyp possuem baixa absorção óptica em tal comprimento de onda, ele também pode ser empregado.



Figura 5 – Espectro de absorção para a protohipericina e para a hipericina em concentrações de $20\mu M$ em etanol. As linhas tracejadas indicam o comprimento de onda da excitação e prova na lente térmica.

O processo de ajuste dos transientes de lente térmica pode ser relativamente complexo, entretanto, considerando o regime de baixa absorção óptica para os corantes, as propriedades térmicas da amostra podem ser consideradas equivalentes às do solvente empregado, facilitando assim o ajuste teórico. Como as amostras de etanol puro não apresentam fotodegradação no comprimento de onda do laser de excitação, o transiente de lente térmica do etanol pode ser ajustado considerando $\beta(r,t) = \beta_{sol}$ e o resultado da curva ajustada é apresentado na figura 6.



Figura 6 – Sinal de lente térmica para o etanol (círculos). A linha contínua representa o ajuste teórico.

Posteriormente, os resultados para a difusividade térmica, $D_{th} = (1.0 \pm 0.1) \times 10^{-7} m^2/s$ e $\beta_{sol} = (0.08 \pm 0.01)m^{-1}$, obtidos do ajuste e os valores encontrados na literatura para a densidade ($\rho = 789.3kg/m^3$), calor específico ($c_p = 2570J/kgK$) e para taxa de variação do índice de refração em função da temperatura ($dn/dT = -4 \times 10^{-4}K^{-1}$) foram utilizados para o tratamento dos transientes de LT nas análises das amostras de pHyp [51].

Como mencionado anteriormente, o ajuste teórico dos dados experimentais pode ser ligeiramente complicado, em seu trabalho [23], Malacarne *et al* (2014) estudaram a estabilidade dos transientes de LT em um ajuste multiparamétrico. Seguindo a proposta de Malacarne *et al* (2014), os parâmetros ϵ e D_m foram fixados afim de se obter valores mais precisos da constante de fotoreação K_R e θ_{th} . O resultado do ajuste está apresentado na figura 7. Considerando que para um tempo muito curto (neste caso, aproximadamente 0.2s), o transiente de lente térmica é predominantemente governado pelo efeito térmico, podendo assim ser negligenciado o efeito de fotodegradação no ajuste, ϵ pode ser estimado por:

$$\epsilon = \frac{\theta_{th}^{Hyp}}{\theta_{th}^{Phyp}},\tag{3.1}$$

em que θ_{th}^{Hyp} e θ_{th}^{Phyp} são obtidos dos ajustes de transiente curto para para a Hyp e pHyp nas mesmas concentrações.

O valor $\epsilon = 0.4$ foi obtido por meio da equação 3.1. O mesmo valor $\epsilon \approx 0.4$ foi obtido por meio dos valores relativos de absorbância medidos a partir do espectro de absorção na figura 5. Por outro lado, o valor para a difusividade de massa foi obtido da literatura, $D_m = 1.0 \times 10^{-10} m^2/s$, um valor usual para a difusividade de macromoléculas [52, 53].



Figura 7 – Sinal de lente térmica para a protohipericina (círculos) nas seguintes concentrações: a) 100nM; b) 200nM; c) 300nM; d) 400nM. As linhas contínuas representam os ajustes teóricos.

Os ajustes teóricos foram obtidos utilizando a equação 2.3 em um procedimento de ajuste não linear com θ_{th} e K_R livres e D_{th} , D_m , β_{sol} e ϵ fixos. Os resultados são apresentados na figura 7. Os transientes de lente térmica para diferentes concentrações de pHyp e potências do laser de excitação são representados pelos círculos e os ajustes são representados pelas linhas contínuas.

Primeiramente, vale ressaltar que, como esperado, foi observado que ambos os parâmetros, θ_{th} e K_R , são independentes da potência de excitação. Por conseguinte e por intermédio da figura 8, pode-se observar uma dependência linear entre estes parâmetros com a concentração de pHyp.



Figura 8 – Dependência dos parâmetros (a) θ_{th} e (b) K_R com a concentração de protohipericina (círculos) em etanol obtidos por meio da técnica de lente térmica. A linha contínua representa o ajuste linear.
Afim de confirmar a dependência da taxa de fotodegradação com a concentração de pHyp, amostras com diferentes concentrações de protohipericina foram iluminadas com um fotoreator acoplado a um espectrofotômetro, no qual as amostras eram postas em uma cubeta de espessura de 1cm e com um Peltier para o controle da temperatura. Medidas de absorção ($\lambda \approx 600nm$) foram feitas para monitorar a cinética de fotoreação K_b (dada em s^{-2}), que está relacionada com a reação de pseudo-primeira ordem do reagente,

$$\frac{dC_R(t)}{dt} = -K_b C_R(t). \tag{3.2}$$

Observemos que na técnica de lente térmica, as amostras são iluminadas por um feixe de laser com uma distribuição de intensidade conhecida, o que permite a definição precisa da constante de reação em unidades de J^{-1} . Nas medidas de absorção, além de existir a dificuldade em determinar o número de fótons por unidade de área, a concentração necessária para detectar qualquer mudança na transmitância é aproximadamente duas ordens de magnitude maior do que as necessárias no experimento de lente térmica. Portanto, não existe nenhuma relação direta entre as duas constantes K_R (obtida por meio da técnica de lente térmica) e K_b (obtida por intermédio dos espectros de absorção), já que ambos os parâmetros são obtidos em diferentes condições experimentais. Contudo, a linearidade de K_b com a concentração também é observada e é apresentada na figura 9.



Figura 9 – Dependência do parâmetro K_b com a concentração de protohipericina (círculos) em etanol obtidos por meio dos espectros de absorção. A linha contínua representa o ajuste linear.

Analisemos mais uma vez a figura 7 que apresenta os transientes de lente térmica para diferentes valores de potências de excitação e concentração de protohipericina. Quando o laser é irradiado na amostra, a energia absorvida pela protohipericina gera uma variação de temperatura local que possui sua dinâmica ditada pela equação de difusão de calor. A variação de temperatura induz um gradiente de índice de refração que atua como um elemento óptico para o feixe de prova, alterando sua propagação. A lente térmica resulta em um decréscimo na intensidade do feixe de prova no fotodiodo com o tempo, como mostrado na figura 6 (apenas efeito térmico). Para a protohipericina, a intensidade do sinal decresce para t < 0.2s como pode ser observado na figura 7. Em seguida, a energia absorvida pela amostra induz uma fotoconversão de protohipericina em hipericina e uma correspondente mudança na absorção com o tempo. A diminuição da absorção com o tempo se torna evidente dado o aumento da intensidade do feixe de prova no fotodiodo são o tempo característico térmico é dado pela constante de fotoreação K_R . Assim, os transientes obtidos são resultados de uma combinação entre efeitos térmicos e de fotoreação.

Os valores dos parâmetros θ_{th} e K_R foram obtidos por meio de um ajuste numérico dos dados experimentais utilizando a equação 2.3 e são apresentados em função da concentração na figura 8. Uma dependência linear de θ_{th} com a concentração é esperada já que θ_{th} exibe uma relação linear com o coeficiente de absorção óptico da protohipericina, $\beta_0 = \epsilon_0 C_0$.

A fotoreação observada no transiente de LT para a pHyp, refletida na mudança de intensidade (devido a variação na absorção do feixe de excitação) no sinal após o tempo térmico característico, é uma verificação direta da fotoconversão de pHyp em Hyp. Se for assumido uma reação de primeira ordem:

$$pHyp + h\nu \to Hyp,$$
 (3.3)

a taxa de fotoreação deve ser independente da concentração de protohipericina. Entretanto, como pode ser observado nas figuras 8 e 9, as constantes K_R e K_b apresentam uma dependência com a concentração de protohipericina, este crescimento linear da taxa de fotoreação com a concentração de protohipericina indica a presença de etapas extras no processo de fotoconversão da protohipericina em hipericina, que pode envolver subprodutos no processo de fotociclização, sendo assim, não podendo ser caracterizada por uma reação de primeira ordem.

A dependência observada para a taxa de fotoreação em função da concentração pode ser explicada por um mecanismo de Lindemann-Hinshelwood, conforme descrito nos trabalhos de Brockmann *et al* (1949) e Muszat *et al* (1988) [54, 55]. A reação aparentemente unimolecular se quebra em duas ou mais etapas, com constantes características próprias para cada etapa. As etapas de fotoconversão da pHyp em Hyp (figura 10, estrutura a para b) envolvem um intermediário denominado hidro-protohipericina ou/e uma forma fotocrômica (figura 10, estrutura c para d). Entretanto, como a forma fotocrômica da protohipericina passa por uma troca rápida e irreversível do átomo de hidrogênio indo para a hidro-protohipericina, assume-se aqui um mecanismo mais simples para a fotociclização da prohipericina:

$$2A + h\nu \to B + D \tag{3.4}$$

$$D + O_2 \to H_2 O_2 + A \tag{3.5}$$



Figura 10 – Estrutura dos compostos: a) Protohipericina; b) Hipericina; c) Forma fotocrômica da protohipericina; d) Hidro-protohipericina.

Na primeira reação, o estado singleto excitado da pHyp resulta diretamente em uma Hyp e do estado tripleto é formada a forma instável hidro-pHyp, representada no diagrama a seguir:

$$A + h\nu \longrightarrow {}^{1}A^{*} \xrightarrow{\nearrow}$$

$$3A^{*} \longrightarrow D$$
(3.6)

Este intermediário reage com o oxigênio molecular resultando em uma pHyp e em uma molécula de peróxido de hidrogênio. Em adição, o estado excitado, singleto ou tripleto, pode retornar para o estado fundamental por fluorescência ou fosforecência. A reação aparentemente de primeira ordem é na verdade uma reação de pseudo-primeira ordem com uma constante característica $K_R = K_{Hyp}[A]$, com K_{Hyp} sendo obtido por meio do slope do plote de K_R em função da concentração de protohipericina.

Embora os mecanismos envolvidos na cadeia da fotoreação e todas as etapas na produção de Hyp não serem completamente conhecidas, tornando necessária a realização de investigações posteriores para uma descrição completa, a LT demonstrou ter potencial para análises de soluções em baixa concentração, nas quais as técnicas de transmitância convencionais não são aplicadas.

3.4 Conclusão

A fotoconversão induzida da pHyp em Hyp foi estudada por meio da técnica de LT. Os resultados mostraram uma relação entre a taxa de fotoreação com a concentração de pHyp no intervalo de 100nM a 400nM. A taxa de fotoreação apresentou um comportamento linear com a concentração, indicando possíveis espécies intermediárias no processo de fotoconversão de pHyp em Hyp. A aplicabilidade da técnica de LT é demonstrada para a caracterização fotoquímica de fotosensibilizadores com grande potencial de aplicação na terapia fotodinâmica, especialmente em regimes de baixa concentração, a técnica de LT pode ser utilizada posteriormente para a determinação da eficiência de fotoconversão e a eficiência quântica de fluorescência por meio de análises do parâmetro θ_{th} , que está relacionado com a fração de energia absorvida disponível para a conversão em calor. Mudanças na eficiência quântica de fluorescência quântica de fluores sobre a interação entre o fotosensibilizador, diferentes solventes e espécies químicas que podem mudar a atividade fotodinâmica.

4 Cinética de fotodegradação da Eritrosina

4.1 Introdução

Como já discutido, a terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica utilizada para combater várias doenças utilizando um composto sensível a luz conhecido como fotosensibilizador (FS) que quando exposto seletivamente a luz na presença do oxigênio molecular se torna tóxico a células, resultando na morte celular [5, 6, 9, 10, 11, 12, 56, 57].

Características como baixa toxicidade na ausência de luz, alta afinidade com os tecidos doentes, sensitividade não prolongada, alta solubilidade em meios aquosos e biológicos, alta geração de espécies radicais e formas reativas do oxigênio, e rápida eliminação do corpo, são constantemente procuradas nos FS. Sendo assim, a relação entre a produção de oxigênio singlete, fotodegradação e o tempo de vida do estado tripleto se faz necessária para a otimização das propriedades dos FS e assim otimizar a performance na TFD.

Os mecanismos da fotoreação devem ser considerados complexos [58], já que estes apresentam uma forte dependência com as condições do meio ou de excitação. A dinâmica de fotoreação não pode ser descrita por um comportamento exponencial simples ou duplo, já que a complexidade da fotoreação é caracterizada por diversas taxas de reação, que por sua vez também dependem das condições físicas. Podemos caracterizar de forma simples a fotoreação por uma competição entre mecanismos do tipo corante-corante (CC), corante-oxigênio (CO) e corante-supressores (CS). Embora o grande número de estudos, a relação direta entre o estado tripleto e a fotoreação não é completamente compreendida.

A degradação dos FS resulta em formas semi-reduzidas ou semi-oxidadas, na qual o papel de cada mecanismo citado anteriormente depende da concentração do FS, oxigênio e supressores [58, 59]. Como a eritrosina apresenta uma alta eficiência quântica de produção do estado tripleto com um rápido cruzamento entre os estados singleto e tripleto e um tempo de vida longo no estado tripleto, ela é um FS ideal para estudar a relação entre o estado tripleto e a fotoreação.

Diversos métodos são necessários para a caracterização completa dos mecanismos de fotoreação, devido as suas complexidades e devido a sua relação com a produção de oxigênio singlete. Neste quesito, a cinética de fotodegradação que pode ser analisada por meio de uma mudança na absorção e emissão dos FS em função do tempo de exposição à irradiação de luz monocromática em um determinado comprimento de onda, fornece informações importantes sobre o processo de fotodegradação. Entretanto, a sensibilidade de cada uma das técnicas empregadas é um problema, tendo em vista que cada técnica permite a análise em um intervalo específico de concentração. As técnicas comerciais geralmente não conseguem ser utilizadas para análises de amostras em concentrações muito diluídas (abaixo do regime micromolar). Entretanto, a técnica de lente térmica tem se mostrado um método capaz de ser empregado para soluções muito diluídas, o que permite a investigação do fotobranqueamento e da absorção não-linear de corantes orgânicos [23, 24, 25, 26, 45].

Neste trabalho, utilizamos um conjunto de técnicas ópticas para investigar o processo de fotoreação da eritrosina. A LT e técnicas de transmitância foram utilizadas para investigar as contribuições dos processos CC, CO e CS, nos processos de fotoreação e a correlação deles com o tempo de vida do estado tripleto do fotosensibilizador. A cinética de fotoreação da eritrosina foi realizada na presença da cisteamina (MEA, do inglês mercaptoethylamine), um supressor conhecido do estado tripleto e purgando oxigênio por meio de uma injeção de gás nitrogênio (N) na solução.

4.2 Metodologia

4.2.1 Reagentes

Eritrosina B ($C_{20}H_6I_4Na_2O_5 \approx 95\%$), Eosina Y ($C_{20}H_8Br_4O_5, \approx 99\%$), Fluoresceína ($C_{20}H_{12}O_5, \approx 100\%$) e o supressor do estado tripleto, cisteamina (MEA, $NH_2CH_2CH_2SH$, $\approx 95\%$) foram obtidos na Sigma Aldrich e todos os reagentes utilizados neste trabalho não passaram por uma purificação adicional. Todas as amostras foram preparadas em solução tampão fosfato-salino (PBS, do inglês phosphate buffered saline) para manter o Ph em torno de 7.4. As amostras com os FS e supressores eram preparadas antes de cada medida. Tendo em vista que cada técnica empregrada trabalha em um intervalo de concentração específico, as amostras foram preparadas para obter uma boa sensitividade para cada uma delas. Na transmitância resolvida no tempo, a menor concentração de eritrosina foi de 25μ M. Nas cinéticas de absorção e emissão os espectros foram medidos em soluções de eritrosina com concentração de 5μ M e 1μ M, respectivamente. Na técnica de LT foram utilizadas concentrações nanomolares. Para a cinética de fotodegradação por meio dos espectros de absorção e emissão na presença de MEA, a mesma proporção MEA/Ery foi mantida em ordem de se obter condições similares. A injeção de gás nitrogênio na solução de FS foi feita afim de se examinar os efeitos da purga de oxigênio na fotoreação. Medidas em função do tempo de purga de oxigênio demonstraram ser suficiente 30 minutos para que o máximo possível de oxigênio fosse removido da solução.

4.2.2 Transmitância resolvida no tempo

Para as medidas do tempo de vida do estado tripleto da eritrosina foi utilizado um laser pulsado de Neodímio-Yag (Nd-Yag) (Brilliant B Quantel) como laser de excitação e um laser He-Ne (Uniphase, modelo 11335p) foi utilizado como laser de prova. Utilizamos um fotodiodo (Newport, modelo 818-BB-22) com filtro para monitorar a variação na transmitância do laser de prova. Para evitar efeitos de lente térmica, uma lente com distância focal de 30cm foi posta no caminho do feixe de prova, posicionando o forno resistivo (em 25° C) no foco da lente. As amostras eram depositadas em uma cubeta paralela de quartzo de 5mm de espessura. Uma segunda lente de distância focal de 7.5cm foi utilizada para focar todo o feixe de prova no fotodiodo. Dois espelhos dicróicos (Thorlabs, modelo DMLP567) foram utilizados para configurar os feixes colinearmente na amostra e separá-los depois da excitação da amostra. Depois da amostra o feixe de excitação foi direcionado para outro fotodiodo para acionar o ínicio da medida quando a amostra era exposta ao laser de excitação. O sinal foi pré-amplificado e adquirido por um osciloscópio (Tektronix, modelo DPO4102B). Neste aparato experimental, os raios dos feixes de prova e excitação eram de $\omega_{0p} = 143.5 \mu m$ e $\omega_e = 2.3 mm$, respectivamente. Uma representação do aparato experimental pode ser observada na figura 11.

4.2.3 Espectroscopia de absorção e emissão

A cinética de fotodegradação por meio do espectro de absorção foi feita utilizando um espectrofotômetro UV/VIS (PG Instruments Ltd, modelo T90+), enquanto que a cinética por meio do espectro de emissão foi feita utilizando um fluorímetro (Perkin Elmer, modelo LS45). A degradação das amostras foi feita empregando uma câmara com LEDs ($\lambda = 532nm$) com sistema de dissipação de calor. As amostras (postas em uma cubeta de quartzo com quatro faces polidas e 1cm de espessura) foram inseridas na câmara onde era uniformemente irradiadas a uma intensidade constante.



Figura 11 – Aparato experimental de transmitância resolvida no tempo.

4.2.4 Lente Térmica

No aparato experimental utilizado neste estudo, o laser de excitação foi um laser semicondutor (Coherent, modelo Verdi G) e o laser de prova foi um laser He-Ne (Thorlabs, modelo HNL225R). A distância focal da lente empregada para focar o laser de excitação na amostra foi de $f_1 = 30cm$. A distância focal da lente que o laser de prova atravessava era de $f_2 = 10cm$. O obturador mecânico utilizado foi um SRS, modelo SR470. O conjunto pinhole-filtro-fotodiodo empregado foi da Thorlabs, modelo DET100A/M, posicionado em $Z_2 = 500cm$ e o outro fotodiodo utilizado para acionar a medida foi da Thorlabs, modelo DET10A/M. Os sinais dos fotodiodos eram obtidos por meio de um osciloscópio digital (Tektronix, modelo DPO4102B). As amostras eram depositadas em uma cubeta de quartzo de espessura igual a 5mm. A cubeta era mantida a 25° C por meio de um forno resistivo. Uma representação do aparato experimental pode ser observada na figura 3. Os parâmetros geométricos para esta configuração foram: $\omega_{0e} = 47\mu m$, $\omega_{1p} = 426.5\mu m$ e V = 10.06.

4.3 Discussão dos resultados

Na figura 12 estão apresentados as cinéticas de fotoreação para a eritrosina em PBS quando irradiada por uma câmara de LED ($\lambda = 532nm$). Embora a degradação observada seja um resultado de diferentes mecanismos e possa ser afetada por diferentes parâmetros como a composição do solvente, temperatura, pH, concentração do FS e presença de supressores, os espectros de absorção e emissão apresentaram um tempo de decaimento similar.



Figura 12 – Cinética de fotodegradação da eritrosina exposta à câmara de LED ($\lambda = 532nm$). A linha contínua representa o espectro de absorção, enquanto que a linha tracejada representa o espectro de emissão.

Por intermédio de supressores, podemos investigar as relações entre o tempo de vida do estado tripleto, a produção de espécies reativas do oxigênio (como o oxigênio singlete) e a fotoreação da Ery. Por isso, foi realizada a fotodegradação da Ery na presença de MEA, um supressor do estado tripleto e purgando oxigênio da solução por intermédio da injeção de gás nitrogênio na solução. Em seus trabalhos, Song *et al* (1996) [59] e Widengren *et al* (2007) [60] demonstraram o efeito supressor da MEA com relação a degradação da fluoresceína e rodamina 6G, respectivamente.

As figuras 13 e 14 apresentam os resultados obtidos para o tempo de vida do estado tripleto da Ery na ausência e na presença dos supressores por intermédio da técnica de transmitância resolvida no tempo, os valores obtidos são apresentados na tabela 2 e foram obtidos do ajuste com uma função de decaimento exponencial:

$$y = y_0 + Ae^{-x/t} (4.1)$$

Mea	$\tau(\mu s)$	N	$\tau(\mu s)$
0 μM	2.06	0	2.06
2.5 mM	0.72	15 min	11.09
6.25 mM	0.12	30 min	12
18.75 mM	0.06		
25 mM	0.05		

Tabela 2 – Resultados obtidos para os tempos de vida do estado tripleto na ausência e na presença dos supressores.



Figura 13 – Transiente da absorção da banda em 632nm do estado tripleto obtido por meio da transmitância resolvida no tempo para a eritrosina ($25\mu M$) em função da concentração de MEA.



Figura 14 – Transiente da absorção da banda em 632nm do estado tripleto obtido por meio da transmitância resolvida no tempo para a eritrosina ($25\mu M$) em função do tempo de purga de oxigênio.

Podemos observar, assim, os efeitos da MEA e do O_2 no tempo de vida do estado tripleto. Na ausência de oxigênio, nota-se que o tempo de vida sofre um aumento significativo (cerca de $12\mu s$), que está relacionado com o efeito supressor do próprio oxigênio no estado tripleto da Ery. Na presença da MEA (aproximadamente 25mM), o tempo de vida é reduzido praticamente a 0, como já era esperado devido a seu efeito supressor. Também é esperado que a própria Ery desempenhe um efeito supressor no estado tripleto, como pode ser observado pelo aumento de concentração do FS de $25\mu M$ para $100\mu M$ (figura 15), que induz um decréscimo pequeno no tempo de vida (de $2.06\mu s$ para $1.75\mu s$), portanto, nessas concentrações, o efeito supressor no estado tripleto devido às interações C-C são menores do que as interações C-O.



Figura 15 - Tempo de vida do estado tripleto em função da concentração de Ery.

Não foram observadas mudanças significativas nos espectros de absorção e emissão na presença da MEA e na ausência de O_2 , apenas uma pequena variação na intensidade quando o oxigênio é purgado, mas que foi desprezada. Entretanto, embora o espectro de absorção não seja afetado significativamente pela presença da MEA ou pela purga de O_2 , a cinética de fotodegradação sofre mudanças significativas, como pode ser observado na figura 16.



Figura 16 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de absorção. a) 5μM de eritrosina;
b) 5μM de eritrosina e 500μM de MEA; c) 5μM de eritrosina e 30min de injeção de gás N na solução; d) intensidade no máximo de absorção normalizada em função do tempo.

Por intermédio do espectro de absorção, foram obtidas as cinéticas de degradação para a Ery (concentração de $5\mu M$) com e sem os supressores, utilizando uma câmara de LED ($\lambda = 532nm$). Notemos a importância dos mecanismos C-O no processo de fotobranqueamento, que é reiterada pelo resultado da purga de oxigênio que reduz a fotodegradação apesar de aumentar o tempo de vida do estado tripleto. Por outro lado, a presença da MEA em altas concentrações apresentou a formação rápida de uma estrutura molecular estável (em termos de fotodegradação) em vez de prevenir a fotodegradação como era esperado, tendo em vista os resultados de Song *et al* (1996) [59].

A figura 17 apresenta os resultados obtidos para a cinética de fotodegradação obtida por intermédio dos espectros de emissão. Não foram observados efeitos significativos na presença da MEA em concentrações 100 vezes maiores do que as de Ery, ou na ausência de oxigênio. Podemos observar um resultado significativamente diferente na análise da fotodegradação pela cinética de absorção e emissão. Apesar das medidas serem feitas em concentrações diferentes, isso claramente mostra que para uma descrição completa do efeito de fotodegradação, há uma necessidade de uma análise mais geral. Como a proporção de Ery/MEA foi mantida igual para os espectros de absorção e emissão, não era esperado que houvesse uma diferença entre os resultados obtidos para ambas as cinéticas.



Figura 17 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de emissão. a) $1\mu M$ de eritrosina; b) $1\mu M$ de eritrosina e $100\mu M$ de MEA; c) $1\mu M$ de eritrosina e 30min de injeção de gás N na solução; d) intensidade normalizada em $\lambda = 544nm$ em função do tempo.

Observemos o resultado obtido para a mistura Ery/MEA na proporção 1/100. Enquanto o tempo de vida do estado tripleto é reduzido drasticamente e a cinética de fotodegradação por meio dos espectros de emissão permanece inalterada, vemos, pela cinética de absorção, a formação rápida de uma estrutura molecular estável em vez de proteger o fotobranqueamento, como discutido anteriormente. Com o objetivo de esclarecer o resultado conflitante das cinéticas de absorção e emissão na presença da MEA, foram realizadas as cinéticas de fotodegradação para a Ery em diferentes concentrações de MEA. Os resultados são apresentados na figura 18. Para baixas concentrações de MEA (50 vezes maiores que as de Ery), apenas um pequeno efeito é observado. A aparição do complexo pode ser notada conforme a concentração de MEA aumenta e, por fim, para altas concentrações de MEA, podemos notar, por meio do espectro de emissão, a formação de um composto estável, e como veremos a seguir, não fluorescente na região do visível.



Figura 18 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de absorção. a) $5\mu M$ de eritrosina; b) $5\mu M$ de eritrosina e $50\mu M$ de MEA; c) $5\mu M$ de eritrosina e $250\mu M$ de MEA; d) $5\mu M$ de eritrosina e $500\mu M$ de MEA; e) $5\mu M$ de eritrosina e 10mM de MEA; f) Intensidade normalizada no máximo de absorção.

Na figura 19 podemos observar os resultados para a cinética de fotodegradação por meio do espectro de emissão. Mais uma vez, vemos que para baixa concentração de MEA ($100\mu M$) apenas um pequeno efeito na cinética de fotodegradação é observado, entretanto, para a alta concentração de MEA (2mM) podemos observar que rapidamente o corante torna-se não fluorescente.



Figura 19 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de emissão. a) 1μM de eritrosina;
b) 1μM de eritrosina e 50μM de MEA; c)1μM de eritrosina e 250μM de MEA; d) Intensidade normalizada no máximo de emissão.

A presença de efeitos na cinética de absorção e a ausência na cinética de emissão nas mesmas proporções de Ery/MEA pode estar relacionada com a formação de alguma micela acima de alguma concentração crítica de MEA. Isto é ressaltado pela rápida degradação observada na cinética de emissão para altas concentrações (1/2000). O processo de fotodegradação da eosina (Eos) e da fluoresceína (Flu) na presença de altas concentrações de MEA foram utilizados para aprofundar a compreensão dos efeitos observados para a Ery. Os resultados são apresentados nas figuras 20 e 21. A figura 20 mostra a proteção da MEA na fotodegradação da Flu, de acordo com os resultados de Song *et al* [59] (1996), em contraste com a rápida degradação da Ery e da Eos.



Figura 20 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de absorção. a) $5\mu M$ de eritrosina e 10mM de MEA; b) $5\mu M$ de eosina e 10mM de MEA; c) $5\mu M$ de fluoresceína e 10mM de MEA; d) Intensidade normalizada no máximo de absorção.



Figura 21 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de emissão. a) $1\mu M$ de eritrosina e 2mM de MEA; b) $1\mu M$ de eosina e 2mM de MEA; c) $1\mu M$ de fluoresceína e 2mM de MEA; d) Intensidade normalizada no máximo de emissão.

Nos resultados anteriores verificamos que pela cinética de absorção e emissão que os resultados não apresentam uma concordância completa, especialmente para a mistura Ery/MEA. Isto pode estar relacionado com as concentrações utilizadas nas duas técnicas. Com o objetivo de aprofundar estes estudos, vamos aplicar a técnica de LT para o estudo da fotodegradação em baixa concentração de Ery, no qual as técnicas comerciais não podem ser empregadas. A figura 22 mostra o efeito da MEA (na proporção de 1/1000x) e da purga de oxigênio nos transientes de LT. Em acordo com os resultados observados pela cinética de absorção (figura 16), a ausência do oxigênio induz um decréscimo na fotodegradação, como pode ser observado pela variação da intensidade após o transiente térmico (t < 0.1s). Já para o efeito da MEA, devemos ser cuidadosos ao analisar os resultados, porque embora pareça haver uma supressão da fotodegradação no tempo característico do transiente, os resultados obtidos da cinética de absorção sugerem a formação de uma estrutura molecular estável. Pode ser que a variação na absorção ocorra quase simultaneamente com o processo de difusão térmica e assim o efeito acabe sendo mascarado no sinal de lente térmica. Também foram realizadas medidas nas concentrações de 100nM e 400nM para a Ery com o intuito de evidenciar os efeitos dos mecanismos C-C com a concentração e como pode ser observado, o resultado mostra um aumento na fotodegradação que pode ser notado devido à variação na amplitude após o efeito térmico inicial. Vale ressaltar que embora os resultados dos ajustes pudessem fornecer informações condizentes com a eficiência de fluorescência que pode estar relacionada com a cinética de emissão, devido à complexidade dos efeitos observados e como o objetivo de nossa análise foi uma observação qualitativa dos efeitos dos supressores na fotodegradação da Ery, os dados experimentais não foram ajustados.



Figura 22 – Transiente de lente térmica para a eritrosina, com e sem MEA, e na ausência de oxigênio.



Figura 23 – Transiente de lente térmica para a eritrosina em diferentes concentrações.

4.3.1 Azida de sódio

A azida de sódio (NaN_3) é um supressor do oxigênio singlete conhecido na literatura, assim, buscando aprofundar a caracterização feita da contribuição de cada mecanismo e, em particular, o papel do oxigênio singlete na cinética de fotodegradação, ela foi empregada em uma concentração próxima a concentração de saturação nas mesmas técnicas apresentadas anteriormente: transmitância resolvida no tempo, cinética de degradação por absorção e emissão e LT. O supressor foi obtido da empresa Química Moderna ($NaN_3 > 99\%$). Os resultados serão discutidos e apresentados a seguir.

A figura 24 apresenta o resultado obtido para o tempo de vida do estado tripleto na presença da NaN_3 (Os valores obtidos estão apresentados na tabela 3). Como pode ser observado na tabela 3, a NaN_3 apresenta, além de sua supressão do oxigênio singlete, uma interação direta com o estado tripleto da Ery, uma vez que a presença do supressor afeta o tempo de vida na presença e na ausência de oxigênio.



Figura 24 – Transiente da absorção da banda em 632nm do estado tripleto obtido por meio da transmitância resolvida no tempo para a eritrosina ($25\mu M$) em função da concentração de NaN_3 .

NaN_3	$\tau(\mu s)$	$NaN_3 + N$	$\tau(\mu s)$
0 µM)	2.06	0	12.05
575 mM	1.54	288 mM	3.97
1150 <i>mM</i>	1.29	575 mM	3.29
2300 mM	1.03	2300 mM	0.85

Tabela 3 – Resultados obtidos para os tempos de vida do estado tripleto na presença da *NaN*₃ e na presença e ausência de oxigênio na solução.

No caso da NaN_3 novamente não houve uma mudança significativa no espectro de absorção da Ery, entretanto, como pode ser observado na figura 25, há uma variação de intensidade no espectro de emissão da Ery na presença da NaN_3 , independente da solução ter sido ou não saturada de N, o que indica que o supressor interage com o estado singleto excitado (S_1) da Ery.



Figura 25 – Espectros de emissão para a Ery na presença da NaN_3 , na presença e ausência de oxigênio.

As figuras 26 e 27 apresentam os resultados obtidos para a cinética de fotodegradação obtida por meio dos espectros de absorção e emissão. Embora a presença da NaN_3 não afete substancialmente o espectro de absorção da Ery, a cinética de fotodegradação é afetada. Como pode ser observado na figura 26, a presença de NaN_3 induz uma redução na taxa de fotodegradação. Isso é facilmente entendido devido a supressão do oxigênio singlete e também do estado tripleto (verificado no aumento do tempo de vida deste). Estas supressões diminuem tanto os processos de degradação C-C e C-O . E ainda, na ausência de oxigênio, essa proteção é ainda maior devido ao decréscimo nos mecanismos C-O. Para a cinética de emissão, também notamos resultados bem diferentes, como pode ser observado na figura 27. Além de uma mudança significativa na cinética, também pode ser observado um desvio do pico de máxima intensidade para comprimentos de onda menores. Vale ressaltar, que os resultados obtidos pela cinética de absorção e emissão foram novamente diferentes, o que reitera a importância da utilização de diferentes técnicas para uma caracterização completa do efeito de fotodegradação da Ery. Desta forma, vamos a seguir fazer uma análise para baixas concentrações utilizando a técnica de LT.



Figura 26 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de absorção. a) $5\mu M$ de eritrosina; b) $5\mu M$ de eritrosina e 2300mM de NaN_3 ; c) $5\mu M$ de eritrosina e 2300mM de NaN_3 + N; d) Intensidade normalizada no máximo de absorção.



Figura 27 – Cinética de fotodegradação obtida por meio do espectro de emissão. a) $1\mu M$ de eritrosina; b) $1\mu M$ de eritrosina e 2300mM de NaN_3 ; c) $1\mu M$ de eritrosina e 2300mM de NaN_3 + N; d) Intensidade normalizada no máximo de absorção.

A figura 28 apresenta os resultados obtidos para os transientes de lente térmica da Ery na presença da NaN_3 . Como pode ser observado na figura 28, a presença da NaN_3 resulta em um aumento na amplitude do sinal de LT e um decréscimo na taxa de fotoreação. Este aumento de amplitude reforça o argumento apresentado anteriormente de que a NaN_3 interage com o estado S_1 , já que este aumento na amplitude pode estar relacionado com a mudança na eficiência quântica de fluorescência da Ery. Já o decréscimo observado na taxa de fotoreação também está de acordo com os resultados obtidos para a cinética de absorção, na qual foi observada uma diminuição na fotodegradação.



Figura 28 – Transientes de lente térmica para a Ery na presença da NaN₃.

4.4 Conclusão

O objetivo dos resultados apresentados neste capítulo era o de apresentar uma compreensão detalhada do processo de degradação em FS aplicados a TFD. Visto que a degradação é resultado de vários processos que podem ocorrer no FS, os quais envolvem interações C-C, C-O e C-S, estes processos dependem da interação física de moléculas envolvidas. Desta forma, um estudo em função da concentração é necessário. No entanto, as técnicas disponíveis somente são sensíveis a intervalos de concentrações específicas. Neste sentido, para uma compreensão mais detalhada, foram aplicadas técnicas de absorção, emissão e LT, as quais conseguem varrer o intervalo de concentração de interesse. Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas não mostraram o acordo completo. Por exemplo, os resultados obtidos para o espectro de emissão para a eritrosina na presença da MEA na razão 1/100 não mostram resultados significativos no efeito de fotodegradação, entretanto, um resultado diferente é obtido pela cinética de absorção, na qual há uma rápida degradação, seguido da formação de um composto estável. Neste mesmo sentido, como a escala temporal da lente térmica e a variação da absorção são próximas, para altas concentrações de MEA, elas não permitem a discriminação dos dois efeitos e a fotoreação é mascarada no sinal de lente térmica. Como observado, o oxigênio molecular possui um papel especial no processo de fotodegradação, o que impossibilitou que uma relação direta entre o estado tripleto da Ery e a sua fotodegradação fosse obtida. Também foram observados comportamentos diferentes para corantes similares sobre as mesmas condições. Para altas concentrações da MEA, foi observado uma proteção para a fotodegradação da Flu, entretanto, para a Ery e para a Eos houve uma degradação rápida e o surgimento de um composto estável e não-fluorescente na região do visível.

Por conseguinte, para o caso de baixas concentrações, a técnica de LT mostrou-se um método eficaz. Informações a respeito da variação de absorção e emissão podem ser obtidas desde que seus tempos característicos sejam distintos do tempo característico de LT em ordem de discriminá-los no transiente.

Como consideração final, vale ressaltar que os resultados demonstraram que para uma análise completa do efeito de fotodegradação, um estudo cuidadoso empregando diferentes técnicas ópticas se faz necessário. Por fim, uma direta correlação entre o tempo de vida do estado tripleto e a fotodegradação não é possível já que os mecanismos C-C e C-O possuem contribuições diferentes a depender da concentração do corante.

5 O efeito da variação de absorção do estado tripleto da eritrosina e os efeitos de ondas de pressão no transiente de lente térmica

5.1 Introdução

Como discutido no capítulo anterior, a cinética de fotodegradação de fotosensibilizadores está diretamente atrelada a diversos mecanismos, cuja predominância no processo está relacionada a diversos fatores. Assim, para a caracterização completa do processo de fotodegradação, é necessário utilizar diversas técnicas. Neste sentido, a técnica de lente térmica com excitação pulsada apresenta-se como mais uma ferramente a ser empregada na caracterização de FS.

A técnica de LT com excitação pulsada já é amplamente empregada por diversos grupos de pesquisa em diferentes análises [61, 62, 63, 64]. No caso particular de FS, nota-se que além do efeito característico de LT, devido ao decréscimo de intensidade do laser de prova que é resultado do efeito divergente da LT, há um efeito sobreposto causado pela atenuação de intensidade do laser de prova pela absorção do estado tripleto do FS [65]. Este efeito está diretamente relacionado com o fato do estado tripleto possuir um espectro de absorção se estendendo de 400nm a 700nm, o que corresponde com o comprimento de onda do laser de prova na técnica de LT (632.8nm) [66].

Em seu trabalho, Chartier *et al* (1990) [65] utilizaram o efeito sobreposto observado no transiente de LT da Ery para determinar o tempo de vida do estado tripleto do corante, cuja observação do efeito estava relacionada à alta eficiência quântica do estado tripleto da Ery e a alta absorção da banda em 632nm do estado tripleto. De maneira análoga, Brennetot *et al* (1999) em seu trabalho [66], também determinaram a taxa de decaimento do estado tripleto utilizando a técnica de LT pulsada. Por outro lado, Fuke *et al* (1983) e Rossbroich *et al* (1985) [67, 68] atribuiram esse efeito ao calor gerado no processo de relaxação do oxigênio em vez da absorção do feixe de prova do estado tripleto. Neste sentido, com o objetivo de esclarecer essa divergência, efetuamos medidas de LT com excitação pulsada com uma resolução temporal de nanosegundos. No entanto, quando analisamos o transiente de LT com excitação pulsada, além dos efeitos de relaxação térmica, os quais ocorrem em escala de segundos e efeitos citados anteriormente, os quais ocorrem em escala de microsegundos, observamos um efeito oscilatório.

Neste capítulo vamos investigar os efeitos sobrepostos observados no transiente de LT com o objetivo de esclarecer a controvérsia em relação aos efeitos que ocorrem na escala de microsegundos e para descrever os efeitos oscilatórios na escala de nanosegundos. Para isto, empregamos a Ery, que como já discutido, possui uma alta eficiência quântica de produção do estado tripleto, além de que, o estado tripleto da Ery possui uma alta absorção do feixe de prova. As medidas também foram feitas em condições de saturação e ausência de oxigênio na solução para uma melhor caracterização do efeito. Com o objetivo de separar os efeitos nas escalas de micro e nano segundos, analisaremos o sinal de LT com excitação pulsada na água, visto que neste caso os possíveis efeitos de absorção de estado tripleto ou oxigênio singlete não estão presentes.

5.2 Metodologia

5.2.1 Reagentes

Novamente, foi utilizada a Eritrosina B ($C_{20}H_6I_4Na_2O_5 \approx 95\%$) obtida na Sigma Aldrich. As amostras foram preparadas antes de cada medida e mais uma vez foram diluídas em solução tampão fosfatosalino para o controle do Ph em torno de 7.4. Para a técnica de lente térmica com excitação pulsada e para a variação de transmitância, a concentração de Ery empregada foi de $25\mu M$, já para a técnica de lente térmica com excitação contínua, a concentração adotada foi de 400nM. Afim de observar os efeitos do oxigênio singlete e do estado tripleto da Ery, foram injetados nas amostras gás nitrogênio ou oxigênio, para promover uma purga de oxigênio ou uma saturação de oxigênio na solução. O tempo de purga ou saturação foi mais uma vez de 30 min para maximizar os efeitos desejados.

5.2.2 Variação de transmitância

A montagem utilizada para as medidas do tempo de vida do estado tripleto da Ery apresentadas neste capítulo é similar a montagem utilizada para as medidas apresentadas no capítulo anterior, em que foi empregado um laser pulsado de Neodímio-Yag (Nd-Yag) (Brilliant B Quantel) como laser de excitação e um laser He-Ne (Uniphase, modelo 11335p) como laser de prova. Um conjunto fotodiodo-filtro (Newport, modelo 818-BB-22) foi utilizado para o monitoramento da variação de transmitância do laser de prova. Novamente os efeitos de LT foram evitados utilizando duas lentes ($f_1 = 30cm$ e $f_2 = 7.5cm$), o forno resistivo (em 25° C) era colocado no foco da primeira lente e a segunda era utilizada para focar todo o feixe dentro do fotodiodo. Mais uma vez foi empregado uma cubeta de quartzo com espessura de 5mm. Outra vez a colinearidade e separação do feixe foi feita por meio de dois espelhos dicróicos (Thorlabs, modelo DMLP567). Depois da amostra o feixe de excitação era direcionado para outro fotodiodo para acionar o ínicio da medida quando a amostra era exposta ao laser de excitação. Por fim, o sinal foi pré-amplificado e adquirido por um osciloscópio (Tektronix, modelo DPO4102B). A representação do aparato experimental é apresentada na figura 11.

5.2.3 Lente térmica com excitação contínua

Assim como descrito anteriormente, a montagem de lente térmica contínua também foi similar à montagem dos capítulos anteriores. O laser de excitação utilizado foi o laser semicondutor (Coherent, modelo Verdi 2G) e o laser de prova foi um laser He-Ne (Thorlabs, modelo HNL225R). A distância focal da lente utilizada para focar o laser de excitação na amostra era de $f_1 = 25cm$. Mais uma vez a irradiação do feixe de excitação na amostra era controlada por meio de um obturador mecânico (SRS, modelo SR470). O laser de prova atravessava uma lente de distância focal de $f_2 = 15cm$. Um conjunto pinhole-filtro-fotodiodo (Thorlabs, modelo DET100A/M) foi utilizado para monitorar a intensidade da parte central do feixe de prova, posicionado em $Z_2 = 490cm$. Um outro fotodiodo (Thorlabs, modelo DET10A/M) foi utilizado para acionar a medida da intensidade do feixe de prova quando a amostra era irradiada pelo laser de excitação. O sinal de lente térmica era adquirido por meio de um osciloscópio (Tektronix, modelo DPO4102B). Por fim, as amostras eram colocadas novamente em uma cubeta de quartzo de espessura igual a 5mm e mantidas em 25° C por intermédio de um forno resistivo. Uma representação do aparato experimental é apresentada na figura 3. Os parâmetros geométricos para esta configuração foram: $\omega_{0e} = 59\mu m$, $\omega_{1p} = 522.5\mu m$ e V = 5.54.

5.2.4 Lente térmica com excitação pulsada

Para as medidas de lente térmica com excitação pulsada, um laser pulsado de Neodímio-Yag (Nd-Yag) (Brilliant B Quantel) foi utilizado como laser de excitação e um laser He-Ne (Uniphase, modelo 11335p) foi utilizado como laser de prova. O laser de excitação foi focado na amostra por intermédio de uma lente com distância focal de $f_1 = 40cm$. Já o laser de prova atravessava uma lente com distância focal de $f_2 = 30cm$. Um conjunto fotodiodo-filtro (Newport, modelo 818-BB-22) foi utilizado para monitorar a intensidade da parte central do feixe de prova e foi colocado a uma distância igual a $Z_2 = 541.5cm$. Outro fotodiodo foi utilizado para acionar o início da medida quando a amostra era exposta ao laser de excitação pulsado. As amostras eram depositadas em uma cubeta de quartzo com espessura de 5mm e colocadas dentro de um forno resistivo para manter a temperatura em 25° C. Por intermédio de um osciloscópio (Tektronix, modelo DPO4102B) o sinal de lente térmica era adquirido.

5.3 Discussão dos resultados

A figura 29 apresenta o transiente de lente térmica com excitação pulsada observado em diferentes escalas temporais. Primeiramente, o transiente é caracterizado pela rápida formação da LT devido a curta duração do pulso absorvido, seguido por uma relaxação térmica característica da amostra que pode ser observada na escala de segundos. Entretanto, podemos notar pelas regiões amplificadas, que o transiente possui um efeito adicional ao processo térmico. Por conseguinte, se observarmos o transiente na escala temporal de microsegundos podemos observar um efeito que como dito anteriormente pode estar relacionado à atenuação de intensidade do laser de prova devido à absorção do estado tripleto do FS na banda de 632nm. Por fim, podemos observar também o transiente na escala temporal de nanosegundos, na qual observamos um efeito oscilatório. Devido à escala do fenômeno, o efeito está relacionado a pressão induzida na região excitada e que permanece presente até o momento em que o líquido expande e relaxa, como veremos a seguir.



Figura 29 – Transiente de lente térmica com excitação pulsada para a eritrosina ($25\mu M$).

5.3.1 Ondas de pressão

Como dito anteriormente, na escala de nanosegundos no transiente de lente térmica pulsada ocorre um efeito que está relacionado com as ondas de pressão geradas no FS. Entretanto, é necessário saber se este efeito é particular de FS ou se ocorre em líquidos de uma forma geral. Para isto, analisamos o sinal de lente térmica pulsada para a água com o objetivo de esclarecer e descrever o efeito observado em escala de nanosegundos nos transientes de LT.

A figura 30 apresenta o sinal de lente térmica pulsada para a água, no qual podemos observar a rápida formação do efeito de LT seguida pelo processo de relaxação térmica. Nesta escala de tempo, devido à resolução dos dados adquiridos, não fica evidenciado nenhuma anomalia. O ajuste deste transiente com os modelos usuais de LT nos fornecem parâmetros térmicos característicos da amostra, como a difusividade térmica e o parâmetro θ_{th} relacionado com a amplitude do sinal. No entanto, se aumentarmos a resolução, monitorando o transiente em uma escala de tempo da ordem de microsegundos o efeito oscilatório descrito fica evidenciado. Notemos que na figura 30 não há o efeito característico observado no caso da Ery na escala de microsegundos, no entanto, o efeito oscilatório para tempos menores que $1\mu_s$ aparece explicitamente, mostrando que esse efeito é mais geral e não somente característico do FS. A figura 30 mostra uma ampliação do sinal evidenciando explicitamente a escala temporal do efeito .



Figura 30 – Transiente de lente térmica com excitação pulsada para a água na escala temporal de nanosegundos.

A seguir confirmaremos a origem do efeito oscilatório observado na escala de nanosegundos mostrando que transientes gerados numericamente, assumindo o modelo que inclui a variação local na pressão induzida pela absorção da energia do feixe laser, são capazes de fazer uma descrição completa do efeito.

Como descrito no capítulo 2, o efeito térmico relacionado ao transiente de LT é descrito pela equação de difusão de calor:

$$\frac{\partial}{\partial t}T(r,t) - D_{th}\nabla_r^2 T(r,t) = \theta_{th}E_0 e^{-2r^2/\omega_{0e}^2}f(t),$$
(5.1)

no qual E_0 é a energia do pulso do laser e θ_{th} é dado por:

$$\theta_{th} = \frac{2A_e\phi}{\rho c_p \pi \omega_{0e}^2},\tag{5.2}$$

no qual A_e , neste caso, é o coeficiente de absorção óptico.

No caso das ondas de pressão induzidas nos líquidos, a equação que descreve o efeito é dada por:

$$\frac{1}{c_0^2}\frac{\partial^2 p}{\partial t^2} - \nabla^2 p = \frac{\beta}{c_p}\frac{\partial H}{\partial t},\tag{5.3}$$

com β sendo o coeficiente de expansão térmica, c_p o calor específico a pressão constante, c_0 a velocidade do som no líquido.

Para o modelo de baixa absorção (LAM) e excitação pulsada, temos que:

$$H(r,t) = \frac{2E_0 A_e \phi}{\pi \omega^2} exp\left(\frac{-2r^2}{\omega^2}\right) exp\left(-\left(\frac{t-\delta}{\tau}\right)^2\right) \frac{2}{\tau \sqrt{\pi} \left(1 + erf(\delta/\tau)\right)},\tag{5.4}$$

com τ sendo a largura do pulso do laser e δ o instante de tempo em que ocorre a máxima intensidade do laser.

Portanto, temos que:

$$\frac{1}{c_0^2} \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} - \nabla^2 p = \frac{\beta}{c_p} \left(-\frac{2(t-\delta)}{\tau^2} \right) H$$
(5.5)

Como o gradiente térmico e a pressão induzida afetam o caminho óptico do laser de prova, a diferença de fase induzida deve ser reescrita da seguinte forma:

$$\Phi(r,t) = \frac{2\pi}{\lambda_p} \int_0^L \left[\frac{dn}{dT} T(r,t) + \frac{dn}{dp} p(r,t) \right] dz,$$
(5.6)

na qual T(r,t) e p(r,t) são o gradiente térmico e a pressão induzida pela incidência do laser.

Utilizando o modelo proposto foram realizadas simulações computacionais por intermédio do software COMSOL multiphysics, com o propósito de verificar a validade das equações apresentadas anteriormente na descrição do efeito presente no sinal de LT pulsada. A tabela 4 apresenta os parâmetros utilizados nas simulações, que são os valores obtidos na literatura para a água [2, 3, 4].

$E(\mu J)$	τ (ns)	β (1/K)	dn/dp (1/Pa)	γ	$c_0 (m/s)$	dn/dT (1/K)	A_{e} (1/m)	δ (ns)	$\omega_0~(\mu m)$
225	44	207×10^{-6}	1.5×10^{-10}	0	1481	-0.96×10^{-4}	0.125	120	150
350	35	207×10^{-6}	1.5×10^{-10}	0	1481	-0.96×10^{-4}	0.125	110	150
550	26	207×10^{-6}	1.5×10^{-10}	0	1481	-0.96×10^{-4}	0.125	95	150

Tabela 4 – Parâmetros utilizados na simulação computacional para o transiente de lente térmica pulsada para a água [2, 3, 4].

A figura 31 apresenta a comparação entre os dados experimentais e os resultados das simulações utilizando o modelo proposto. Como o laser pulsado tem uma flutuação muito grande de energia, o valor da energia utilizado na simulação varia em comparação com o valor experimental. O valor utilizado na simulação foi escolhido de forma que o transiente estacionário (para os efeitos de pressão) fossem atingidos. No caso deste efeito oscilátorio os parâmetros que estão relacionados são o coeficiente de expansão térmica, o coeficiente piezo-óptico (dn/dp) e a velocidade do som no flúido. Os dois primeiros estão relacionados com a amplitude de oscilação e o último com a distância temporal entre os picos. Vale ressaltar que a técnica de LT pulsada nesta escala de tempo pode ser usada para a determinação desses parâmetros para fluídos fracamente absorvedores em geral.



Figura 31 – Comparação entre os dados experimentais e as simulações feitas por meio do COMSOL multiphysics.

Como pode ser observado na figura 31, os resultados das simulações computacionais mostraram ser condizentes com os dados experimentais obtidos, o que nos leva a concluir que o modelo proposto descreve de forma satisfatória o efeito de pressão induzido pelo laser de excitação no transiente de lente térmica pulsada.

Na figura 32 podemos observar as contribuições térmicas e de pressão para o transiente de lente térmica. Durante o pulso do laser o gradiente térmico é formado e antes da relaxação térmica a onda acústica torna-se dominante. Apenas na escala de microsegundos que a relaxação térmica começa a ser dominante.



Figura 32 - Contribuições térmica e de pressão para o transiente de lente térmica.

Por meio das simulações, também podemos observar como alguns dos parâmetros influenciam o transiente de LT. Na figura 33 podemos observar como os parâmetros β , dn/dp e c_s influenciam o transiente. Assim vemos que c_s define a distância temporal entre os picos, equivalente ao t_c , e β e dn/dp afetam a amplitude relativa dos picos, como se fosse o θ_p .



Figura 33 – Contribuições dos parâmetros β , dn/dp e c_s para o transiente de lente térmica.

5.3.2 Efeito da variação da absorção do estado tripleto da eritrosina

Após a verificação e compreensão dos efeitos característicos do sinal de LT na escala de nanosegundos, vamos averiguar a relação entre o efeito característico da escala de microsegundos nos transientes de LT para a Ery. Como na literatura esse efeito é atribuído a duas possíveis causas; absorção de estado tripleto e geração de calor no processo de relaxação do oxigênio, vamos comparar as medidas de transmitância resolvida no tempo com o comportamento do transiente de LT. Para confirmar ou descartar o papel do oxigênio, faremos medidas em soluções na ausência de oxigênio e na saturação de oxigênio como descrito no ínicio do capítulo.

A figura 34 apresenta o resultado obtido para o transiente da absorção da banda em 632nm do estado tripleto da Ery, por intermédio da técnica de variação de transmitância e para o efeito característico do sinal de lente térmica pulsada. As figuras 35 e 36 apresentam os resultados obtidos na ausência e saturação de O_2 , respectivamente. A tabela 5 apresenta os resultados obtidos dos ajustes teóricos dos dados experimentais da Ery na presença, ausência e saturação de O_2 para as técnicas de variação de transmitância e lente térmica pulsada. Vale ressaltar que foi selecionado somente a região no transiente na qual o efeito aparece. O ajuste foi feito assumindo um decaimento exponencial 4.1.



Figura 34 – Transiente de lente térmica com excitação pulsada e transiente da absorção da banda em 632nm do estado tripleto obtido por meio da variação de transmitância para a eritrosina $(25\mu M)$.


Figura 35 – Transiente de lente térmica com excitação pulsada e transiente da absorção da banda em 632nm do estado tripleto obtido por meio da variação de transmitância para a eritrosina $(25\mu M)$ e 30 min. de purga de oxigênio.



Figura 36 – Transiente de lente térmica com excitação pulsada e transiente da absorção da banda em 632nm do estado tripleto obtido por meio da variação de transmitância para a eritrosina $(25\mu M)$ e 30 min. de injeção de oxigênio.

Amostra	LT (µs)	TR (μs)
Ery ($25\mu M$)	1.60	1.53
Ery ($25\mu M$) + N	8.38	8.58
Ery ($25\mu M$) + O_2	0.72	0.81

Tabela 5 – Resultados obtidos para os tempos de vida do estado tripleto por meio da técnica de lente térmica com excitação pulsada e por meio do transiente da absorção da banda em 632nm do estado tripleto obtido por meio da variação de transmitância.

Primeiramente, vale ressaltar que como pode ser observado na figura 35, o efeito característico no sinal de lente térmica pulsada na ausência de oxigênio não foi extinto e de maneira análoga, como pode ser observado na figura 36, na saturação de oxigênio da solução, o efeito também não foi amplificado. Estes resultados indicam inicialmente que o efeito observado não está relacionado diretamente ao efeito de geração de calor do oxigênio singlete.

Se observarmos os tempos obtidos do ajuste teórico na tabela 5, veremos que os tempos obtidos para o tempo característico do efeito de LT pulsada e o tempo do estado tripleto da Ery nas condições descritas anteriormente são muito próximos. Portanto, podemos concluir que o efeito está relacionado com o tempo de vida do estado tripleto do fotosensibilizador, uma vez que eles são condizentes e obtidos por duas técnicas experimentais distintas.

Como pode ser observado, a absorção da banda em 632nm do estado tripleto da Ery desempenha um papel importante no transiente de lente térmica pulsada, entretanto, não se sabe se esta absorção influencia o transiente de lente térmica contínua. Portanto, afim de averiguar se há uma influência no transiente de LT contínua, foram realizadas medidas de LT contínua e monitorado de forma simultânea a variação na transmitância do feixe de prova. Os resultados são apresentados na figura 37.



Figura 37 – Transiente de lente térmica com excitação contínua e transiente da absorção da banda em 632nm do estado tripleto obtido por meio de um monitoramento simultâneo para a eritrosina (400nM).

Como pode ser observado na figura 37, durante o tempo característico do transiente de LT não há uma influência significativa na variação de transmitância do feixe de prova devido à absorção da banda em 632nm do estado tripleto da Ery, ou seja, embora haja uma influência desta absorção no transiente de lente térmica pulsada, para o tempo característico da lente térmica contínua, a absorção do estado tripleto não influencia o transiente. Notemos que no caso de excitação contínua, visto que a densidade de energia não é tão grande, geralmente a proporção de moléculas no estado excitado é pequena em comparação com o total de moléculas. No caso pulsado, a densidade de energia entregue é muito grande, fazendo com que localmente, praticamente, todas as partículas estejam nos estados de maior energia durante o pulso.

5.4 Conclusão

A técnica de LT pulsada se mostrou satisfatória na caracterização de FS, apresentando efeitos particulares em diferentes escalas temporais. De forma geral, para líquidos o efeito de pressão induzido que pode ser observado em escalas temporais de nanosegundos foi descrito de forma teórica e o modelo proposto apresentou concordância com os dados experimentais da água nas simulações computacionais realizadas por intermédio do software COMSOL multiphysics. Isso abre a possibilidade de utilização da técnica para determinação dos parâmetros físicos relacionados ao efeito para líquidos em geral.

Os resultados obtidos pela técnica de lente térmica com excitação pulsada e pelo uso da transmitância dependente do tempo para amostras de Ery na presença, ausência e saturação de oxigênio, nos permitiu, além de esclarecer a ambiguidade apresentada na literatura, também adicionar a possibilidade de usar a técnica de LT na medida de tempo de vida do estado tripleto de FS.

Tendo em vista que a absorção da banda em 632nm do estado tripleto afeta o transiente de lente térmica com excitação pulsada, também foi estudada a influência desta absorção no transiente de lente térmica com excitação contínua. Os resultados apresentados mostram que para o tempo característico de LT com excitação contínua, o efeito da absorção da banda em 632nm do estado tripleto não afeta o transiente de LT. Visto que neste caso a fração de ocupação do estado tripleto é pequena, não afetando significativamente a amplitude do transiente de LT.

6 Considerações finais

Este trabalho apresentou os resultados que concernem a caracterização de FS empregados na terapia fotodinâmica. Ressaltamos que a caracterização de tais compostos se faz necessária para uma melhor aplicabilidade da técnica e o conhecimento proveniente de tal estudo aprimora testes clínicos de uma forma geral.

O capítulo 3 abordou a fotoconversão da protohipericina em hipericina, um FS que possui alta absorção óptica, baixa toxicidade e ainda possui propriedades antivirais, antitumorais e seletividade a tecidos. Os estudos foram realizados por meio da técnica de lente térmica e os resultados apresentaram uma relação entre a taxa de fotoreação com a concentração de protohipericina no intervalo de 100nM a 400nM. Este resultado indica que o processo de fotoconversão pode conter espécies intermediárias. E ainda, a aplicabilidade da técnica de lente térmica neste caso ressalta o potencial da técnica em estudos de FS em baixa concentração, na qual técnicas fototérmicas geralmente não podem ser empregadas. Por fim, o parâmetro θ_{th} obtido por meio dos ajustes teóricos pode nos fornecer informações sobre a eficiência de fotoconversão e a eficiência quântica de fluorescência.

No capítulo 4 foi abordado o estudo do processo de fotodegradação de fotosensibilizadores aplicados a TFD. Para este estudo foram empregadas diferentes técnicas que são efetivas em diferentes intervalos de concentração do FS. Os resultados obtidos mostraram que a descrição dos diferentes mecanismos nos processos de fotodegradação não podem ser obtidos por uma técnica única, visto que em geral esses processos são altamente dependentes da concentração do FS e de outras substâncias presentes na solução. A cinética de absorção na presença do supressor do estado tripleto, MEA, apresentou uma rápida degradação inicial seguido da formação de um composto estável, enquanto que a cinética de emissão não mostrou resultados significativos no efeito de fotodegradação. Comportamentos diferentes também foram observados para corantes distintos. Para a fluoresceína, a presença da MEA ocasionou uma proteção da fotodegradação, enquanto que para a eosina e para a eritrosina, a presença do supressor gerou uma rápida fotodegradação e o surgimento de um composto estável não-fluorescente. Portanto, os resultados demonstraram que para uma análise completa do efeito de fotodegradação, um estudo cuidadoso empregando diferentes técnicas fototérmicas é necessário e uma relação direta entre o tempo de vida do estado tripleto e a fotodegradação não é possível, já que os mecanismos C-C e C-O possuem contribuições diferentes a depender da concentração do corante e oxigênio na solução.

Por último, foi abordado os resultados para a técnica de lente térmica pulsada, os quais demonstraram que diferentes efeitos estão contidos no transiente e a observação deles está restrita a diferentes escalas temporais. O efeito de pressão induzido (na escala de nanosegundos) pelo laser de excitação em líquidos de forma geral foi apresentado e modelado e as simulações realizadas apresentaram concordância com o modelo proposto.

O transiente de lente térmica pulsada apresentou para FS um efeito característico (na escala de microsegundos) que buscamos relacionar ao processo de relaxação do oxigênio singlete e o tempo de vida do estado tripleto do FS. Uma comparação direta entre os resultados da técnica de lente térmica foi feita com os dados obtidos para o tempo de vida do estado tripleto da eritrosina por intermédio da técnica de variação de transmitância, na presença, ausência e saturação de oxigênio na solução. Os resultados obtidos mostraram que há uma concordância entre o tempo característico do efeito presente no sinal de lente térmica e o tempo de vida do estado tripleto do corante, e ainda, não há, aparen-

temente, indícios de relação com o processo de geração do oxigênio singlete. Por fim, os resultados apresentaram que para o tempo característico da LT contínua, o efeito da absorção da banda em 632nm do estado tripleto não afeta o transiente.

Estes resultados abrem a possibilidade de uma ampliação do uso da técnica de LT na análise de FS e fluídos em geral, a qual pode, em diferentes escalas de tempo, nos fornece informações de diferentes propriedades físicas como o coeficiente de expansão térmica, o coeficiente piezo-óptico e termo-óptico, a velocidade do som no fluído, a difusividade térmica, a eficiência quântica de fluorescência, a taxa de fotodegradação e o tempo de vida do estado tripleto. Apesar de neste trabalho termos feito uma análise mais qualitativa desses processos, uma análise quantitativa é possível pela incorporação desses efeitos na expressão do sinal de lente térmica. Esse é um desafio possível, mas ainda em aberto, e dão uma perspectiva de trabalhos futuros.

Referências

- Ancly Santos, Daria Almeida, Leticia Terra, Mauricio Baptista, and Leticia Labriola. Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2019, 03 2019.
- [2] Naoya Uchida. Elastooptic coefficient of liquids determined by ultrasonic light diffraction method. *Japanese Journal of Applied Physics*, 7(10):1259–1266, oct 1968.
- [3] Masahiko Daimon and Akira Masumura. Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region. *Appl. Opt.*, 46(18):3811–3820, Jun 2007.
- [4] George M. Hale and Marvin R. Querry. Optical constants of water in the 200-nm to 200-μm wavelength region. *Appl. Opt.*, 12(3):555–563, Mar 1973.
- [5] Dennis E J G J Dolmans, Dai Fukumura, and Rakesh K Jain. Jain rk photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3:380–7, 06 2003.
- [6] Yvette Niamien Konan, Robert Gurny, and Eric Allémann. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(2):89 – 106, 2002.
- [7] Jim M Fernandez, Mehmet D Bilgin, and Leonard I Grossweiner. Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 37(1):131 – 140, 1997.
- [8] Maria C DeRosa and Robert J Crutchley. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233-234:351 – 371, 2002.
- [9] Ana Castano, Tatiana N. Demidova, and Michael Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 1:279–293, 12 2004.
- [10] Ana Castano, Tatiana N. Demidova, and Michael Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2:1–23, 03 2005.
- [11] Ana Castano, Tatiana N. Demidova, and Michael Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2:91–106, 06 2005.
- [12] Ian J. Macdonald and Thomas J. Dougherty. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5(2):105–129, 2001.
- [13] Lílian Somenci Peloi, Carlos Eduardo Guerino Biondo, Elza Kimura, Mario José Politi, Maria Valdrinez Campana Lonardoni, Sandra Mara Alessi Aristides, Regina Coeli Cunha Dorea, Noboru Hioka, and Thaís Gomes Verzignassi Silveira. Photodynamic therapy for american cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with leishmania (leishmania) amazonensis. *Experimental Parasitology*, 128(4):353 – 356, 2011.

- [14] Maiara Camotti Montanha, Larissa Lachi Silva, Fernanda Belincanta Borghi Pangoni, Gabriel Batista Cesar, Renato Sonchini Gonçalves, Wilker Caetano, Noboru Hioka, Tania Toyomi Tominaga, Márcia Edilaine Lopes Consolaro, Andréa Diniz, and Elza Kimura. Response surface method optimization of a novel hypericin formulation in p123 micelles for colorectal cancer and antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 170:247 – 255, 2017.
- [15] Ranulfo Combuca da Silva Junior, Katieli da Silva Souza Campanholi, Flávia Amanda Pedroso de Morais, Magali Soares dos Santos Pozza, Geraldo Tadeu dos Santos, Noboru Hioka, and Wilker Caetano. Development and applications of safranine-loaded pluronic f f127 and p123 photoactive nanocarriers for prevention of bovine mastitis: In vitro and in vivo studies. *Dyes and Pigments*, 167:204 215, 2019.
- [16] Aguinaldo S. Garcez, Silvia C. Núñez, Nilton Azambuja, Eduardo R. Fregnani, Helena M.H. Rodriguez, Michael R. Hamblin, Hideo Suzuki, and Martha S. Ribeiro. Effects of photodynamic therapy on gram-positive and gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. *Photomedicine and Laser Surgery*, 31(11):519–525, 2013. PMID: 23822168.
- [17] K. Mahmoudi, K. L. Garvey, A. Bouras, G. Cramer, H. Stepp, J. G. Jesu Raj, D. Bozec, T. M. Busch, and C. G. Hadjipanayis. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 141(3):595–607, Feb 2019.
- [18] J. P. Gordon, R. C. C. Leite, R. S. Moore, S. P. S. Porto, and J. R. Whinnery. Long-transient effects in lasers with inserted liquid samples. *Journal of Applied Physics*, 36(1):3–8, 1965.
- [19] S. J. Sheldon, L. V. Knight, and J. M. Thorne. Laser-induced thermal lens effect: a new theoretical model. *Appl. Opt.*, 21(9):1663–1669, May 1982.
- [20] Jun Shen, Andrew J. Soroka, and Richard D. Snook. A model for cw laser induced modemismatched dual-beam thermal lens spectrometry based on probe beam profile image detection. *Journal of Applied Physics*, 78(2):700–708, 1995.
- [21] Luis C. Malacarne, Nelson G. C. Astrath, Paulo R. B. Pedreira, Renio S. Mendes, Mauro L. Baesso, Prakash R. Joshi, and Stephen E. Bialkowski. Analytical solution for mode-mismatched thermal lens spectroscopy with sample-fluid heat coupling. *Journal of Applied Physics*, 107(5):053104, 2010.
- [22] Luis C. Malacarne, Nelson G. C. Astrath, and Mauro L. Baesso. Unified theoretical model for calculating laser-induced wavefront distortion in optical materials. J. Opt. Soc. Am. B, 29(7):1772– 1777, Jul 2012.
- [23] L. C. Malacarne, E. L. Savi, M. L. Baesso, E. K. Lenzi, and N. G. C. Astrath. Role of photophysics processes in thermal lens spectroscopy of fluids: A theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 118(31):5983–5988, 2014. PMID: 25017719.
- [24] L. S. Herculano, L. C. Malacarne, V. S. Zanuto, G. V. B. Lukasievicz, O. A. Capeloto, and N. G. C. Astrath. Investigation of the photobleaching process of eosin y in aqueous solution by thermal lens spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(6):1932–1937, 2013. PMID: 23374106.

- [25] Leandro Silva Herculano, Gustavo Vinicius Bassi Lukasievicz, Elizandra Sehn, Wilker Caetano, Diogo Silva Pellosi, Noboru Hioka, Nelson Guilherme Castelli Astrath, and Luis Carlos Malacarne. Photodegradation in micellar aqueous solutions of erythrosin esters derivatives. *Applied Spectroscopy*, 69(7):883–888, 2015. PMID: 26036593.
- [26] P. R. B. Pedreira, L. R. Hirsch, J. R. D. Pereira, A. N. Medina, A. C. Bento, M. L. Baesso, Maria C. Rollemberg, Mladen Franko, and Jun Shen. Real-time quantitative investigation of photochemical reaction using thermal lens measurements: Theory and experiment. *Journal of Applied Physics*, 100(4):044906, 2006.
- [27] J.B. Hudson, I. Lopez-Bazzocchi, and G.H.N. Towers. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Research*, 15(2):101 112, 1991.
- [28] Patrizia Agostinis, Annelies Vantieghem, Wilfried Merlevede, and Peter A.M. de Witte. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 34(3):221 – 241, 2002.
- [29] Pavol Miskovsky. Hypericin a new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Current Drug Targets*, 3(1):55–84, 2002.
- [30] Lester M. Davids, Britta Kleemann, Denisa Kacerovská, Karl Pizinger, and Susan H. Kidson. Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. *Journal* of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 91(2):67 – 76, 2008.
- [31] Constance Saw, Paul Wan Sia Heng, and Malini Olivo. Potentiation of the photodynamic action of hypericin. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 27:23–33, 02 2008.
- [32] Nelson Durán and Pill-Soon Song. Hypericin and its photodynamic action. *Photochemistry and Photobiology*, 43(6):677–680, 1986.
- [33] Lin-Fang HUANG, Zeng-Hui WANG, and Shi-Lin CHEN. Hypericin: chemical synthesis and biosynthesis. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(2):81 – 88, 2014.
- [34] YOSHIO HIROSE, MAKOTO KUROIWA, HARUYO YAMASHITA, TAKEO TANAKA, and TOSHIHARU MEGUMI. Chemical studies on the natural anthraquinones. i. synthesis of munjistin, emodin and 3-hydroxy-2-methylanthraquinone. CHEMICAL PHARMACEUTICAL BULLETIN, 21(12):2790–2793, 1973.
- [35] George A. Kraus, Weijiang Zhang, Susan Carpenter, and Yvonne Wannemuehler. The synthesis and biological evaluation of hypericin analogs. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 5(22):2633 – 2636, 1995.
- [36] Sang-Wook Kim, Jeong Park, Seung Yang, Min Goo Hur, Yu-Seok Kim, Jong-Seo Chai, Young Soon Kim, and Kook Hyun Yu. Facile synthesis and radioiodine labeling of hypericin. *Cheminform*, 36, 01 2005.
- [37] Renato Goncalves, Bruno Ribeiro Rabello, Gabriel Cesar, Paulo C. S. Pereira, Marcos Ribeiro, Eduardo Meurer, Noboru Hioka, Celso Nakamura, Marcos Bruschi, and Wilker Caetano. An efficient multigram synthesis of hypericin improved by a low power led based photoreactor. *Organic Process Research Development*, 11 2017.

- [38] Richard D. Snook and Roger D. Lowe. Thermal lens spectrometry. a review. *Analyst*, 120:2051–2068, 1995.
- [39] Renato Cruz, Arístides Marcano, Carlos Jacinto, and T Catunda. Ultra-sensitive thermal lens spectroscopy of water. *Optics letters*, 34:1882–4, 07 2009.
- [40] M. Ventura, E. Simionatto, L.H.C. Andrade, E.L. Simionatto, D. Riva, and S.M. Lima. The use of thermal lens spectroscopy to assess oil-biodiesel blends. *Fuel*, 103:506 – 511, 2013.
- [41] R Constantino, Giane Gonçalves, M.G. Franco, Ervin Lenzi, Antonio Bento, Nelson Astrath, Luis Malacarne, and Mauro Baesso. Thermal lens temperature scanning technique for evaluation of oxidative stability and time of transesterification during biodiesel synthesis. *Fuel*, 202, 08 2017.
- [42] Nelson Astrath, F.B.G. Astrath, Jun Shen, J Zhou, Kirk Michaelian, Craig Fairbridge, Luis Malacarne, P Pedreira, P.A. Santoro, and Mauro Baesso. Arrhenius behavior of hydrocarbon fuel photochemical reaction rates by thermal lens spectroscopy. *Applied Physics Letters*, 95, 11 2009.
- [43] Nelson Astrath, Francine B G Astrath, Jun Shen, Jianqin Zhou, Kirk Michaelian, Craig Fairbridge, Luis Malacarne, P Pedreira, Antonio Medina, and Mauro Baesso. Thermal-lens study of photochemical reaction kinetics. *Optics letters*, 34:3460–2, 11 2009.
- [44] Leandro Herculano, Nelson Astrath, Luis Malacarne, Jurandir Rohling, Sonia Tanimoto, and Mauro Baesso. Laser-induced chemical reaction characterization in photosensitive aqueous solutions. *The journal of physical chemistry. B*, 115:9417–20, 06 2011.
- [45] Luis Malacarne, Nelson Astrath, Antonio Medina, Leandro Herculano, Mauro Baesso, P Pedreira, Jun Shen, Qing Wen, Kirk Michaelian, and Craig Fairbridge. Soret effect and photochemical reaction in liquids with laser-induced local heating. *Optics express*, 19:4047–58, 02 2011.
- [46] Jurandir Rohling, A M. F. Caldeira, José Pereira, Antonio Medina, Antonio Bento, Mauro Baesso, Luiz Miranda, and Adley Rubira. Thermal lens scanning of the glass transition in polymers. *Journal* of Applied Physics, 89, 02 2001.
- [47] Odon S. Aréstegui, Patricia Y.N. Poma, Leandro Herculano, Gustavo Lukasievicz, Francine B. Guimarães, Luis Malacarne, Mauro Baesso, Stephen Bialkowski, and Nelson Astrath. Combined photothermal lens and photothermal mirror characterization of polymers. *Applied Spectroscopy*, 68, 07 2014.
- [48] Mauro Baesso, Antonio Bento, A.A. Andrade, J Sampaio, Edison Pecoraro, L A. O. Nunes, T Catunda, and Sergio Gama. Absolute thermal lens method to determine fluorescence quantum efficiency and concentration quenching of solids. *Phys. Rev. B*, 57, 05 1998.
- [49] Carlos Jacinto, A.A. Andrade, T Catunda, Sandro Lima, and Mauro Baesso. Thermal lens spectroscopy of nd:yag. *Applied Physics Letters*, 86:034104–034104, 01 2005.
- [50] Nelson Astrath, Alysson Steimacher, Jurandir Rohling, Antonio Medina, Antonio Bento, Mauro Baesso, Carlos Jacinto, T Catunda, Sandro Lima, and Balasubramanian Karthikeyan. Thermal lens and interferometric method for glass transition and thermo physical properties measurements in nd2o3 doped sodium zincborate glass. *Optics express*, 16:21248–55, 01 2009.

- [51] Masahide Terazima. Refractive index change by photothermal effect with a constant density detected as temperature grating in various fluids. *The Journal of Chemical Physics*, 104(13):4988–4998, 1996.
- [52] Gregor Bánó, Jana Staničová, Daniel Jancura, Jozef Marek, Mikuláš Bánó, Jozef Uličný, Alena Strejčková, and Pavol Miškovský. On the diffusion of hypericin in dimethylsulfoxide/water mixturesthe effect of aggregation. *The journal of physical chemistry. B*, 115:2417–23, 02 2011.
- [53] M. Bánó, J. Marek, and Marek Stupak. Hydrodynamic parameters of hydrated macromolecules: Monte carlo calculation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6:2358–2363, 05 2004.
- [54] Hans Brockmann and Rudolf Mühlmann. Über die photochemische cyclisierung des helianthrons und dianthrons zum meso-naphthodianthron. *Chemische Berichte*, 82(4-5):348–357, 1949.
- [55] K. A. Muszkat. Photochromism and thermochromism in bianthrones and bianthrylidenes, chapter 6, pages 203–224. John Wiley Sons, Ltd, 2010.
- [56] Ana P. Castano, Pawel Mroz, and Michael R. Hamblin. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, 6:535–545, 2006.
- [57] João Paulo Tardivo, Auro Del Giglio, Carla Santos de Oliveira, Dino Santesso Gabrielli, Helena Couto Junqueira, Dayane Batista Tada, Divinomar Severino, Rozane de Fátima Turchiello, and Mauricio S. Baptista. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(3):175 – 191, 2005.
- [58] Loling Song. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. doctoral thesis. 01 1996.
- [59] L. Song, C.A. Varma, J.W. Verhoeven, and H.J. Tanke. Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Biophysical Journal*, 70(6):2959 – 2968, 1996.
- [60] Jerker Widengren, Andriy Chmyrov, Christian Eggeling, Per-Åke Löfdahl, and Claus A. M. Seidel. Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(3):429–440, 2007. PMID: 17228891.
- [61] Nelson G. C. Astrath, Luis C. Malacarne, Gustavo V. B. Lukasievicz, Marcos P. Belancon, Mauro L. Baesso, Prakash R. Joshi, and Stephen E. Bialkowski. Pulsed-laser excited thermal lens spectros-copy with sample-fluid heat coupling. *Journal of Applied Physics*, 107(8):083512, 2010.
- [62] Gustavo V. B. Lukasievicz, Nelson G. C. Astrath, Luis C. Malacarne, Leandro S. Herculano, Vitor S. Zanuto, Mauro L. Baesso, and Stephen E. Bialkowski. Pulsed-laser time-resolved thermal mirror technique in low-absorbance homogeneous linear elastic materials. *Applied Spectroscopy*, 67(10):1111–1116, 2013. PMID: 24067567.
- [63] George Long and Stephen Bialkowski. Pulsed infrared laser thermal lens spectrophotometric determination of trace-level gas-phase analytes: Quantitation of parts per billion dichlorodifluoromethane. Analytical Chemistry, 56:2806, 04 2002.
- [64] Sébastien Chanlon and J Georges. Pulsed-laser mode-mismatched crossed-beam thermal lens spectrometry within a small capillary tube: effect of flow rate and beam offset on the photothermal signal. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, 58:1607–13, 07 2002.

- [65] A. Chartier, J. Georges, and J.M. Mermet. Abnormal signals in thermal lens spectrophotometry: Determination of the triplet lifetime of erythrosine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 46(12):1737 – 1742, 1990.
- [66] R. Brennetot and J. Georges. Investigation of the erythrosine triplet decay rate using pulsed-laser photothermal spectrometry and transient bleaching of the singlet state. *AIP Conference Proceedings*, 463(1):229–231, 1999.
- [67] Kiyokazu Fuke, Masayasu Ueda, and Michiya Itoh. Thermal lensing study of singlet oxygen reactions. Journal of the American Chemical Society, 105(5):1091–1096, 1983.
- [68] Gerald Rossbroich, Norman A. Garcia, and Silvia E. Braslavsky. Thermal-lensing measurements of singlet molecular oxygen (1g): Quantum yields of formation and lifetimes. *Journal of Photochemistry*, 31(1):37 – 48, 1985.